

Einsatz eines 3-D Zellkulturmodellverbandes bei
der Testung bekannter und neuer
Anti-Tumor-Wirkstoff-Kandidaten



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV –
Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg

vorgelegt von

Jürgen Friedrich

aus Wunsiedel

Regensburg, 2009

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. L. Kunz-Schughart

Promotionsgesuch eingereicht am: 02. März 2009

Prüfungsausschuss:	Vorsitzender:	Prof. Dr. J. Schlossmann
	1. Gutachter:	Prof. Dr. A. Göpferich
	2. Gutachter:	Prof. Dr. L. Kunz-Schughart
	3. Prüfer:	Prof. Dr. A. Kurtz

I. Einleitung	5
1. Einsatz von dreidimensionalen (3-D) Zellkulturmodellen im Anti-Tumor-Wirkstoff-Screening-Prozess	5
2. Das multizelluläre Tumor-Sphäroid-Modell (MCTS-Modell)	7
2.1 Wachstum und pathophysiologische Eigenschaften	7
2.2 Sphäroidtechnologie	10
2.3 MCTS im Arzneimittel-Screening: Fortschritte und Herausforderungen	14
3. Aufgabenstellung und Zielsetzung	17
II. Material und Methoden	19
1. Materialien und Geräte	19
1.1 Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel	19
1.2 Zellkulturmedien, -puffer und -lösungen	20
1.3 Chemikalien und Wirkstoffe	20
1.4 Kits	21
1.5 Antikörper	22
1.6 Geräte	22
1.7 Tumorzelllinien	24
1.8 Auswerte- und Analysesoftware	25
2. Methoden der Zellkultivierung	26
2.1 Monolayer-Kulturen	26
2.1.1 Einfrieren und Auftauen von Stammkulturen	26
2.1.2 Monolayer-Stammkultivierung	26
2.1.3 Kultivierung in 96-Well-Mikrotiterplatten	27
2.2 Sphäroid-Kulturen in „Liquid-Overlay“-Technik	27
2.2.1 Aussaat und Kulturbedingungen	27
2.2.2 Teil-Automatisierung der Sphäroidkultivierung	29
3. Methoden der Sphäroidanalytik	29
3.1 Teilautomatisierte Bestimmung von Sphäroiddurchmesser und -volumen	29
3.1.1 Beschreibung des Sphäroidvolumenwachstums mit Hilfe des Gompertz Modells	29
3.2 Sphäroiddissoziation und Zellzahlbestimmung	30
3.3 Sphäroidhistologie	30
3.4 Auswachsen von Sphäroiden in 96-Well Mikrotiterplatten	31
3.4.1 Beschichtung mit Kollagen Typ 1	31
3.4.2 Hemmung der Proliferation in Sphäroiden mittels Mitomycin C	31
3.4.2.1 Anti-BrdU-Färbung	32

3.4.2.2 Ki-67-Färbung	33
4. Behandlung von Monolayer- und Sphäroid-Kulturen	34
4.1 Triton X-100	34
4.2 Wirkstoffe	34
5. Acid Phosphatase (APH) Assay zur Bestimmung der Zytotoxizität/Zellvitalität ..	38
5.1 Theoretische Grundlagen	38
5.2 Durchführung an Monolayer-Kulturen	39
5.3 Durchführung an Sphäroid-Kulturen	39
6. Genexpressionsmonitoring (HITSSM)	39
6.1 RNA-Isolation	40
6.1.1 RNA-Isolation bei Monolayer-Kulturen	40
6.1.2 RNA-Isolation bei Sphäroid-Kulturen	40
6.2 Affy-Chip Labelling und Hybridsierung	41
6.3 Expressionsanalyse	43
III. Ergebnisse	44
1. Standardisierung und Teilautomatisierung der Sphäroidkultivierung	44
1.1 Testung neuer anti-adhäsiver Oberflächenbeschichtungen für eine High-Through-put-Sphäroid-Kultur	44
1.1.1 Tissue Culture Plate 96-Well Round Bottom Suspension Cells (Sarstedt)	45
1.1.1.1 Inkubation ohne Schüttler	45
1.1.1.2 Inkubation mit Schüttler	46
1.1.2 Zero-Trap TC (NoAb)	47
1.1.3 Microplate, 96-well, U-Bottom (Greiner Bio-One)	48
1.1.4 96-well Standard Microplate (ABGene)	48
1.1.5 Microtest TM U-Bottom (Becton-Dickinson Labware)	49
1.1.6 Low-Cell-Binding U96 W Lid (Nunc TM)	49
1.1.7 HydroCell 96 Multi-well plate (Nunc TM)	54
1.2 Sphäroidkultivierung mit Hilfe des Seria/Mate [®] (Thermo Fisher Scientific)	57
2. Standardisierung und Teilautomatisierung der Sphäroidanalytik	59
2.1 Bildaufnahme mittels AvioVison 4.5 Software (Zeiss)	59
2.2 Bestimmung von Sphäroiddurchmesser und -volumen	60
3. 2-dimensionales Auswachsen von Sphäroidzellen auf Oberflächen- beschichteten 96-Well Mikrotiterplatten	62
3.1 Auswachsen von HT29-Sphäroiden auf Kollagen Typ I beschichteten Platten	62
3.2 Hemmung der Proliferation in Sphäroiden mittels Mitomycin C	64

4. Zellzahlbestimmung/Vitalitätsbestimmung mittels APH Assay	67
4.1 Nachweis eines linearen Zusammenhangs zwischen APH-Signal und Lebendzellzahl in Sphäroiden	67
4.1.1 HT29 Sphäroide	68
4.1.2 HCT-116 Sphäroide	69
4.1.3 HCT-15 Sphäroide	70
4.1.4 DLD-1 Sphäroide	71
4.1.5 KM12L4A Sphäroide	72
4.1.6 KM20L2 Sphäroide	73
4.1.7 WiDr Sphäroide	74
4.1.8 Übersicht der Ergebnisse zur Linearität des APH Signals	75
4.2 Vergleich der Lebendzellzahl und des APH-Signals in 5-Fluorouracil-behandelten HT29 Sphäroiden	75
5. Detektion anti-tumoraler Effekte in Monolayer- und Sphäroid-Kulturen der beiden Kolonkarzinomzelllinien HT29 und HCT-116	76
5.1 DNA/RNA Antimetaboliten	78
5.1.1 5-Fluorouracil	78
5.2 Alkylierende Substanzen	81
5.2.1 Cyclophosphamid	81
5.2.2 Carboplatin	84
5.2.3 Cisplatin	87
5.2.4 CCNU/Lomustin	90
5.3 Antimitotische Wirkstoffe	93
5.3.1 Paclitaxel	93
5.4 DNA/RNA-interkalierende Wirkstoffe	97
5.4.1 Mitoxantron	97
5.5 Topoisomerase-II-Inhibitoren	100
5.5.1 Doxorubicin	100
5.5.2 Epidoxorubicin	104
5.6 Topoisomerase-I-Inhibitoren	107
5.6.1 Irinotecan	107
5.7 Neue Wirkstoffkandidaten	111
5.7.1 Topoisomerase-I-Inhibitor WMC-79	111
5.7.2 FLT3 Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor C-1311	114

6. Kombination des APH Assays mit komplexem Genexpressionsmonitoring (HITSSM)	118
6.1 Vergleich der Genexpression in 5-FU bzw. WMC-79 behandelten HT29-Zellen ..	118
IV. Diskussion	121
1. Standardisierung und (Teil-)Automatisierung	121
1.1 Sphäroidkultivierung	121
1.2 Sphäroidanalytik	122
2. Zytotoxizitäts-/Vitalitätsbestimmung in Sphäroid-Kulturen	123
2.1 Grundlegende methodische Betrachtungen	123
2.2 Zytotoxizitäts-/Vitalitätsbestimmung mittels APH Assay.....	125
2.3 Detektion anti-tumoraler Effekte von Wirkstoffen mittels APH Assay	127
3. Möglichkeiten für einen Einsatz von MCTS im High-Throughput-Screening	132
4. MCTS und experimentelle Therapeutik	134
5. Vom homologen zum heterologen MCTS	137
V. Zusammenfassung	142
VI. Literaturverzeichnis	144
VII. Anhang	165

I. Einleitung

I.1 Einsatz von dreidimensionalen (3-D) Zellkulturmodellen im Anti-Tumor-Wirkstoff-Screening-Prozess

Fortschritte auf den Gebieten der Genomik und der Proteomik haben die Forschung nach neuen Wirkstoffen und molekularen Angriffspunkten in der Tumortherapie revolutioniert. Forschung und die Pharmazeutische Industrie sind dadurch in der Lage, immer mehr relevante Angriffspunkte zu identifizieren und zielgerichtet gegen diese vorzugehen. Zur erfolgreichen Entwicklung und geeigneten Auswahl viel versprechender Wirkstoffe werden zuverlässige und stabile Testsysteme benötigt. Heutzutage nutzen viele Pharmazeutischen Unternehmen als ersten Schritt zur Wirkstoffentwicklung eine Reihe spezifischer High-Throughput-Screening (HTS) Assays. Unter dem Einfluss technologischer und instrumenteller Weiterentwicklungen wurde in den letzten 10 Jahren eine Vielzahl unterschiedlicher HTS Assays entwickelt. Dazu gehören sowohl biochemische, wie z.B. Ligand-Bindungsassays (Pereira et al. 2007), als auch zellbasierte Assay (Gill et al. 2007; Zimmermann et al. 2008; Trivedi et al. 2008). Die Vorhersagbarkeit einer klinischen Effizienz dieser Assays ist jedoch nach wie vor in der Diskussion (Kunz-Schughart et al. 2004). Ein ständiges Forschungsgebiet ist daher die Entwicklung neuer, komplexer Testsysteme, um Erkenntnisse über die Effekte und Funktionen diverser Wirkstoffmoleküle im zellulären Kontext zu erhalten. Gegenwärtig lassen sich diese zellbasierenden Assays in drei Gruppen einteilen: (a) allgemeine Zellantwort auf externe Stimuli (z.B. Proliferation, Vitalität, Zytotoxizität), (b) Assays, die Signaltransduktionswege verfolgen (z.B. Kinaseaktivierung, Ionenkanäle), und (c) Zellantwort auf Transkriptions- bzw. Translationsebene (z.B. Reportergene, Aktivierung von Transkriptionsfaktoren).

Pharmazeutische Unternehmen nutzen heutzutage *in vitro* HTS-Assays hauptsächlich zum Screening von Wirkstoffbanken und für die Entwicklung neuer Wirkstoffklassen. Obwohl viele der zellbasierten Assays *in vitro* schon jetzt in der Wirkstoffentwicklung eingesetzt werden, vor allem in den gut beschriebenen Krebszelllinienmodellen (Johnson et al. 2001; Monga et al. 2002), bleibt die Prognose für eine klinische Antwort auf neue Wirkstoffe wahrscheinlich eher begrenzt (Sausville 2000; Pelkonen et al. 2001; Balis 2002). Die Limitierung dieser zweidimensionalen (2-D) zellbasierten Assays ist darauf zurückzuführen, dass diese Systeme die Antwort von Zellen im 3-D Mikromilieu (wie in Geweben und Tumoren *in vivo*) nur unzureichend bzw. gar nicht widerspiegeln. Darum erscheint es sinnvoll, die Möglichkeiten technisch ausgereifterer *in vitro* Modelle zu nutzen, um die Situation *in vivo* besser nachzuahmen. 3-D Zellkulturmodelle können das Verhalten vieler Zelltypen *in vivo* deutlich besser imitieren (Kunz-Schughart et al. 2004). Der Einsatz solcher Modelle im Wirkstoff-Screening scheint deshalb sehr aussichtsreich. Eine Zusammenfassung der bestbekannten

3-D Zellkulturmodelle, die bislang in der Tumorbiologie eingesetzt werden, ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tabelle 1. Zusammenfassung von 3-D Zellkulturmodellen, die gegenwärtig in der Zell- und Tumorforschung eingesetzt werden.

Zellkulturmodell	Beschreibung	u.a. verwendet zur Beobachtung von
Zellulärer Multilayer	Übereinander liegende Zellschichten, die auf einer durchlässigen Membran gezüchtet werden	Wirkstofftransport/-bindung, Therapieresistenz, Invasion (Hicks et al. 1997; Padron et al. 2000; Duong et al. 2005)
Matrix-eingebettete Kulturen	Einzelzellen oder Zellaggregate, die in einer durchlässigen, extrazellulären Matrix gezüchtet werden	Tumorzellbiologie, Zell-Zell-Interaktionen, Zellmigration/-invasion artifizieller Organe (Casciari et al. 1994; Muralidhar et al. 2001; Nelson et al. 2005; Debnath et al. 2005; Lee et al. 2007)
Hollow-Fiber Bioreaktor	Zellen, die innerhalb eines Netzwerks durchströmter, artifizieller Kapillaren gezüchtet werden	Tumorzellmetabolismus, Therapieresistenz, artifizieller Organe (Gillies et al. 1993; Legallais et al. 2001; Dulong et al. 2002; Matsuura 2006)
ex vivo Kulturen	Operativ entfernte Gewebe- oder Tumorstücke, die <i>in vitro</i> kultiviert werden	Therapieresistenz, Zell-Zell-Interaktionen, Tumormarker (Berglund et al. 2002; Ochs et al. 2003)
Multizelluläres Sphäroid	Sphärisches Zellaggregat in stehender oder gerührter Suspensionskultur	Tumorzellbiologie, Therapieresistenz, Zell-Zell-Interaktionen, Wirkstoffpenetration/-modelling, Tumormarker, Nährstoffverteilung, Tumorzellmetabolismus (Sutherland 1988; Kunz-Schughart et al. 1998; Mueller-Klieser 2000; Friedrich et al. 2007a)

Der Hauptgrund, warum diese oder andere 3-D Zellkulturmodelle bislang noch nicht im Wirkstoff-Screening-Prozess eingesetzt werden können, ist das Fehlen einfacher, kontrollierter Techniken und Protokolle für einen schnellen, standardisierten Assay zur Bestimmung der zellulären Antwort *in situ*. Erschwerend kommt hinzu, dass der Forschungsschwerpunkt des *in vitro* Wirkstoff-Screenings über viele Jahre auf der Weiterentwicklung des High-

Throughput-Verfahrens einfacher Kultursysteme lag, nach dem Motto: kleiner, schneller, mehr (z.B. 384-Well-Platten, Analyse von Einzelzellen). Dennoch gibt es bereits erste Ansätze, um zuverlässige HTS-Methoden, die ursprünglich für Monolayer-Kulturen entwickelt wurden, an höher-entwickelten Kultursystemen anzuwenden (Kunz-Schughart et al. 2004). Dies würde die Prognostik eines Screening-Systems stark verbessern, ohne dabei den High-Throughput-Charakter zu verlieren. Ein weiterer Aspekt dieser Entwicklung wäre, die Anzahl von Tierversuchen im Wirkstoffentwicklungsprozess verringern zu können. 3-D Testsysteme könnten als Zwischenglied zwischen 2-D zellbasierten Assays und Tiermodellen (Xenografts, Autologe Hollow-Fiber) dienen (Kunz-Schughart et al. 2004).

I.2 Das multizelluläre Tumor-Sphäroid-Modell (MCTS-Modell)

Das klassische und meist beschriebene 3-D Tumormodellsystem ist das multizelluläre Tumor-Sphäroid-(MCTS)-Modell. Von den in Tabelle 1 beschriebenen 3-D *in vitro* Modellen besitzen MCTSs, neben Matrix-eingebetteten Kulturen, das größte Potential für einen Einsatz in der Anti-Tumor-Wirkstoff-Entwicklung im HTS-Verfahren.

I.2.1 Wachstum und pathophysiologische Eigenschaften

Zahlreiche Reviews und Buchkapitel fassen die Geschichte des Sphäroidmodells seit seiner Einführung in die Krebsforschung durch Radiobiologen in den frühen siebziger Jahren (Sutherland et al. 1970; Sutherland et al. 1971a; Sutherland et al. 1971b) zusammen. Seit damals wurde das klassische, von Sutherland und Mitarbeitern eingeführte System von sphärischen, multizellulären Kulturen tierischer Zelllinien stetig weiterentwickelt.

Beim Einsatz von Sphäroiden in therapeutischen Testsystemen sind deren pathophysiologische Eigenschaften besonders hervorzuheben. So imitieren Sphäroide das Wachstum und das Mikromilieu avaskulärer Tumormikroregionen, sowie morphologische und funktionelle Eigenschaften von Tumorzellen *in vivo* (siehe Abbildung 1). Zellen in der Sphäroidperipherie entsprechen dabei Zellzyklus-aktiven Tumorzellen, die *in vivo* an Kapillaren angrenzen. Im Gegensatz dazu befinden sich die innersten Zellen eines Sphäroids im Ruhezustand, sterben letztendlich durch Apoptose oder Nekrose und bilden dadurch einen sekundärnekrotischen Kern. Die konzentrische Anordnung heterologer Zellpopulationen in Sphäroiden und das Auftreten eines pathophysiologischen Gradienten gleichen der Situation in Mikrometastasen, vaskulärer Tumoren oder interkapillären Tumorregionen (Mueller-Klieser 1987; Sutherland 1988).

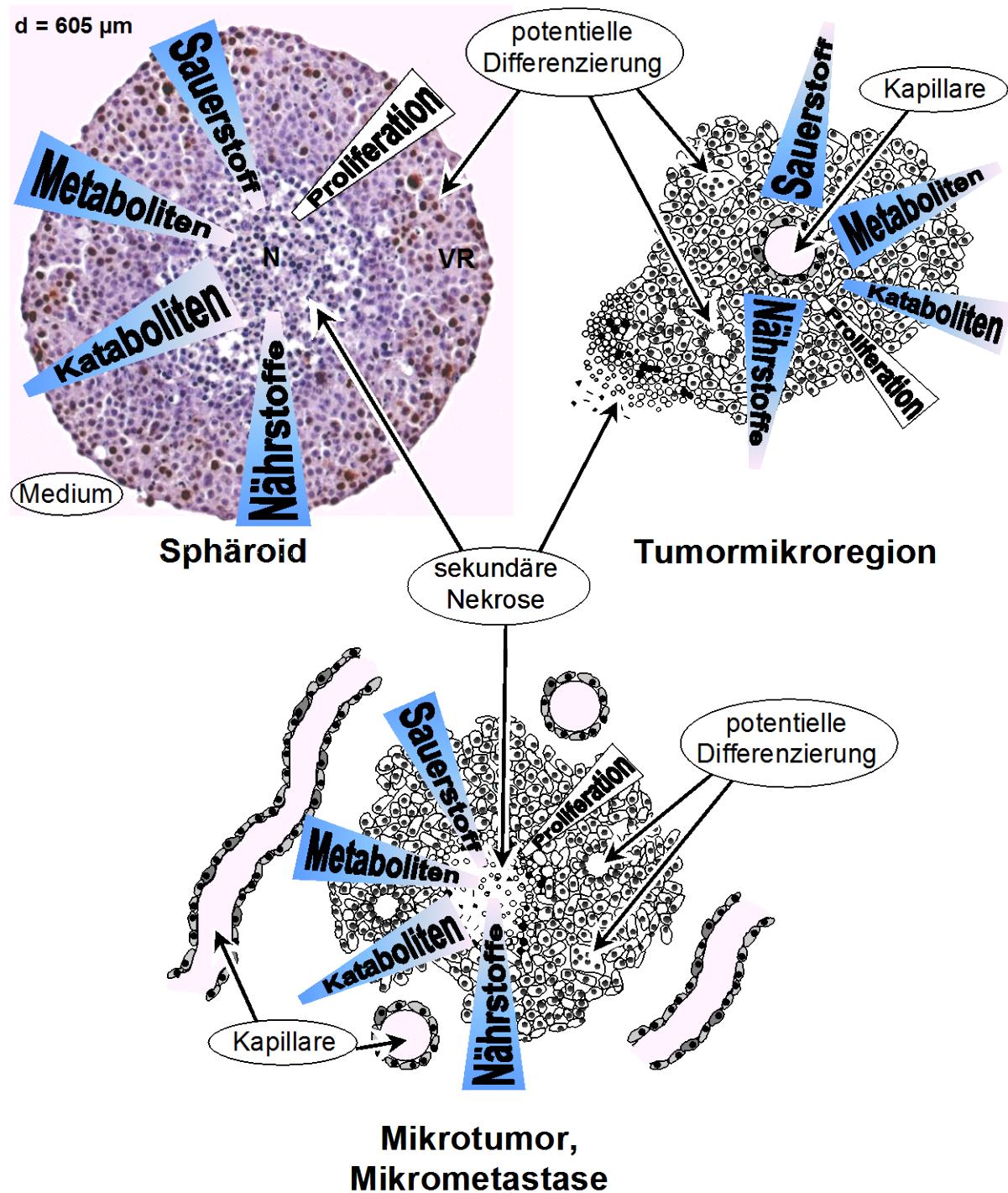


Abbildung 1. MCTs (oben links, $d = 605 \mu\text{m}$) zeigen Wachstumscharakteristika und zahlreiche pathophysiologische Eigenschaften von avaskulären Tumormikroregionen und/oder entstehenden Mikrometastasen (unten). Weiterhin ähnelt der Versorgungs-/Abbaugradient in Sphäroiden der Situation von der Kapillare hin zur Peripherie in Tumormikroregionen (oben rechts) (Friedrich et al. 2007a).

Über einen kritischen Durchmesser von meist 500-600 μm hinaus bilden die meisten Sphäroidtypen aus etablierten Zelllinien im Kern eine zentrale, sekundäre Nekrose aus. Dieser ist üblicherweise von einer 100-300 μm breiten Schicht aus lebenden Zellen umgeben und korreliert mit einer eingeschränkten Einwärts-/Auswärtsdiffusion positiver und negativer Regula-

toren. Dadurch kommt es zur Unterversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen, einer Ansammlung von Abfallprodukten und einem verringerten pH-Wert (siehe Abbildung 2) (Acker et al. 1987; Carlsson et al. 1988). Mehrere Arbeitsgruppen studierten die dauerhafte Verteilung von Glukose, Laktat und energiereicher Phosphatasen, sowie die Aktivität der Mitochondrien in Sphäroiden (Freyer et al. 1990; Walenta et al. 1990; Freyer et al. 1991; Bredel-Geissler et al. 1992; Teutsch et al. 1995). Diese Studien zeigen eine Anpassung des Metabolismus innerer Sphäroidregionen an Umgebungsbedingten Stress, unter Aufrechterhaltung intrazellulärer Homöostase bis kurz vor den Zelltod.

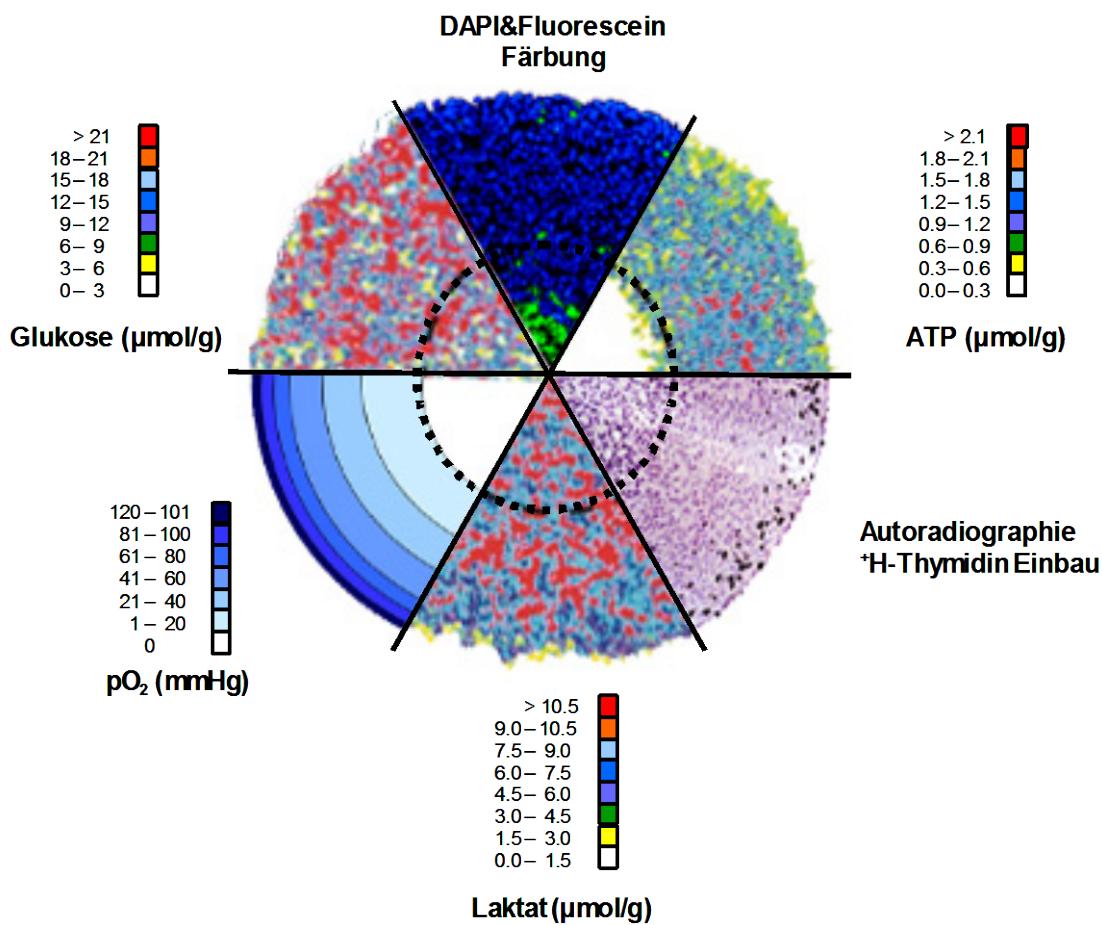


Abbildung 2. Übersicht über die Verteilung von ATP, Glukose, Laktat (Falschfarben ermittelt über Biolumineszenz an Gefrierschnitten (Walenta et al. 1990; Kunz-Schughart et al. 2000a) und Sauerstoff (ermittelt über Sauerstoffmikroelektroden) in einem MCTS. Zusätzlich abgebildet ist eine Autoradiographie zum Nachweis proliferierender Zellen (dunkelbraun), und eine DAPI&Fluorescein Färbung zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen in apoptotischen Zellen (grün). Der innere gestrichelte Kreis markiert den Bereich der zentralen, sekundären Nekrose.

Hier wird jedoch auch sichtbar, dass sich Tumorzellen in Bezug auf ihre Sensitivität gegenüber diesen Stresssituationen massiv unterscheiden. Dies ist auf die Eigenschaft zurückzuführen, dass Tumorzellen sowohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen sehr variable Energie produzieren können. Neben den erwähnten Eigenschaften besitzen MCTS

ein komplexes 3-D Netzwerk aus Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen und verfügen teilweise über eine ausgedehnte Extrazellulärmatrix (ECM). Diese Komponenten beeinflussen nicht nur die Verteilung und Funktion biologischer Regulatoren (z.B. Hormone, Wachstumsfaktoren) (Winters et al. 2006), sondern auch die Penetration und Aktivität von Wirkstoffen (Goodman et al. 2007).

I.2.2 Sphäroidtechnologie

Für die Kultivierung von Sphäroiden aus tierischen Zellen wurden bereits verschiedene Techniken beschrieben (Mueller-Klieser 1987; Lund-Johansen et al. 1992; Kunz-Schughart et al. 2000b). Abbildung 3 zeigt die am häufigsten verwendeten Methoden, die sowohl der Erzeugung großer Mengen an Sphäroiden, als auch der Beobachtung von einzelnen Sphäroiden dienen. Im Großen und Ganzen hat sich die Kultivierungstechnologie in den letzten zwanzig Jahren kaum verändert. Spinnerflaschen sind dabei immer noch eine der wichtigsten Methoden, um große Mengen von Sphäroiden eines definierten Größenbereichs unter optimaler Nährstoffversorgung zu kultivieren. Hier wird durch ständiges Rühren ein Anhaften der Tumorzellen am Flaschenboden verhindert, wodurch diese sphärische Aggregate ausbilden. Als Alternative dazu können Sphäroide während eines Initiationsintervalls aus Tumorzellen in nicht-adhärenen, z.B. bakteriologisch oder Agar-beschichteten „mother dishes“ generiert und später in Spinnerflaschen überführt werden. Ein vergleichbarer Ansatz, um große Mengen an Sphäroiden zu kultivieren und dabei die Nebeneffekte von „stehendem“ Medium zu vermeiden, sind Rollerröhren-/flaschen oder ein Rotationsschüttler. Eine neue, interessante Technologie, die ähnliche Vorteile aufweist und durch kontinuierlichen Mediumfluß sogar noch gleichmäßigere Kulturbedingungen garantiert, ist der NASA Bioreaktor („rotating wall vessel“). Dieses rotierende Zellkultursystem wurde ursprünglich entwickelt, um die Mikrogravitation nachzuahmen und Zellen unter möglichst geringer Scherspannung in Suspension zu halten (Ingram et al. 1997). Weiterhin wurde es auch zur Kultivierung einfacher und komplexer Sphäroide eingesetzt (Clejan et al. 2001; Song et al. 2004; Vamvakidou et al. 2007). Obwohl diese Methode bestens zur Kultivierung von (Primär-) Zellen geeignet scheint, birgt sie aufgrund des komplizierten Systemaufbaus und der sich daraus ergebenden Problematik der Gewährleistung der Sterilität sowie der hohen Kosten gegenüber Spinnerflaschen keine wesentlichen Vorteile für ein adäquates Wirkstoffscreening.

Weitere Ansätze zur Kultivierung von Sphäroiden sind stationäre Zellkulturtechnologien. Zu diesen Methoden zählt auch die Aussaat von aggregierenden Tumorzellen in Agarose-beschichtete 96-Well Platten, die daraufhin je Well ein einzelnes Sphäroid ausbilden. Mit dieser Technik ist somit die Beobachtung bzw. Manipulation einzelner Sphäroide möglich. Für einen Einsatz dieser Methode als angewandtes Therapie-Testsystem sprechen folgende

Punkte: (a) hohe Reproduzierbarkeit der Sphäroidbildung, (b) mögliche Analyse einzelner Sphäroide vor und nach Behandlung und (c) geringe benötigte Mengen einer Testsubstanz.

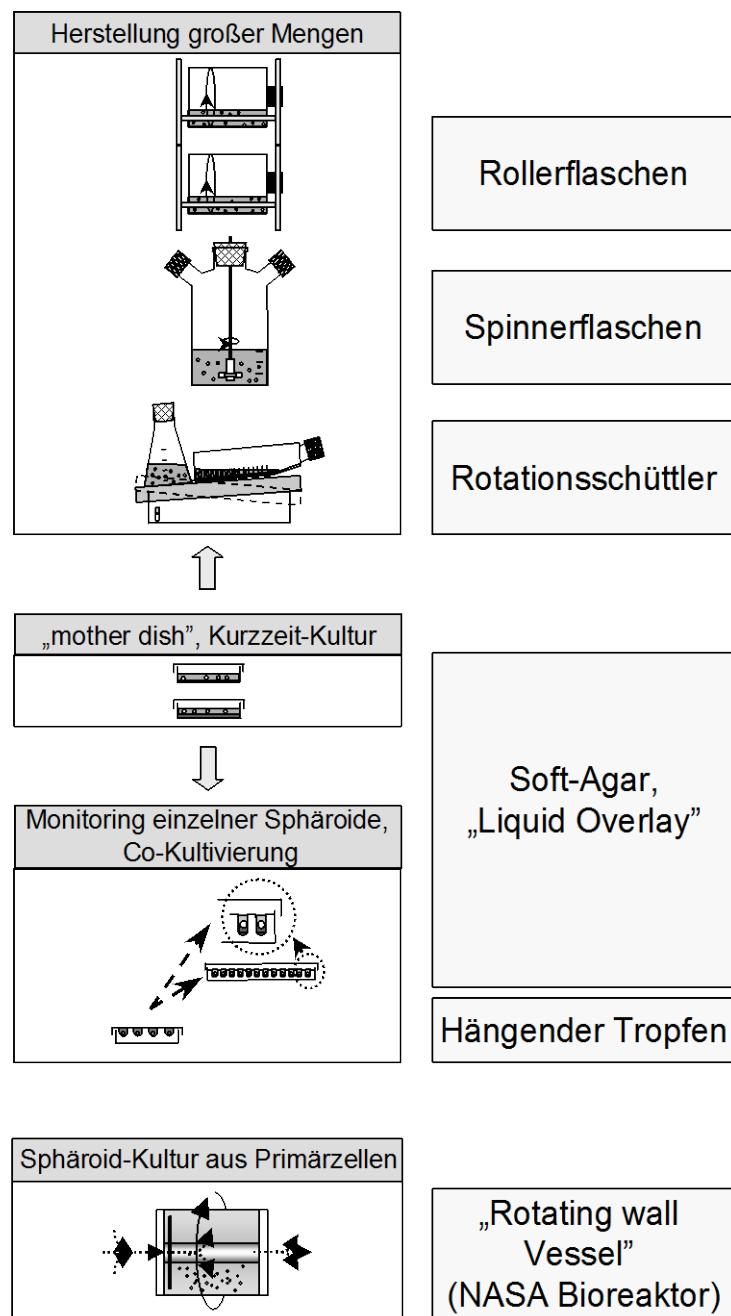


Abbildung 3. Übersicht häufig verwendeter Methoden zur Anzucht von MCTS aus Zelllinien oder Primärzellen, Sphäroid-Co-Kulturen und Zellverbänden aus Gewebematerial (Friedrich et al. 2007a).

In zahlreichen früheren Studien wurde gezeigt, dass für die Kultivierung von Sphäroiden im „Liquid-Overlay“-Verfahren Flachbodenplatten, die mit 1,5 - 3% Agar/Agarose in serumfreien Medium beschichtet wurden besonders geeignet sind (Carlsson et al. 1984). Weiterhin wurden auch Modifikationen dieser Technik, wie die Beschichtung von Rundbodenplatten mit 0,5% poly-HEMA (Hydroxyethylmethakrylat) in 95% Ethanol, beschrieben (Tong et al. 1992; Hoevel et al. 2004; Ivascu et al. 2006). Leider ist es nach wie vor erforderlich, die Platten zur

Sphäroidkultivierung manuell zu beschichten, da kommerziell erhältliche 96-Well-Platten für nicht-adhäsente Zellkulturen keine verlässliche Sphäroidbildung garantieren. Dieser Nachteil mag mit dafür verantwortlich sein, dass man heutzutage unter anderem die Technik des „hängenden Tropfens“ (hanging drop), die ursprünglich zur Kultivierung von „Embryoid-Bodies“ eingesetzt wurde (Kelm et al. 2003; Del et al. 2004), für die Anzucht von MCTS verwendet. Hierbei ist zwar keine Beschichtung von Zellkulturplatten nötig, allerdings eignet sich diese Methode nur zur kurzzeitigen Kultivierung von Sphäroiden (d.h. zur MCTS-Initiation), solange Sphäroide nicht behandelt bzw. gefüttert werden müssen.

Mittels der beschriebenen Kulturtechniken konnten bislang viele humane Tumorzelllinien in sphärischen Kulturen gezüchtet und studiert werden. Tabelle 2 liefert einen Überblick einiger epithelialer Tumorzelllinien verschiedenen Ursprungs, die bereits dafür bekannt sind, Sphäroide ausbilden zu können.

Tabelle 2. Übersicht einiger epithelialer Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs, die Sphäroide ausbilden können (Friedrich et al. 2007a). Angegeben ist auch, welche der Zelllinien im 60-Zelllinien-Screen des National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program (NCI-DTP; <http://dtp.nci.nih.gov/branches/btb/ivclsp.html>) enthalten sind.

Entität	Zelllinie	NIH-DTP Screen	Literatur
Plattenepithelkarzinom	1483	-	(Sturgis et al. 1994)
	A431	-	(Ng et al. 1987; Casciari et al. 1988; Kwok et al. 1991)
	CaSki	-	(Casciari et al. 1988; Kwok et al. 1991; Lohr et al. 1995)
	FaDu	-	(Stuschke et al. 1992)
	HEp-2	-	(Kohno et al. 1988)
	HN-1	-	(Schwachhofer et al. 1989)
	MDA 686LN	-	(Sturgis et al. 1994)
	MDA 886Ln	-	(Sacks et al. 1989; Nishikawa et al. 1990; Sturgis et al. 1994)
	SQ5	-	(Nakayama 1991)
Lunge NSCLC	A549*	+	(Ivascu et al. 2006)
	NCI-H125	-	(Schwachhofer et al. 1991)
	NCI-H322M	+	(Ivascu et al. 2006)
	NCI-H40*	+	(Ivascu et al. 2006)
	SK-MES-1	-	(Audran et al. 1994)
	DMS53	-	(Douple et al. 1985)
Kolon	COLO 205*	+	(Ivascu et al. 2006)
	DLD-1 [#]	+	(Nicholson et al. 1997; Mellor et al. 2005)
	HCT-15 ^{*,*}	+	(Ivascu et al. 2006)
	HCT-116	+	information by word of mouth
	HT29	+	(Lees et al. 1981; Sutton et al. 1982; Sutherland et al. 1986; Simiantonaki et al. 2002; Lowthers et al. 2003)
	LoVo	-	(Soranzo et al. 1986; Soranzo et al. 1988; Pervez et al. 1989; Dolfini et al. 2005)
	LS174T	-	(Horan et al. 1985; Langmuir et al. 1989)
	SW620*	+	(Ivascu et al. 2006)
	WiDr [§]	-	(Chan et al. 1991; Banks et al. 1994; Jansen et al. 1994; Buffa et al. 2001)
	MIA PaCa2	-	(McLeod et al. 1997)
Pankreas	Panc1	-	(McLeod et al. 1997)
	Hep3B	-	(Lin et al. 2006)
Leberzellkarzinom	HepG2*	-	(Gorlach et al. 1994; Selden et al. 2000; Kelm et al. 2003; Ivascu et al. 2006; Lambert et al. 2006; Lin et al. 2006)
	Huh-7	-	(Tonary et al. 2006)

Brust	BT20	-	(Muller-Holzner et al. 1996)
	BT474	-	(Kunz-Schughart et al. 2001; Seidl et al. 2002)
	MCF-7	+	(Pourreau-Schneider et al. 1984; Olea et al. 1992; Kunz-Schughart et al. 2001; Kelm et al. 2003; Ivascu et al. 2006)
	MDA-MB-231	+	(Ivascu et al. 2006; Muir et al. 2006)
	MDA-MB-361	-	(Hoevel et al. 2004; Ivascu et al. 2006)
	MDA-MB-468	+	(Ivascu et al. 2006)
	SK-BR-3	-	(Kunz-Schughart et al. 2001; Ivascu et al. 2006)
	T47D	+	(Ronen et al. 1990; Kan et al. 2001; Kunz-Schughart et al. 2001; Seidl et al. 2002; Ivascu et al. 2006)
	MDA-MB-435 [†]	+	(Stuschke et al. 1995; Ivascu et al. 2006)
	NCI/ADR ^{RES[‡]}	+	(Walker et al. 2004; Ivascu et al. 2006)
Ovar	IGR-OV1*	+	(Ivascu et al. 2006)*
	MCAS	-	(Sonoda et al. 2003)
	OVCAR-3	+	(Bardies et al. 1992; Filippovich et al. 1996)
	OVCAR-5	+	(Casey et al. 2001)
	SKOV3*	+	(Makhija et al. 1999; Frankel et al. 2000; Casey et al. 2001; Ivascu et al. 2006)*
Cervix	HeLa-S3	-	(Sommers et al. 1998)
	SiHa	-	(Olive et al. 1996; Olive et al. 1997; Durand et al. 1998; Oloumi et al. 2000; Oloumi et al. 2002)
Niere	786-0	+	(Lieubeau-Teillet et al. 1998)
	A498	+	(Heuser et al. 2003)
	(HEK)-293	-	(Talts et al. 2000; Ivascu et al. 2006)
	UO-31	+	(Ivascu et al. 2006)
Blase	J82	-	(Lottner et al. 2004)
	MGH-U1	-	(Tannock et al. 1986; Kerr et al. 1991; Erlichman et al. 1992)
	MGH-U3	-	(LaRue et al. 1997; Kilani et al. 2003)
	RT-4	-	(Konur et al. 1998)
	RT-112	-	(Huygens et al. 2003; Kamuhabwa et al. 2003)
	T24	-	(Kawai et al. 2001)
	UROtsa	-	(Lottner et al. 2004)
Prostata	DU-145	+	(Essand et al. 1993; Frankel et al. 2000; Enmon, Jr. et al. 2002; Wartenberg et al. 2002; Wartenberg et al. 2003)
	LNCAP*	-	(Ballangrud et al. 1999; Ballangrud et al. 2001; Konduri et al. 2001; Enmon et al. 2003; Ivascu et al. 2006)*
	PC-3*	+	(Donaldson et al. 1990; Hedlund et al. 1999; Enmon, Jr. et al. 2002; Ivascu et al. 2006)*
Haut/ Melanom	A375	-	(Cheng et al. 1991; Mills et al. 2002; Martiny-Baron et al. 2004)
	BEX-c	-	(Hystad et al. 1994; Rofstad et al. 1996)
	BRO	-	(Schwachhofer et al. 1990; Schwachhofer et al. 1991)
	C32	-	(Yuhas et al. 1984)
	C918	-	(Braun et al. 2007)
	C8161	-	(Strasberg et al. 2004)
	CaCL 73-36	-	(Kwok et al. 1988; McFadden et al. 1988; Kwok et al. 1989)
	DC-10	-	(Feder-Mengus et al. 2007)
	HBL	-	(Feder-Mengus et al. 2007)
	HMV-I	-	(Kubota et al. 1984; Kuwashima et al. 1988; Kuwashima et al. 1993)
	Hs294	-	(Offner et al. 1996)
	IGRI	-	(Gorlach et al. 1994)(Porwol et al. 1996)
	Mel108	-	(Gottfried et al. 2006)
	MelIm	-	(Gottfried et al. 2006)
	MeWo	-	(Offner et al. 1996; Jorgensen et al. 2005)
	NA8	-	(Ghosh et al. 2005; Feder-Mengus et al. 2007)
	OM467	-	(Parry et al. 1992)
	OM482	-	(Parry et al. 1992)
	SB-2	-	(Mills et al. 2002)

	SK-MEL-28	+	(Freyer 1988; Freyer et al. 1989; LaRue et al. 2004)
	ST-ML-11	-	(Offner et al. 1996)
	ST-ML-12	-	(Offner et al. 1992; Offner et al. 1993)
	ST-ML-14	-	(Offner et al. 1996)
	ST-ML-25	-	(Offner et al. 1996)
	WIX-c	-	(Hystad et al. 1994; Rofstad et al. 1996)
	WM9	-	(Francia et al. 2005)
	WM35	-	(Shellman et al. 2003; Jorgensen et al. 2005; Francia et al. 2005)
	WM45.1	-	(Jorgensen et al. 2005)
	WM115	-	(Fang et al. 2005; Monzani et al. 2007)
	WM164	-	(Rieber et al. 2006)
	WM239	-	(Francia et al. 2005)
	WM902B	-	(Jorgensen et al. 2005)
	WM1341B	-	(Jorgensen et al. 2005)
	WM3517	-	(Fang et al. 2005)
	WM3523	-	(Fang et al. 2005)
	WM3539	-	(Fang et al. 2005)

*unter Zugabe rekombinanter Basalmembran (rBM) (Ivascu et al. 2006)

[#]DNA Fingerprinting Analysen deuten darauf hin, dass die beiden Zelllinien HCT-15 und DLD-1 von ein und demselben Spender stammen (Vermeulen et al. 1998)

[§]WiDr Zellen wurden als Abkömmlinge von HT29 Zellen beschrieben (Chen et al. 1987)

[†]der Ursprung von MDA-MB-435 aus Brustkrebsgewebe ist fraglich, da diese Zellen Melanozyten spezifische Gene exprimieren (Ellison et al. 2002; Rae et al. 2004)

[‡]NCI/ADR^{Res} wurden als Abkömmlinge der Ovarzelllinie OVCAR-8 beschrieben (Garraway et al. 2005)

Jedoch konnte beobachtet werden, dass nicht alle dieser Tumorzelllinien Sphäroide ausbilden, d.h. adhärieren. Um dennoch ein Ausbildung dichter und fester Sphäroide mit solchen Zelllinien zu erreichen, kam es zu einer Erweiterung der Sphäroidkultivierung durch Ivascu und Kubies (2006). So ist die Sphäroidformierung durch Zugabe von Komponenten der Extrazellulärarmatrix (ECM) bei der Sphäroidinitialisierung möglich. Als Alternative dazu kann anstelle der ECM Methylzellulose zugesetzt werden, ein Ansatz, der erstmals bei der Etablierung eines Endothelzellsphäroid-Modells zum Einsatz kam (Korff et al. 1998).

I.2.3 MCTS im Arzneimittel-Screening: Fortschritte und Herausforderungen

Schon lange wird eine Vielzahl sehr unterschiedlicher Methoden eingesetzt, um intakte und lebende, eingefrorene, in Paraffin eingebettete oder auch dissozierte Sphäroide zu analysieren (Kunz-Schughart et al. 1998). Heutzutage werden zudem neueste, molekulare Techniken genutzt, um Sphäroidzellen auf zellulärer, Protein-, RNA- und auch DNA-Ebene zu untersuchen. Hinsichtlich eines Wirkstoff- oder Therapie-Screenings stehen jedoch nach wie vor keine automatisierten, einfach zu bedienenden Analysemethoden zur Verfügung. Erschwerend kommt hinzu, dass noch immer keine definierten und standardisierten Endpunktmesungen festgelegt sind, was die Grundvoraussetzung für den routinemäßigen Einsatz von MCTS im Wirkstoff-Screening darstellt.

Das Sphäroid-Wachstum, welches mittels Gompertz Gleichung (Marusic et al. 1994; Kunz-Schughart et al. 1996) oder anderer mathematischer Modelle (Tabatabai et al. 2005) beschrieben werden kann, bzw. eine Wachstumsverzögerung nach beginnender Behandlung ist nur ein Parameter, der routinemäßig dokumentiert werden sollte. Dazu müssen die Sphäroid-Durchmesser über einen längeren Zeitraum hinweg analysiert werden. Da diese Analyse des Sphäroidvolumens bzw. des Sphäroidvolumenwachstums technisch einfach ist gilt sie immer noch als die am häufigsten verwendete Methode, um die Effekte wachstumsfördernder bzw. wachstumshemmender Faktoren und Wirkstoffe in MCTS zu bewerten. Eine einfache Auswertung von Sphäroidvolumenzunahme oder -abnahme ist heute mittels Phasen-Kontrast-Mikroskopie und (teil-)automatisierter Bildanalyse möglich. Da eine aussagekräftige Bestimmung des Sphäroidvolumens mittels dieser Methode nur an annähernd gleichmäßig runden, d.h. nicht abgeflachten, Sphäroiden durchführbar ist, muss hier neben der Zirkularität in X/Y-Richtung, unbedingt auch auf die Spherizität in Z-Richtung geachtet werden. Zusätzlich zur Analyse des Sphäroidvolumens kann mit diesem Verfahren die Sphäroidintegrität nach einer Behandlung dokumentiert werden. Allerdings ist zu beachten, dass die Aufnahme der Phasenkontrastbilder zur Bestimmung des Sphäroidvolumens bislang größtenteils manuell bewerkstelligt werden muss, was einen hohen Arbeits- bzw. Zeitaufwand in sich birgt.

Beobachtungen des Sphäroid-Wachstums (z.B. verzögertes oder erneutes Wachstum) lassen keine Unterscheidung zwischen den Effekten auf die Lebensfähigkeit und den Effekten auf die Wachstumsrate bzw. Rekrutierung von ruhenden Zellen, die wieder in den Zellzyklus eintreten, zu. Hierfür werden andere analytische Methoden benötigt. Zu den wohl interessantesten Parametern für eine potentielle automatisierte Analyse gehören die Zellvitalität bzw. das Überleben der Zellen, das Auswachsverhalten oder die Migration von Sphäroidzellen, aber auch der (pathophysiologische) Status in Sphäroiden. Vor einigen Jahren wurde eine Technik vorgestellt, mit der Therapeutika mit Hilfe von Echtzeit Impedanzmessungen an MCTS getestet wurden. Dabei wurden Sphäroide in einer Messkapillare positioniert, um deren Impedanzspektrum, das als Maß für die Sphäroid-Morphologie, -Physiologie und Zellintegrität gilt, gemessen. Aufgrund der anspruchsvollen Handhabung und einer schwierigen Bewertung der Ergebnisse konnte dieses Biohybrid System bislang nicht zur routinemäßigen Analyse eingesetzt werden (Thielecke et al. 2001a). Kürzlich wurde diese Methode dazu verwendet, genetisch veränderte und Methotrexat-behandelte MCF-7 Sphäroide zu untersuchen (Bartholoma et al. 2005). Für ein Wirkstoffscreening muss diese Technik aber erst noch validiert werden.

Von größerer Bedeutung ist, dass eine Vielzahl von Versuchen unternommen wurde, um die Bestimmung von Zellzahl und Lebensfähigkeit von Zellen in MCTSs zu erleichtern. Bislang wird die Zellvitalität bzw. Zellzahl pro Sphäroid häufig mittels einer milden enzymatischen

Dissoziation bestimmt. Dieser folgt dann die Zellzahlbestimmung mit Hilfe einer Zählkammer oder Zellanalysegeräten, wie der Coulter Counter® (Beckman Coulter Inc., Miami, FL, USA) oder das Casy 1 System (Schärfe System GmbH, Reutlingen). Oftmals werden diese Analysen mit Zellvitalitätsfärbungen, wie Trypanblau oder Propidiumiodid, das mittels Durchflußzytometrie oder im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden kann, kombiniert. Da üblicherweise die respiratorische Aktivität dazu angesehen wird, den Zellstatus widerzuspiegeln und mit der Zellvitalität zu korrelieren, beobachteten Torisawa et al. mit Hilfe der Scanning elektrochemischen Mikroskopie (SECM) diese Aktivität (nicht invasiv) in MCF-7 MCTSs (Torisawa et al. 2005). Die Ergebnisse korrelierten mit denen des MTT äquivalenten WST-8 Assays, der nach der Dissoziation der Sphäroide durchgeführt wurde (MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid; WST-8: 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-di-sulfophenyl)-2H tetrazolium mono-sodium). Weiterhin haben zahlreiche Wissenschaftler versucht, standardmäßig angewandte Zellvitalitätsassays, wie den MTT Assay oder ähnliche Testsysteme, an Sphäroiden zu testen. In den meisten Fällen jedoch konnten diese nicht bei Sphäroiden größer 200 µm ohne deren Dissoziation durchgeführt werden. Da die Dissoziation von MCTS einen artifiziellen Verlust von Zellen, vor allem nach therapeutischen Eingriffen, verursachen kann, sollte diese unbedingt vermieden werden. Eine der wenigen systematischen Studien, die unterschiedliche Techniken zur Prüfung zytotoxischer Effekte in Sphäroiden verwendete, beinhaltete nur kleinere Sphäroide, die keine zentrale Nekrose ausbilden (Kosaka et al. 1996). Für eine Beurteilung der Wirkstoffeffekte auf hypoxische und Zellzyklus-arretierte Zellpopulationen im Zentrum von Sphäroiden ≥ 500 µm sind diese Methoden daher nicht validiert. In einer anderen Studie wurde mittels Bestimmung der Laktat-dehydrogenase (LDH)-Aktivität der Zelltod in Sphäroiden ermittelt. Hierbei wurden die Prozesse des Zelltods in Sphäroid-Sektionen mittels zytometrischer Bildverarbeitung verfolgt. Die aufwendige Prozessierung der paraffinierten Sphäroid-Schnitte limitiert diese Methode für einen Einsatz im High-Throughput-Screening (De Witt Hamer et al. 2005). Für Untersuchungen an Monolayer-Kulturen gibt es neben der klassischen Methode der LDH Messung in den Überständen behandelter vs. unbehandelter Zellen, bereits eine Vielzahl kommerziell erhältlicher Zytotoxizitäts-/Vitalitätsassays, die auf Absorptions-, Lumineszenz- oder Fluoreszenzmessungen basieren. Abhängig vom zu messenden Parameter (z.B. Membranintegrität, intrazelluläre Aktivität, energetischer Status) werden diese Messungen in Zellüberständen oder an intakten bzw. lysierten Zellen durchgeführt. Trotz umfangreicher Tests konnte bislang keiner dieser Assays für einen Einsatz an Sphäroiden validiert werden (Doß 2008). Für ein High-Throughput-Wirkstoff-Screening auf der Basis von MCTS werden technologische Weiterentwicklungen und eine erweiterte Standardisierung benötigt. Trotzdem hat die stetige Weiterentwicklung der Sphäroidtechnologie in den letzten Jahren das Potential von MCTS für einen Einsatz im Wirkstoff-Screening merklich erhöht. Studien zur lokalen Wirk-

stoffpenetration, Wirkstoffverteilung im Gewebe und Bindungseigenschaften mit Hilfe von Sphäroiden stellen eine weitere Herausforderung dar. So ist ein großer Vorteil des Sphäroid-Modells, dass effektive Wirkstoffkandidaten in den Zellverband penetrieren müssen. Die Analyse dieser Penetrationsstudien kann mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie (Martin et al. 2003; Kostarelos et al. 2004; Mellor et al. 2005) oder auch der Multiphotonen Mikroskopie erfolgen. Da die Dissoziation und die Schnittdarstellung von Sphäroiden vermieden werden sollte, sind diese Analysemethoden zurzeit hinsichtlich eines schnellen, automatisierten Einsatzes limitiert.

I.3 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Ziel der Arbeit war die Anpassung eines seit langem in der Forschung etablierten 3-D Zell-systems an industrielle Anforderungen durch Optimierung, Standardisierung und Adaption von Kulturbedingungen und Analytik, mit einer mittel- oder langfristigen Aussicht auf eine Reduktion von Tierexperimenten in der onkologischen Wirkstoffprüfung der pharmazeutischen Industrie.

Fortschritte in der kombinatorischen Chemie und Verfahrenstechnik, sowie Erkenntnisse aus Genom- und Proteomforschung haben über die letzten 5-10 Jahre zu einem exponentiellen Anstieg in der Verfügbarkeit neuer bzw. neuartiger Wirkstoffkandidaten zur Behandlung maligner Erkrankungen geführt. Damit stehen Forschung und Industrie vor dem Problem, immer mehr Wirkstoffkandidaten in Tiermodellen testen zu müssen, wobei die klinische Relevanz der im Antitumor-Drug-Testing eingesetzten Tiermodelle kaum belegt und daher umstritten ist. Dies hat zur Entwicklung vielfältiger zweidimensionaler, Zell-basierter Testsysteme im Rahmen des sekundären Drug-Screenings geführt. Derzeit etablierte 2-D Assays sind zwar erheblich komplexer als klassische biochemische Ansätze, reflektieren die *in vivo*-Situation in vieler Hinsicht jedoch nach wie vor nur unzureichend. 3-D Kulturmodelle, wie das seit langem bekannte Sphäroid-Kultursystem, könnten im industriellen Screening einen bedeutenden Beitrag zur besseren Auswahl der vielversprechendsten Wirkstoffkandidaten und deren Anwendungsparameter vor der bzw. für die Applikation in Tiermodellen leisten, und so langfristig zu einer deutlichen Einsparung an Versuchstieren führen. Da solche Modellsysteme aufgrund der gegenüber herkömmlichen Systemen aufwändigeren Kultur- und Analysetechnik noch keinen Eingang in die routinemäßige Wirkstofftestung gefunden haben, sollte im Rahmen der durchgeführten Arbeit eine grundlegende technologische Plattform zum Einsatz multizellulärer Sphäroide beim Screening neuer Anti-Tumor-Therapeutika geschaffen werden. Um langfristig die Akzeptanz der Plattform für den industriellen Einsatz eines Sphäroid-basierten Screens erreichen zu können, waren folgende spezifische Arbeitsziele im Rahmen der vorliegenden Arbeit anvisiert:

- A. Standardisierung und Automatisierung der Sphäroidkultivierung
 - Testung neuer anti-adhäsiver Oberflächenbeschichtungen für die High-Throughput-Sphäroid-Kultur
- B. Adaption und Automatisierung der Sphäroidanalytik
 - automatisierte Analyse von Sphäroidvolumen und Wachstumskinetik
 - Testung geeigneter Methoden zur Detektion von Zytotoxizität/Vitalität in High-Throughput-Verfahren
 - Charakterisierung des Auswachsverhaltens
- C. Etablierung und Bewertung des APH Assays an Sphäroiden durch Einsatz definierter Kontrollsubstanzen und für die Testung neuer Wirkstoffklassen
- D. Kombination des APH Assays mit komplexem Expressionsmonitoring zur Beurteilung von Wirkstoffkandidaten

Die Testung geeigneter Methoden zur Detektion von Zytotoxizität/Vitalität in Sphäroiden sollte an den sieben Kolonkarzinomzelllinien HT29, HCT-116, HCT-15, KM12L4A, KM20L2 und WiDr erfolgen. HT29 Zellen sollten weiterhin zur Charakterisierung des Auswachsverhaltens von Sphäroiden verwendet werden.

Zur Etablierung und Bewertung des APH Assays an Sphäroiden der Kolonkarzinomzelllinien HT29 bzw. HCT-116 sollten zunächst die Kontrollsubstanzen 5-Fluorouracil (5-FU), Cyclophosphamid, Carboplatin, Cisplatin, CCNU/ Lomustin, Paclitaxel, Mitoxantron, Doxorubicin, Epidoxorubicin und Irinotecan im Konzentrationsbereich von 0,1 - 200 μ M eingesetzt werden. Für die Testung neuer Wirkstoffkandidaten standen WMC-79 und C-1311 zur Verfügung.

Zusätzlich sollten die Genexpressionsmuster 5-FU bzw. WMC-79 behandelter und unbehandelter HT29 Monolayer- und Sphäroid-Kulturen mit den Ergebnissen des APH Assays kombiniert werden. Abschließend sollte die Genexpressionsanalyse an exponentiell-wachsenden bzw. konfluenten Monolayer-Kulturen und Sphäroiden unterschiedlicher Größe der Kolonkarzinomzelllinien HT29, HCT-116 und KM12L4A, der Mammakarzinomzelllinien BT474 und MCF-7, und der Lungenkarzinomzelllinien A549 und NCI-H460 erfolgen.

II. Material und Methoden

II.1 Materialien und Geräte

II.1.1 Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel

Tabelle 3. Verwendete Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel.

Produkt	Hersteller
Aufsatz für Multipipette, Plastibrand (2,5 ml)	Brand, Wertheim
Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Reaktionsgefäße 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Filterpapier	Engelbrecht, Edermünde
Kryoröhrchen Cryo.S, PP, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Messpipetten, Serologie, Glas	Brand, Wertheim
Objekträger Super Frost Plus	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Paraffin-Einbettungskassetten	Engelbrecht, Edermünde
Pasteurpipetten, Glas	Brand, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäß MicroAmp®, 96-Well	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Petrischalen Cellstar 94/16 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen weiß 0,5-20 µl Plastibrand	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen gelb 5-100 µl Plastibrand	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen blau 200 -1000 µl Typ Eppendorf	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen Matrix SeriaMate® Tips Standard 5-220 µl	Thermo Fisher Scientific, Wilmslow, UK
Polypropylenröhrchen 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Spritze 10 ml + Kanüle BD Microlance	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zellkulturflaschen T 25, T 75, T 175	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatte 96-Well Deep Well	Corning Costar®, Cambridge, MA, USA
Zellkulturplatte 96-Well, Rundboden, Suspensionszellen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatte 96-Well Standard Microplate	ABgene Germany, Hamburg
Zellkulturplatte BD BioCoat™ Kollagen I Cellware	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Zellkulturplatte HydroCell 96 Multi-well plate	Nunc™ GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Zellkulturplatte Low Cell Binding U96 W Lid	Nunc™ GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Zellkulturplatte Microplate, 96-Well, U-Bottom	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatte Microtest™, 96-Well, Flachboden	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zellkulturplatte Microtest™, 96-Well, U-Bottom	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zellkulturplatte Zero-Trap TC	NoAb Bio Discoveries, Mississauga, Ontario, CA

II.1.2 Zellkulturmedien, -puffer und -lösungen

Tabelle 4. Verwendete Zellkulturmedien, -puffer und -lösungen.

Produkt	Hersteller
Bovine Serum Albumine (BSA), acetyliert (50 mg/ml)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Casy [®] ton, isotonische Verdünnungslösung für Casy Zellzähler und Analysator	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (+ je 1,0 g/l D-Glukose und Natriumpyruvat)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Fötales Kälberserum (FKS)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Penicillin/Streptomycin (1000 U Pen./10 mg Strep. pro ml)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Trypsin/EDTA-Lösung (0,5% / 0,2%ig)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach

II.1.3 Chemikalien und Wirkstoffe

Tabelle 5. Verwendete Chemikalien und Wirkstoffe.

Produkt	Hersteller
2'-Desoxycytidin (dC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
5-Fluorouracil (5-FU)	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bromodeoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
C-1311 (Symadex TM)	Avalon Pharmaceuticals, Germantown, MD, USA
Carboplatin	Calbiochem, San Diego, CA, USA
CCNU/Lomustin	ChemPacific Corp., Baltimore, MD, USA
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
Cisplatin	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Cyclophosphamid	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt
Doxorubicin	Fluka Biochemika, Buchs, CH
EDTA Dinatriumsalz (0,5M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Epidoxorubicin	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Formafix (37% Formalin)	SG Planung, Holzkirchen
Hering sperm DNA (10mg/ml)	Promega, Madison, WI, USA
Irinotecan	Toronto Research Chemicals (TRC) Inc., North York, ON, CA
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kollagen Typ 1	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Kontroll-Oligo B2 (3nM)	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
MES Hydrat SigmaUltra	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
MES Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Mitomycin C	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mitoxantron	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA

NaOH	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumacetat 3M, pH 5,2	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Paclitaxel (Taxol)	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
PNPP (p-Nitrophenyl Phosphate, Disodium Salt)	Pierce, Rockford, IL, USA
Pepsin (porcine gastric mucosa)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Propanol	Merck KGaA, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ribonuclease A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Salzsäure 37%, c(HCl)	Merck KGaA, Darmstadt
TMAC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TRIzol	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Tween 10%	Pierce, Rockford, IL, USA
WMC-79	Avalon Pharmaceuticals, Germantown, MD, USA
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt

II.1.4 Kits

Tabelle 6. Verwendete Kits.

Produkt	Hersteller
Endo Free Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
GeneChip Eukaryotic Hybridization Control Kit	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
GeneChip HT IVT Labelling Kit	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
GeneChip HT One-Cycle cDNA Synthesis Kit	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill III	Merck KGaA, Darmstadt
Qiaquick 96-well	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy	Qiagen GmbH, Hilden
Ventana Basic DAB Detection Kit 1. Inhibitorenlösung (1,1%) Wasserstoffperoxid, Natriumazid 2. Biotinylierter Sekundärantikörper (je < 200 g/ml), Anti-Maus-(IgG und IgM)/Anti-Kaninchen-Antikörper (IgG) in Proteinstabilisatorlösung (Konservierungsmittel) 3. Avidin-HRPO Konjugat (< 300 g/ml) Avidin-Meerrettich-Peroxidase in Protein-stabilisatorlösung (Konservierungsmittel) 4. Wasserstoffperoxidlösung (0,04 - 0,08%) 5. Substratlösung (DAB (3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydro-chlorid) in Proteinstabilisatorlösung 6. Kupfersulfatlösung (Tournigand et al. 2006)	Ventana Medical Systems, Inc. Tucson, AZ, USA

II.1.5 Antikörper

Tabelle 7. Verwendete Antikörper.

Produkt	Hersteller
<p>Monoklonaler Mausantikörper Anti-Human BrdU</p> <p>Klon: Bu20a Isotyp: IgG 1</p> <p>Lieferform: flüssige Lösung als Gewebekulturüberstand (RPMI 1640 Medium mit fötalem Kälberse- rum) dialysiert gegen in 0,05 mol/l Tris/HCL (pH 7,2) mit 15 mmol/l NaN₃. IgG Konzentra- tion: 556 mg/l</p>	Dako, Glostrup, Dänemark
<p>Monoklonaler Mausantikörper Anti-Human Ki-67 Antigen</p> <p>Klon: MIB-1 Isotyp: IgG 1</p> <p>Lieferform: flüssige Lösung aus gereinigtem IgG (Kon- zentration: 50 mg/l) verdünnt in 0,05 mol/l Tris/HCl mit 15 mmol/l NaN₃ und 1% Käl- berserumalbumin, pH 7,2</p>	Dako, Glostrup, Dänemark
<p>Polyklonale Kaninchen Anti-Maus Im- munoglobuline/FITC</p> <p>Lieferform: gereinigte Immunglobulinfraktion aus Ka- ninchen serum konjugiert mit FITC. Flüssige Lösung in 0,01 mol/l PBS, 15 mmol/l NaN₃, pH 7,2. Antikörper Titer: 400 mg/l</p>	Dako, Glostrup, Dänemark

II.1.6 Geräte

Tabelle 8. Verwendete Geräte.

Produkt	Hersteller
Affymetrix GeneChip HT Scanner	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Automated Multichannel Pipetting Sys- tem <i>SeriaMate</i> [®]	Thermo Fisher Scientific, Wilmslow, UK
CO ₂ -Inkubator Heraeus (T 6120)	Heraeus, Hanau
Durchflußzytometer FACSCalibur	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Gefrierschrank -86 ULT Freezer	Thermo Forma, Marietta, OH, USA

Histocentre 2	Shandon, Frankfurt a. M.
Hypercenter XP Enclosed Tissue Processor	Shandon, Frankfurt a. M.
Laborwaage L310	Sartorius Laboratory, Göttingen
Microplate Reader Emax® Precision	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
Mikroskopsystem Axiovert 200 mit AxioCam MRc Kamera	Zeiss, Jena
Mikroskopsystem Axiovert 200M mit AxioCam MRm Kamera	Zeiss, Jena
Mikroskopsystem Labovert FS	Leitz, Wetzlar
Mikrotom HM 350	Microm, Heidelberg
Milli Q plus, Millipore Ultra pure water system	Millipore, Billerica, USA
NexES® IHC System	Ventana Medical Systems, Inc. Tucson, AZ, USA
Objektträger-Strecktisch OTS 40	Medite Medizintechnik, Burgdorf
PCR DNA Thermal Cycler 480	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Pipette Multipipette, 8-Kanal	Brand, Wertheim
Pipette Reference-Pipette-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette Transferpipette 0,5-10 µl	Brand, Wertheim
Pipette Transferpipette 20-200 µl	Brand, Wertheim
Pipette Transferpipette 8-Kanal, 20-200 µl	Brand, Wertheim
Pipetten 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetus accu	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Qualifreeze Cryo Einfriergerät	NALGENE® Labware, Neerijse, B
Reinluftwerkbank (Laminair 2472S / HBB 2448)	Heraeus, Hanau
Stickstofftank GT 75 l	Air Liquide, Düsseldorf
Tischautoklav, Modell DC2002	Biocare Medical, Concord, CA, USA
vakuumtrockner SpeedVac® SPD2010	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Wasserbad GFL 1083	GFL, Burgwedel
Zellzähler und Analysator Casy 1, Modell 1 TTC	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus Sepatech, Hanau
Zentrifuge Varifuge 3.2RS	Heraeus Sepatech, Hanau

II.1.7 Tumorzelllinien

Tabelle 9. Verwendete Tumorzelllinien.

Zelllinien der Tumorentität Kolon	Quelle	NCI Screen
DLD-1 Pseudodiploide Kolonkarzinomzellen männlicher Spender (epitheliales kolorektales Adenokarzinom Typ Dukes' C). DNA Fingerprinting Analysen deuten darauf hin, dass die beiden Zelllinien DLD-1 und HCT-15 von ein und demselben Spender stammen (Vermeulen et al. 1998). Verwendet wurden die Passagen 4-29.	ATCC	+
HCT-15 Quasidiploide Kolonkarzinomzellen männlicher Spender (epitheliales kolorektales Adenokarzinom Typ Dukes' C). DNA Fingerprinting Analysen deuten darauf hin, dass die beiden Zelllinien DLD-1 und HCT-15 von ein und demselben Spender stammen (Vermeulen et al. 1998). Verwendet wurden die Passagen 4-30.	ATCC	+
HCT-116 Diploide Kolonkarzinomzellen eines erwachsenen Spenders (Kolorektales Karzinom). Verwendet wurden die Passagen 7-32.	ATCC	+
HT29 Anoiploide Kolonkarzinomzellen einer 44 jährigen Spenderin (gut differenziertes Adenokarzinom Grad II) mit dem HLA-Profil: A1,3; B12,17; Cw5. Verwendet wurden die Passagen 132-159.	ATCC	+
KM12L4A Anoiploide Sublinie der schwach metastasierenden Zelllinie KM12C (ursprünglich isoliert aus einem primären, humanen Kolonkarzinom Typ Dukes' B2) (Morikawa et al. 1988). Verwendet wurden die Passagen 7-27.	NCI	-
KM20L2 Sublinie der Zelllinie KM20C (ursprünglich isoliert aus einem primären, humanen Kolonkarzinom Typ Dukes D). KM20L2 Zellen wurden als Abkömmlinge von HT29 Zellen beschrieben (Roschke et al. 2005). Verwendet wurden die Passagen 3-25.	NCI	+

WiDr		
Anoiploide Kolonkarzinomzellen einer weiblichen Spenderin (Kolorektales Adenokarzinom) mit dem HLA-Profil: A24,32; B15,18. WiDr Zellen wurden als Abkömmlinge von HT29 Zellen beschrieben (Chen et al. 1987). Verwendet wurden die Passagen 5-27.	ATCC	-

Zelllinien der Tumorentität Mamma	Quelle	NCI Screen
BT474	DSMZ	-
Hypertetraploide Zellen eines invasiven duktalen Mammakarzinoms einer 60-jährigen Spenderin. Verwendet wurden die Passagen 14-35.		
MCF-7	ATCC	+
Aneuploide Zellen aus epithelialem Adenokarzinom einer 69-jährigen Spenderin. Verwendet wurden die Passagen 28-52.		
T47D	ATCC	+
Hypotriploide Zellen aus duktalem Mammakarzinoms einer 54-jährigen Spenderin. Verwendet wurden die Passagen 18-36.		

Zelllinien der Tumorentität Lunge	Quelle	NCI Screen
A549	ATCC	+
Hypotriploide Zellen aus NSCLC (Non small cell lung cancer) Karzinom eines 58-jährigen Spenders. Verwendet wurden die Passagen 5-30.		
NCI-H460	ATCC	+
Hypotriploide Zellen aus NSCLC (Non small cell lung cancer) Karzinom männlicher Spender. Verwendet wurden die Passagen 4-30.		

ATCC American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

NCI National Cancer Institute, Frederick, MD, USA

II.1.8 Auswerte- und Analysesoftware

Tabelle 10. Verwendete Auswerte- und Analysesoftware.

Produkt	Hersteller
AxioVision 4.5	Zeiss, Jena
CellQuest/CellQuest Pro	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
GraphPad Prism 4	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Origin 7.5 SR4	OriginLab Corp., Northampton, MA, USA
Softmax Pro v5	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
ControlMate® for SeriaMate	Thermo Fisher Scientific, Wilmslow, UK

II.2 Methoden der Zellkultivierung

II.2.1 Monolayer-Kulturen

II.2.1.1 Einfrieren und Auftauen von Stammkulturen

Zur längerfristigen Lagerung wurden die Stammkulturen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Als Einfriermedium wurde FKS mit 10% DMSO, das als Gefrierschutzmittel bei der Kryokonservierung diente, verwendet. Eingefroren wurden Zellsuspensionen von Monolayerkulturen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Nach Einstellen der Zellkonzentration auf 10^6 /ml wurde je 1ml pro Kryoröhrchen, das auf Eis gelagert wurde, portioniert und mit Hilfe eines Qualifreeze Kryo-Einfriergerätes (Einfrierrate 1°C/min) bei -80°C eingefroren. Nach 12 h-24 h wurden die Röhrchen in einem Stickstofftank eingelagert.

Zum Auftauen wurden die Röhrchen für wenige Minuten in ein 37°C Wasserbad überführt. Um mögliche, DMSO-bedingte Schädigungen der Zellen zu vermeiden, wurde die angetaute Zellsuspension schnellstmöglich steril unter der Reinluftwerkbank in eine 250 ml-Kulturflasche (T 75) mit DMEM 10% FKS überführt. Abhängig vom Anwachsen der Zellen wurden diese für 4 h bis maximal 12 h unter Standardbedingungen (s. 2.1.2) inkubiert, anschließend wurde das Medium gewechselt.

II.2.1.2 Monolayer-Stammkultivierung

Die Zelllinien wurden in T 75 Zellkulturflaschen (effektive Wachstumsfläche: 75 cm²) unter Standardbedingungen (Wasserdampf-gesättigt, 37°C, 5% CO₂) kultiviert. Die Kultivierung (Transfer, Fütterung, etc.) der Zellen erfolgte ausschließlich steril unter der Reinluftwerkbank. Als „Standardmedium“ wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 1% Glukose (1,0 g/l), 1% Natriumpyruvat (1,0 g/l), 1% L-Glutamin (1,0 g/l) und 3,7% NaHCO₃ (3,7 g/l) verwendet. Diesem wurden routinemäßig 1% Penicillin (10000 U/ml), 1% Streptomycin (10 mg/ml) und 10% FKS zugesetzt. Ein Wechsel des Mediums erfolgte regelmäßig alle 3-4 Tage. Der Transfer aller in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien erfolgte durch milde enzymatische Dissoziation mit einer 0,05% Trypsin- und 0,02% EDTA (in PBS)-Lösung. Abhängig von ihrer Abstammung und ihrem Wachstum wurden die Zellen für 3-5 Minuten mit dieser Lösung inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit Standardmedium wurden die Zellen in ein Polypropylenröhrchen (50 ml) überführt und bei 450 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in 10 ml Standardmedium resuspendiert. Die Anzahl lebender Zellen und Zellvolumen wurden mit Hilfe des Zellanalyzers Casy 1 erfasst. Stammkulturen wurden, abhängig von der Zelllinie, alle 3-5 Tage passagiert, indem 1×10^6 Zellen in neue T 75 Zellkulturflaschen ausgesät wurden.

Tabelle 11. Ermittelte Verdopplungszeiten der in dieser Arbeit verwendeten Tumorzelllinien in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 1% Penicillin, 1% Streptomycin und 10% FKS.

Zelllinie	Verdopplungszeit
DLD-1	24,3h
HCT-15	23,5h
HCT-116	19,8h
HT29	24,1h
KM12L4A	30,3h
KM20L2	29,3h
WiDr	35,8h
T47D	48,4h
BT474	67,7h
MCF-7	28,6h
A549	18,2h
NCI-H460	21,0h

II.2.1.3 Kultivierung in 96-Well-Mikrotiterplatten

Nach Dissoziation der Stammkulturen (s. 2.1.2) wurden die vereinzelten Zellen mit Standardmedium auf eine Konzentration von 3000 Zellen/ml verdünnt und in 96-Well Zellkulturplatten (Microtest™ Flachboden, BD) ausgesät. Dabei wurden für alle Zelllinien 200 µl Zellsuspension je Well ausgesät, was einer Zellkonzentration von 600 Zellen/Well entspricht. Nach einem Anfangsintervall von 96h unter Standardbedingungen wurden 50% des Überstandes durch frisches Standardmedium ersetzt. Mit Ausnahme der Behandlung (siehe II.4) wurde anschließend alle 48h 100 µl Überstand ersetzt.

II.2.2 Sphäroid-Kulturen in „Liquid-Overlay“-Technik

II.2.2.1 Aussaat und Kulturbedingungen

Sphäroide wurden mit Hilfe der „Liquid-Overlay“-Technik (Carlsson et al. 1984; Kunz-Schughart et al. 2000b) kultiviert. Dafür wurden 96-Well Platten mit 1,5%iger Agarose beschichtet. Für die Beschichtung der Mikrotiterplatten wurde ein Gemisch aus 0,15 g Agarose pro 10 ml DMEM (1,5% (w/v)) in geeigneten Bechergläsern für 20 Minuten bei 120°C und 2 bar Überdruck autoklaviert. Nach Abkühlen des Autoklaven auf ca. 90°C wurden die Bechergläser unter eine Reinluftwerkbank überführt. Um ein rasches Abkühlen, und damit eine verfrühte Verfestigung der Agarose zu verhindern, wurden die Bechergläser in einem Wasserbad auf einer Heizplatte bei ca. 60°C temperiert. Je Well einer 96-Well Mikrotiterplatte wur-

den 50 µl flüssiger Agarose steril zugegeben. Die Agarose war nach 20 Minuten bei geöffnetem Deckel unter der Sterilwerkbank ausgehärtet, und die Platten wurden luftdicht verpackt. Die so beschichteten und verpackten Platten konnten bei Raumtemperatur bis zu 10 Tage nach dem Ausgießen gelagert werden.

Zur Aussaat der Sphäroid-Kulturen wurden dissoziierte Zellen der Stammkulturen mit Standardmedium auf definierte Konzentrationen verdünnt (s. Tabelle 12). Diese richteten sich nach Vorgaben aus unabhängigen Voruntersuchungen, über welche die optimale Zellzahl zur Aussaat ermittelt wurde, um eine mittlere Sphäroidgröße von 370-400 µm nach 4 Tagen Initiationsphase zu erreichen.

Tabelle 12. Zellkonzentration der in dieser Arbeit verwendeten Tumorzelllinien bei der Aussaat von Sphäroid-Kulturen im „Liquid-Overlay“-Verfahren.

Zelllinie	Konzentration	Zellen/well
DLD-1	20000 Zellen/ml	4000
HCT-15	20000 Zellen/ml	4000
HCT-116	3750 Zellen/ml	750
HT29	7500 Zellen/ml	1500
KM12L4A	2500 Zellen/ml	500
KM20L2	2500 Zellen/ml	500
WiDr	10000 Zellen/ml	2000
T47D	10000 Zellen/ml	2000
BT474	15000 Zellen/ml	3000
MCF-7	7500 Zellen/ml	1500
A549	7500 Zellen/ml	1500
NCI-H460	2500 Zellen/ml	500

Mit Hilfe einer 8-Kanal-Pipette wurden anschließend 200 µl pro Well der Agarosebeschichteten Platten pipettiert. Die befüllten Platten wurden bis zur gewünschten Sphäroidgröße (380-400 µm) für 4 Tage unter Standardbedingungen inkubiert. Nach 96 h wurden 50% des Überstandes durch frisches Standardmedium ersetzt. Mit Ausnahme der Behandlung (siehe II.4) wurde anschließend alle 48 h 100 µl Überstand durch frisches Medium ersetzt, um eine ausreichende Versorgung der Kulturen zu erreichen.

II.2.2.2 Teilautomatisierung der Sphäroid-Kultivierung

Grundlage für einen möglichen Einsatz von Sphäroiden im High-Throughput-Verfahren ist eine (Teil-)Automatisierung der Sphäroidkultivierung. Mit Hilfe des *SerialMate®* Automated Multichannel Pipetting System (Thermo Fisher Scientific) konnte die Aussaat der Sphäroide, die Zugabe frischen Mediums zu den 96-Well-Platten und die Wirkstoffbehandlung der Sphäroide (siehe II.4) teilautomatisiert werden. Der Einsatz des *SerialMate®* Automated Multi-channel Pipetting Systems wird in Kapitel III.1.2 detailliert beschrieben.

II.3 Methoden der Sphäroidanalytik

II.3.1 Teilautomatisierte Bestimmung von Sphäroiddurchmesser und -volumen

Phasenkontrastaufnahmen von Sphäroid-Kulturen in 96-Well-Platten wurden manuell mit Hilfe eines Axiovert 200 Inversmikroskops (Zeiss), ausgerüstet mit einer AxioCam MRc Kamera, oder automatisch mit Hilfe eines Aviovert 200M Inversmikroskops (Zeiss), ausgerüstet mit einer AxioCam MRM Kamera, aufgenommen (Objektive 2,5x, 5x oder 10x). Sphäroiddurchmesser und -volumen wurden mittels spezifischer Module der AxioVision 4.5 Software (Zeiss) an diesen Bildern bestimmt. Der Ablauf der teilautomatisierten Bildaufnahme und -auswertung wird in III.2 detailliert beschrieben.

II.3.1.1 Beschreibung des Sphäroidvolumenwachstums mit Hilfe des Gompertz Modells

Im Allgemeinen kann die Wachstumskinetik von MCTS mit der von Tumoren *in vivo* verglichen werden: so folgt einer kurzen exponentiellen Wachstumsphase zu Beginn eine kontinuierliche Wachstumsretardierung mit einer lang andauernden Phase asymptotischen Wachstums. Dieses Wachstumsverhalten wurde bereits 1966 von Laird und Kollegen mit dem Gompertz Modell beschrieben (LAIRD 1964). Demicheli und Bajzer konnten später zeigen, dass dieses Modell auch für das Volumenwachstum von Sphäroiden MCTS gültig ist (Bajzer et al. 1987; Demicheli et al. 1989). Um die Wachstumskinetik von Sphäroid-Kulturen zu berechnen kann folgende Gleichung nach Gompertz angewandt werden:

$$V(t) = V(0) \times \exp^{a/\beta \times (1 - \exp^{-\beta t})}$$

$V(t)$: Sphäroidvolumen zum Zeitpunkt t
 $V(0)$: Sphäroidvolumen zu Beginn der Untersuchung
 α : initiale Wachstumsrate
 β : Verzögerungsfaktor

II.3.2 Sphäroiddissoziation und Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen in Sphäroiden definierter Größe (400 µm-1100 µm) wurden die Sphäroide dissoziiert und Einzelzellsuspensionen mittels des elektronischen Zellzählgerätes Casy 1 TTC (Schärfe System) gemessen. Für die Dissoziation wurden je nach Zelllinie und Sphäroidgröße 20 bis 25 Sphäroide manuell mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein Polypropylenrörchen (15 ml) überführt. Nach Absaugen des Überstandes wurden die gesammelten Sphäroide mit 2 ml PBS gewaschen. Nach erneuter Abnahme des Überstandes wurden 500 µl 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA in PBS zugegeben, und die Sphäroide wurden für 3 Minuten bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Um eine vollständige Dissoziation der Zellaggregate zu gewährleisten, wurden die Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit einer Eppendorf pipette (blaue Spitze, 200-1000 µl) vereinzelt. Die Neutralisation der Trypsinlösung erfolgte durch Zugabe von 500 µl Standardmedium. Entsprechend der zu erwartenden Zellzahl wurde die Zellsuspension 1:1 bis 1:100 in Casy®ton verdünnt. Vor Bestimmung der Zellzahl am Casy 1 TTC wurden die Verdünnungskoeffizienten eingestellt und die Zelllösungen gut durchmischt. Das Messergebnis wurde als Mittelwert einer dreifach Messung mit jeweils 300 µl Messvolumen ausgegeben. Mit Hilfe dieses Messwertes konnte auf die Zellzahl eines einzelnen Sphäroids rückgerechnet werden.

II.3.3 Sphäroidhistologie

Zur histologischen Darstellung der MCTS wurde eine herkömmliche Hämatoxilyn-Ge genfärbung nach Harris durchgeführt (siehe Anhang 1). Dazu wurden Sphäroid-Kulturen mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein Polypropylenrörchen (15 ml) überführt und mit 2 ml PBS gewaschen. Darauf folgte ein zweiter Waschschritt mit 5 ml Formalin-Lösung (10% Formafix in PBS) für 30 Minuten. Durch Zugabe von 20 µl einer Hämatoxylin-Lösung (Merck) und anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten wurden die Sphäroide zur leichteren Verarbeitung angefärbt. Nach einem dritten Waschschritt mit 2 ml Formalin-Lösung (10% Formafix in PBS) wurden die MCTS in Filterpapier und Einbettkassetten für 48 h in einem Formalinbad (10% Formafix in PBS) inkubiert. Nun erfolgte die Einbettung in flüssiges Paraffin (60°C) mit Hilfe eines Hypercenter XP Enclosed Tissue Processors (Shandon). Anschließend wurden die Sphäroide an einem Histocentre 2 (Shandon) in Blöcke ausgegossen, um das Schneiden am Mikrotom HM 350 (Microm) zu ermöglichen. Die Dicke eines Einzelschnittes betrug 5-6 µm, jeweils ein Serienschnitt wurde auf einen mit Millipore benetzten Klarsichtobjektträger aufgezogen. Abschließend wurden die Objektträger für 3 h auf einer Wärmeplatte bei 37°C getrocknet.

Zur Färbung wurden die Objektträger nun für 60 Sekunden in eine Hämatoxylin-Lösung (Merck) getaucht. Im Anschluss daran wurden die Proben mit heißem Leitungswasser für 5 Minuten gebläut. Darauf wurden sie 15 Sekunden in eine Eosin-Lösung (Merck) getaucht, in

einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (2x2 Minuten 70% Ethanol, 2x2 Minuten 96% Ethanol, 2x4 Minuten 100% Propanol) und schließlich 2x4 Minuten in Xylol (Merck) inkubiert. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit Hilfe eines Axiovert 200 Inversmikroskops (Zeiss).

II.3.4 Auswachsen von Sphäroiden in 96-Well Mikrotiterplatten

II.3.4.1 Beschichtung mit Kollagen Typ I

Experimente zum Auswachsen von Sphäroiden sollten dazu beitragen, die Adhärenz- und Migrationsfähigkeit von Zellen in dreidimensionalen Zellverbänden darzustellen. Getestet wurden eigenbeschichtete Flach- und Rundbodenplatten, sowie BD BioCoat™ Kollagen I Mikrowellplatten (Becton Dickinson). Die Eigenbeschichtung erfolgte durch die sterile Zugabe von 5 µg/cm² Kollagen Typ 1 (Calbiochem) in 0,02 N Essigsäure in unbeschichtete Flach- bzw. Rundbodenplatten. Nach einer Einwirkzeit von 1h wurde jedes Well mit PBS gespült und die Platten bei Raumtemperatur getrocknet. Die Platten konnten bei luftdichter Verpackung und einer Lagerung bei 4°C mehrere Wochen verwendet werden. Als Kontrolle kamen unbeschichtete 96-Well Mikrotiterplatten zum Einsatz. Beobachtet wurde das Auswachsen von Zellen aus Sphäroiden mit einem Durchmesser von 380-400 µm nach 4 Tagen und nach 7 Tagen. Dazu wurden Sphäroide im „Liquid Overlay“ – Verfahren (siehe II.2.2.1) für 4 Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Nach diesem Initiationsintervall wurden die MCTS mit Hilfe einer 8-Kanal-Pipette in einem Volumen von 200 µl auf die Kollagen I beschichteten Platten transferiert und unter Standardbedingungen inkubiert. Die Aufnahme ausgewachsener Sphäroide erfolgte mit Hilfe eines Axiovert 200 Inversmikroskops (Zeiss).

II.3.4.2 Hemmung der Proliferation in Sphäroiden mittels Mitomycin C

Bislang konnte nicht geklärt werden, ob das Auswachsen von Zellen aus einem MCTS auf dem Prinzip der Proliferation oder der Migration beruht. Darum sollte in Sphäroiden der Zelllinie HT29 die Proliferation mittels Mitomycin C (Sigma-Aldrich) gehemmt werden. Eine zytotoxische Wirkung des Mitomycin C (Abbildung 5) auf MCTS konnte nach einer Zellvitalitätsbestimmung mittels Acid Phosphatase (APH) Assay (siehe II.5) ausgeschlossen werden.

Demzufolge wurden Sphäroide im „Liquid Overlay“-Verfahren (siehe II.2.2.1) für 4 Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Nach diesem Initiationsintervall wurden 100 µl Überstand abgenommen und durch 100 µl Mitomycin (20 µg/ml in PBS) ersetzt (Endkonzentration im Well: 10 mg/ml Mitomycin C). Als Kontrollen dienten Sphäroide, denen neues Standardmedium zugesetzt wurde. Nach zweistündiger Inkubation unter Standardbedingungen wurden alle Sphäroide 3x10 Minuten mit Standardmedium gewaschen und mit Hilfe einer 8-Kanal-Pipette in einem Volumen von 200 µl auf Kollagen Typ I eigenbeschichtete Rundbodenplatten transferiert. Diese wurden unter Standardbedingungen inkubiert. 0 h, 8 h und 24 h nach

dem Umsetzen wurde das Auswachsverhalten der Zellen dokumentiert. Die Aufnahme ausgewachsener Sphäroide erfolgte mit Hilfe eines Aviovert 200 Inversmikroskops (Zeiss), die Auswachsfläche wurde manuell mittels AxioVision 4.5 Software (Zeiss) bestimmt. Zudem wurde nachträglich die Proliferations-hemmende Wirkung des Mitomycin C mittels Anti-BrdU- und Ki67-Färbung getestet.

II.3.4.2.1 Anti-BrdU-Färbung

Die Proliferationsuntersuchungen mit Hilfe der Durchflußzytometrie beruhen auf dem Einbau des synthetischen Thymidin-Analogons Bromodeoxyuridin (BrdU) in die DNA während der DNA-Replikation, wobei Zellen einem kurzzeitigen BrdU-Puls ausgesetzt sind. Der Nachweis dieser Substitution erfolgt dann über eine immunologische Antikörperfärbung (siehe Anhang 2) (Brockhoff 2007).

Zunächst wurden Sphäroid-Kulturen angezüchtet, nach dem standardmäßigen Initiationsintervall von 4 Tagen wurden sie für 2 h mit Mitomycin C behandelt und anschließend 3x10 Minuten mit 200 µl Standardmedium gewaschen (siehe II.3.4.2). Nach Abnahme von 100 µl Überstand erfolgte die simultane Zugabe von 20 µmol/l BrdU und 10 µmol/l Desoxycytidin (dC) in 100 µl Standardmedium mit anschließender 30-minütiger Inkubation unter Standardbedingungen. Um BrdU nahezu vollständig zu entfernen wurden die MCTS-Kulturen 3x mit Standardmedium gewaschen und für 8 h unter Standardbedingungen inkubiert. Da eine gleichmäßige Fixierung der Zellen im 3-D Verbund eines MCTS nicht gewährleistet werden kann, wurden die Sphäroide in 15 ml Polypropylenrörchen gesammelt und dissoziiert (siehe II.3.2). Die Fixierung der entstandenen Einzelzellsuspension erfolgte in 2 ml eiskaltem, 70%igem Methanol. In diesem Stadium können die Zellen bei 4°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet werden.

Zur Färbung wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Für den RNA-Verdau wurde 1 mg/ml Ribonuclease A zugegeben und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 450 x g wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in PBS, 0,01 N HCl und 5 mg/ml Pepsin resuspendiert und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von eiskaltem PBS gestoppt, anschließend wurden die Zellen in PBS gewaschen. Die DNA-Denaturierung erfolgt mit 2 N HCl (in PBS) für 10 Minuten bei 37°C. Die Zellen wurden erneut gründlich mit PBS gewaschen und befanden sich somit wieder in einer Umgebung mit neutralem pH-Wert. Darauf wurden für 30 Minuten 10 µg/ml des Anti-BrdU-Antikörpers (Dako, Verdünnungsfaktor des Stammantikörpers = 1:50) zugegeben. Nach einem Waschschritt mit PBS wurde den Zellen für 30 Minuten 20 µg/ml „Rabbit-anti-Mouse“-FITC Sekundärantikörper (Dako, Verdünnungsfaktor des Stammantikörpers = 1:20) zugesetzt, anschließend wurde erneut gewaschen und dann 2,5 µg/ml Propidiumiodid (Verdünnungsfaktor des Stammlösung = 1:400) zugegeben. Danach konnte die Einbaurate von

BrdU in die DNA, als Maß für die Fähigkeit zur Proliferation, am Durchflusszytometer bestimmt werden.

II.3.4.2.2 Ki-67-Färbung

Anfang der achtziger Jahre generierten Gerdes et al. erstmals einen monoklonalen Antikörper, der gegen ein Antigen gerichtet war, welches dann als Ki-67 Antigen bezeichnet wurde. Erst einige Jahre später konnte dieses Antigen als Protein (pKi-67) identifiziert werden (Gerdes et al. 1991). Auffällig war das charakteristische Färbeverhalten des Ki-67 Antikörpers, das auf die Anwesenheit des Ki-67 Antigens ausschließlich in Kernen proliferierender Zellen (sowohl in „normalen“ Zellen, als auch in Tumorzellen) zurückgeführt werden konnte. Daher eignet sich das Ki-67-Antigen hervorragend als Marker, um die Wachstumsfraktion einer Zellpopulation zu bestimmen (Scholzen et al. 2000). Zur Durchführung der Proliferationsanalyse wurden MCTS-Serienschnittpräparate einer Doppelfärbung mit Ki-67 Antikörper (Klon: MIB-1) und Hämatoxylin unterzogen (siehe Anhang 3). Vor der Färbung wurden die Schnitte wie folgt entparaffinisiert: 2x5 Minuten in Xylol (Merck) inkubieren, danach mit einer absteigenden Alkoholreihe behandeln (2x3 Minuten 100% Propanol, 2x3 Minuten 95% Ethanol, 2x3 Minuten 80% Ethanol). Nach 10-maligem Eintauchen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte in Waschlösung (Ventana) aufbewahrt und anschließend in das NexES® IHC System geladen. Zur Visualisierung des Primärantikörpers wurde der Ventana Medical Systems Basic DAB Detection Kit verwendet. Die Hämatoxylin-Gegenfärbung diente der Anfärbung Ki-67 negativer Zellkerne. Um die eventuell noch vorhandene Aktivität gewebe-eigener Peroxidase zu hemmen, wurden entsprechend dem automatisierten Protokoll für das NexES® IHC System jedem Schnitt 100 µl Inhibitorlösung zugegeben (4 Minuten bei 37°C). Per Hand wurden dann 100 µl Ki-67-Antikörperlösung (Verdünnungsfaktor des Stammlösung = 1:20) auf die Objektträger pipettiert (24 Minuten bei 37°C). Anschließend erfolgte die Inkubation mit 100 µl des biotinylierten Sekundärantikörpers (8 Minuten bei 37°C), danach folgte die Inkubation mit 100 µl Avidin-HRPO-Konjugat (8 Minuten bei 37°C). Die Zugabe von 100 µl DAB-Lösung erfolgte zeitgleich mit der Zugabe von 100 µl Wasserstoffperoxidlösung. Beide Lösungen wurden über 8 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Signalverstärkung wurden die Schnitte noch mit 100 µl Kupfersulfatlösung (4 Minuten bei 37°C) behandelt bevor abschließend die Gegenfärbung mit Hämatoxylin (4 Minuten bei 37°C) erfolgte. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Proben mit Waschlösung (Ventana) gewaschen. Die Aufnahme gefärbter Schnittpräparate erfolgte mit Hilfe des Axiovert 200 Inversmikroskops (Zeiss).

II.4 Behandlung von Monolayer- und Sphäroid-Kulturen

Zur Behandlung von Monolayer- und Sphäroid-Kulturen wurden diese entsprechend II.2.1.3 bzw. im „Liquid Overlay“-Verfahren (siehe II.2.2.1) ausgesät und für 4 Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Nach diesem Initiationsintervall wurden 50% des Überstandes (100 µl) abgenommen und durch Triton X-100 bzw. Wirkstofflösung ersetzt.

II.4.1 Triton X-100

Nach Zugabe von 100 µl einer 20%-igen Triton X-100 Lösung (verdünnt in PBS, Endkonzentration im Well: 10% Triton X-100) wurden die Zellkulturen für mindestens 2 h unter Standardbedingungen inkubiert. Diese Proben dienten als Totzellkontrollen, d.h. es sollte der Messwert „100% Nekrose“ simuliert werden.

II.4.2 Wirkstoffe

Zur Behandlung von Monolayer- und Sphäroid-Kulturen wurden alle Wirkstoffe abgewogen und in 100% Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck) gelöst. Anschließend wurden Stammlösungen aller Wirkstoffe (Konzentration: 100 mM) bei -20°C eingefroren und gelagert. Bei Bedarf wurden die Stammlösungen aufgetaut, in Standardmedium entsprechend verdünnt und sofort eingesetzt. Grundsätzlich sollte die Wirkstoffbehandlung in einem Konzentrationsbereich von 0,1 - 200 µM erfolgen. Aufgrund persönlicher Mitteilungen des Lehrstuhls für Pharmakologie der Universität Regensburg, die darauf hinweisen, dass selbst eine Wirkstoffkonzentration von 200 µM weder in Geweben eines Tiermodells, noch im Patienten erreicht werden kann, wurde in dieser Arbeit auf Testungen mit einer maximalen Wirkstoffkonzentration > 200 µM verzichtet.

Nach Zugabe von 100 µl jeder Wirkstoffverdünnung zu den in den Wells verbliebenen 100 µl Standardmedium wurden die Zellkulturen für 72 h unter Standardbedingungen inkubiert. Dabei war zu beachten, dass die Wirkstoffverdünnungen bei der Zugabe zu den Zellen nochmals im Verhältnis 1:1 verdünnt wurden. Parallel dazu wurden unbehandelte Monolayerzellen und Sphäroide immer als Referenz kultiviert. Hierbei waren den Kulturen 100 µl Standardmedium mit einer DMSO-Konzentration entsprechend der höchsten Wirkstoffkonzentration zugegeben. Kontrollversuche mit 0,01% - 2% DMSO in Standardmedium zeigten, dass eine Endkonzentration an DMSO bei Wirkstoffbehandlung mit maximal 200 µM (~ 0,2% DMSO) Zellwachstum und Vitalität nicht beeinflusst. Um eine gleichmäßiges Inkubation der einzelnen Zellkulturen zu gewährleisten, wurden unbehandelte Wells am Rand einer 96-Well-Platte während des 72-stündigen Behandlungsintervalls mit 200 µl Standardmedium befüllt. Abbildung 4 zeigt das routinemäßige Behandlungsschema der in dieser Arbeit durchgeführten Wirkstofftestungen.

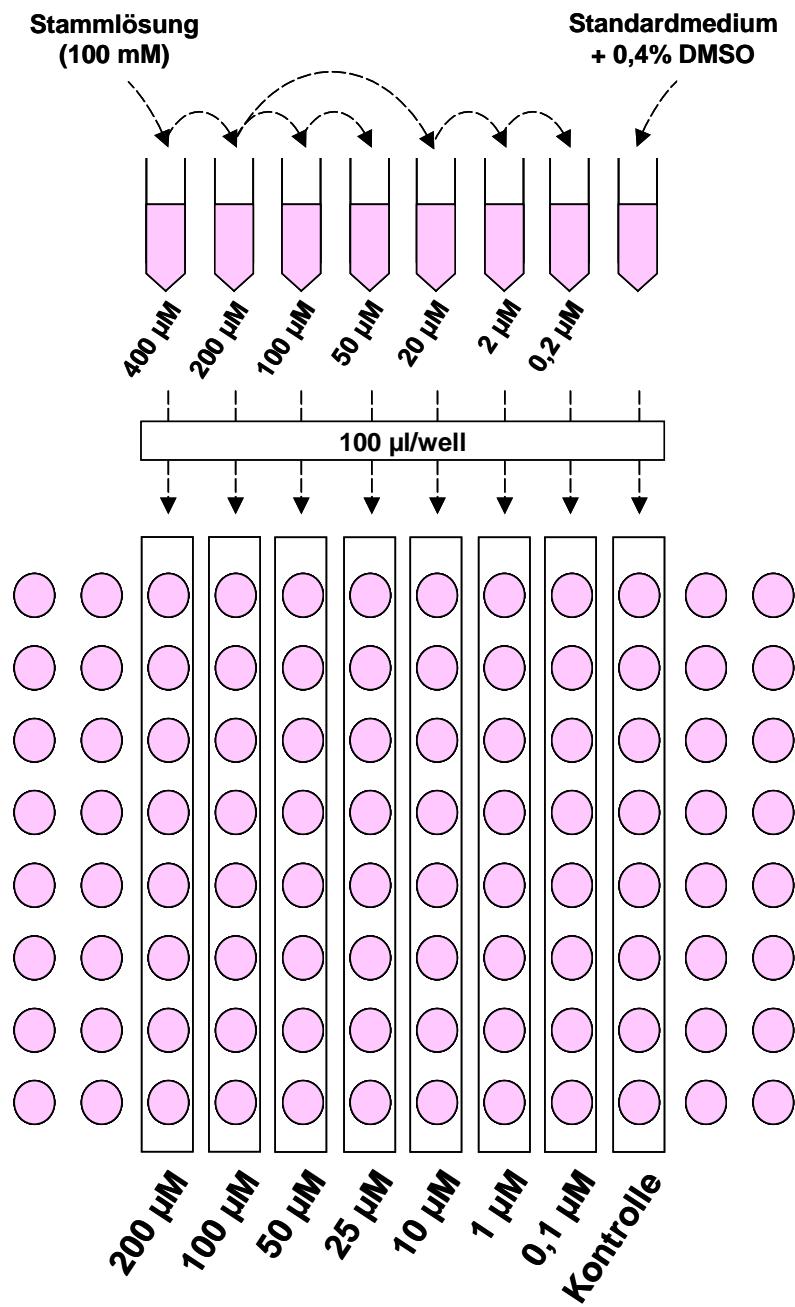
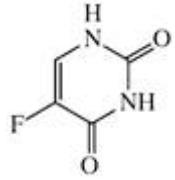
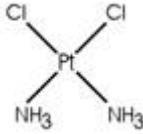
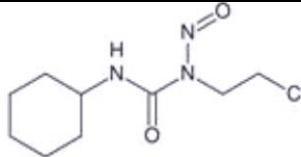
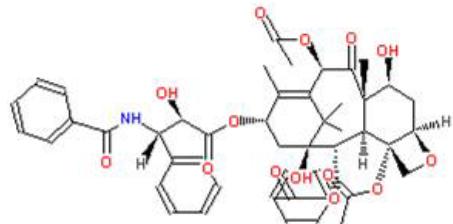
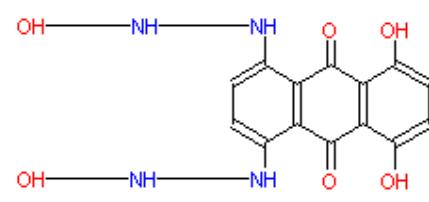
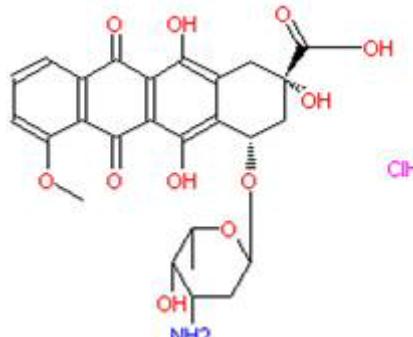
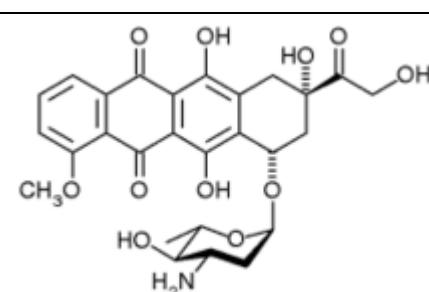
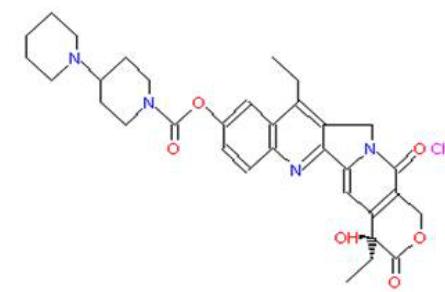
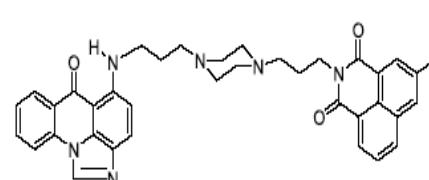
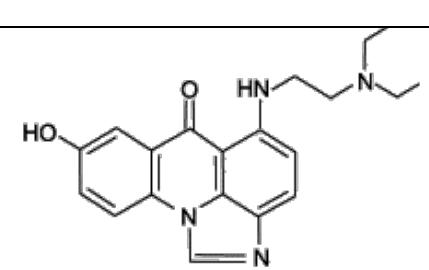


Abbildung 4. Schematische Darstellung einer Wirkstoffbehandlung von Monolayer- bzw. Sphäroid-Kulturen im 96-Well-Format. Die Zellkulturen wurden entsprechend II.2.1.3 bzw. II.2.2.1 ausgesät und für 4 Tage kultiviert. Nach Abnahme von 100 μ l Überstand je Well erfolgte die Wirkstoffbehandlung. Dabei wurden 100 μ l jeder Wirkstoffverdünnung zu den in den Wells verbliebenen 100 μ l Standardmedium zugegeben. Die Abbildung zeigt ein Behandlungsschema im Konzentrationsbereich von 0,1 - 200 μ M. Als Kontrollen dienten Kulturen, denen 100 μ l Standardmedium mit 0,4% DMSO zugegeben waren.

Tabelle 13 zeigt die Wirkstoffe, die nach oben genanntem Schema auf anti-tumoraler Effekte in Monolayer- und Sphäroid-Kulturen hin untersucht wurden. Ausführliche Informationen zum klinischen Einsatz dieser Wirkstoffe finden sich im Anhang (siehe Anhang 5).

Tabelle 13. Wirkmechanismen und Strukturformeln für alle in dieser Arbeit verwendeten Wirkstoffe (Quelle: "Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie", Urban & Fischer Verlag, 9.Auflage, 2004).

Wirkstoff	Stoffgruppe	Wirkmechanismus	Struktur
5-Fluorouracil	Pyrimidin-analoga	- DNA/RNA Anti-metabolit - Hemmung der Thymidylat-Synthase	
Cyclophosphamid	Stickstoff-Lost-Verbindungen		
Carboplatin	Platin-Verbindungen	<ul style="list-style-type: none"> - Alkylierende Substanzen - DNA-Quervernetzung 	
Cisplatin			
CCNU/ Lomustin	Nitrosoharnstoff-Verbindungen		
Paclitaxel	Taxane	<ul style="list-style-type: none"> - Mitosegift - Mikrotubuli-Inhibitor 	
Mitoxantron	Actinomycine	<ul style="list-style-type: none"> - Interkalation in DNA/RNA - DNA/RNA-Strangbrüche 	

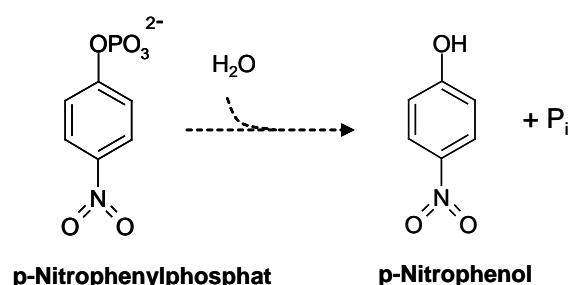
Doxorubicin	Anthracycline	<ul style="list-style-type: none"> - Topoisomerase-II-Inhibitoren - Radikalbildung 	
Epidoxorubicin	Anthracycline (teilsynthetisch)		
Irinotecan	Chinolin-Alkaloide	<ul style="list-style-type: none"> - Topoisomerase-I-Inhibitor 	
WMC-79	Bisimidazoacridinone	<ul style="list-style-type: none"> - Topoisomerase-I-Inhibitor 	
C-1311	Imidazoacridinone	<ul style="list-style-type: none"> - FLT3 Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor 	

II.5 Acid Phosphatase (APH) Assay zur Bestimmung der Zytotoxizität/Zellvitalität

II.5.1 Theoretische Grundlagen

Die saure Phosphatase (Acid Phosphatase, APH) ist eine der sauren Hydrolasen, die sich in der Regel in den Lysosomen befinden. Entdeckt wurde die saure Phosphatase in der Prostata, inzwischen konnte sie auch in anderen Geweben (Niere, Leber, etc.) nachgewiesen werden. Ursprünglich wurde der APH Assay für einen Einsatz an Monolayerkulturen entwickelt. Das Prinzip des APH Assays beruht auf der Quantifizierung zytosolischer Enzymaktivität in den zu untersuchenden Zellen. Intrazelluläre saure Phosphatase katalysiert den Umsatz eines exogen zugegebenen Substrates. Hierbei handelt es sich um *p*-Nitrophenylphosphat (PNPP), das frei in lebende Zellen diffundiert und dort zu *p*-Nitrophenol umgebaut wird. Nach Zugabe von Natronlauge (NaOH) wird *p*-Nitrophenol zu *p*-Nitrophenolat hydrolysiert (siehe Abbildung 5). *p*-Nitrophenolat absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm, was mit Hilfe eines Mikrotiterplattenlesegerätes (z.B. Emax® Precision Microplate Reader) gemessen werden kann. Im Bereich von 1000 bis 100.000 Monolayerzellen ist die Absorption direkt proportional zur Zellzahl (Yang et al. 1996), d.h. je weniger lebende Zellen im Testsystem, desto geringer das APH Signal (Absorption bei 405 nm).

1. Phosphatase - Reaktion



2. Farbreaktion (nach Zufuhr von NaOH)

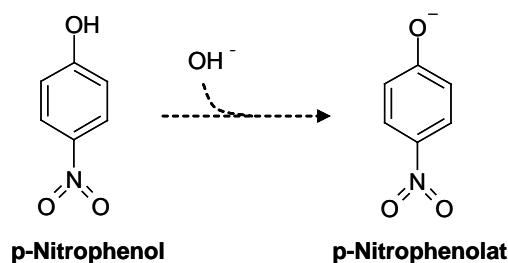


Abbildung 5. Prinzip des Acid Phosphatase (APH) Assays. APH katalysiert den Umsatz von *p*-Nitrophenylphosphat (PNPP) in *p*-Nitrophenol. Durch Zugabe von NaOH wird dieses zu *p*-Nitrophenolat hydrolysiert.

II.5.2 Durchführung an Monolayer-Kulturen

Der Einsatz des APH Assays erfolgte an Monolayer-Kulturen, die mit Triton X-100 (siehe II.4.1) bzw. verschiedenen Wirkstoffen (siehe II.4.2) behandelt wurden. Nach entsprechender Inkubationszeit (d.h. 2 h bei einer Behandlung mit Triton X-100- bzw. 72h bei einer Wirkstoffbehandlung) wurde der Überstand abgenommen, und die Kulturen mit 200 µl PBS je Well gewaschen. Daraufhin wurden je Well 100 µl frisches PBS zugegeben. Für jeden APH Assay war das PNPP-Substrat frisch in Assaypuffer (0,1M Natriumacetat (3M Stammlösung, pH 5,2) und 0,1% Triton X-100 in destilliertem Wasser) zu lösen. Zur Herstellung der Substratlösung (finaler pH 4,8) wurden 2 mg/ml PNPP gelöst. Davon wurden je Well 100 µl zugegeben und unter Standardbedingungen für 90 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl einer 1 N NaOH erfolgte die Absorptionsmessung bei 405 nm am Emax® Precision Microplate Reader. Zur Bestimmung des Hintergrundsignals dienten Wells, die nur mit 100 µl PBS, 100 µl gelöstes PNPP und 10 µl NaOH beladen waren.

II.5.3 Durchführung an Sphäroid-Kulturen

Für den Einsatz an Sphäroid-Kulturen musste der APH Assay modifiziert werden. MCTS wurden im „Liquid-Overlay“-Verfahren (siehe II.2.2.1) kultiviert und anschließend mit Triton X-100 bzw. verschiedenen Wirkstoffen behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei einer Behandlung mit Triton X-100- bzw. 72 h bei einer Wirkstoffbehandlung wurden die Sphäroide mit einer 8-Kanal-Pipette mitsamt des umgebenden Mediums in 96-Well-Flachbodenplatten überführt (1 Well→ 1 Well). Um Sphäroide, Zellverbände und Einzelzellen am Plattenboden zu sammeln, wurden die unbeschichteten Flachbodenplatten für 10 Minuten bei 400 x g in einer Heraeus Sepatech Varifuge 3.2RS zentrifugiert. Das Sphäroid-/Zellpellet wurde vorsichtig gewaschen, indem 160 µl Überstand durch PBS ersetzt wurden. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand durch entsprechende Abnahme auf ein Endvolumen von 100 µl je Well eingestellt. Je Well wurden nun 100 µl der PNPP-Substratlösung (siehe II.5.2) zugegeben und unter Standardbedingungen für 90 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl einer 1 N NaOH erfolgte die Absorptionsmessung bei 405 nm am Emax® Precision Microplate Reader. Zur Bestimmung des Hintergrundsignals dienten Wells, die mit 100 µl PBS, 100 µl gelöstes PNPP und 10 µl NaOH beladen waren.

II.6 Genexpressionsmonitoring (HITSSM)

Für diesen Teil der Arbeit konnte auf die von Avalon Pharmaceuticals Inc. erarbeiteten Richtlinien für die Qualitätsanforderungen (Menge, Reinheit, Isolationsprotokolle) zur Expressionsanalyse in Sphäroiden unter Einsatz verschiedener RNA Präparationsprotokolle zurückgegriffen werden. Darauf aufbauend wurden Affymetrix Gene Chips kombiniert mit dem genannten komplexen Expressionsmonitoring eingesetzt, um Veränderungen in der RNA-

Expression in HT29 Monolayer- und Sphäroid-Kulturen unter Einsatz der Wirkstoffe 5-Fluorouracil und WMC-79 darzustellen. Weiterhin sollten die Expressionsmuster der Zelllinien HCT-116, KM12L4A, T47D, BT474, MCF-7, A549 und NCI-H460 in Monolayer- und Sphäroid-Kultur analysiert und verglichen werden.

II.6.1 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation aus Monolayer- und Sphäroid-Kulturen wurden diese laut II.2.1.3 bzw. im „Liquid Overlay“-Verfahren (siehe II.2.2.1) ausgesät und für 4 Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Je nach Bedarf wurden die Zellen dann behandelt (siehe II.4) bzw. bis zur gewünschten Größe/Konfluenz weiterkultiviert, und anschließend für die RNA-Isolation lysiert.

II.6.1.1 RNA-Isolation bei Monolayer-Kulturen

Vor Isolation der RNA mussten die Zellen lysiert werden. Diese erfolgte unter einem Abzug, wobei die Zellen auf Eis gelagert wurden. Nach Absaugen des kompletten Überstandes wurden je Well 100 µl TRIzol (Invitrogen) zugegeben und das Zelllysat mit Hilfe einer Pipette gut durchmischt. Es wurden immer jeweils 8 Wells in ein Well einer 96-Deep-Well-Platte (Corning Costar[®]) überführt (Endvolumen 800 µl). Die Proben konnten nun bei -80°C gelagert werden. Zur Weiterverarbeitung wurden je 150 µl Chloroform pro 800 µl im Deep-Well zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur und 5600 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Deep-Well überführt. Bei einem Volumen von 800 µl TRIzol werden ca. 450 µl wässrige Phase erwartet. Dem neuen Reaktionsgefäß wurden 200 µl 70% Ethanol (wässrige Phase:Ethanol 2:1) zugegeben, das Gemisch wurde dann gut durchmischt. Nach Transfer der Proben in RNeasy Reaktionsgefäß wurde nach dem „RNeasy Protokoll für die Isolation der Totalen RNA aus tierischen Zellen“ (Vakuum/Spin Verfahren) von Qiagen verfahren.

II.6.1.2 RNA-Isolation bei Sphäroid-Kulturen

Vor Isolation der RNA aus Sphäroid-Kulturen mussten diese gesammelt werden. Hierzu wurden immer 8 Sphäroide in einem Volumen von je 150 µl in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt (Endvolumen 1200 µl). Es folgte eine Zentrifugation für 2 Minuten bei Raumtemperatur und 10000 x g (Heraeus Biofuge pico). Die weiteren Schritte erfolgten unter einem Abzug, die Zellen wurden dabei auf Eis gelagert. Nach Absaugen des kompletten Überstandes wurden je Reaktionsgefäß 800 µl TRIzol (Invitrogen) zugegeben und das Zelllysat mit Hilfe einer Pipette sehr gut durchmischt, bis keine Sphäroidreste mehr zu erkennen waren. Die Proben wurden in je ein Well einer 96-Deep-Well-Platte überführt (Endvolumen 800 µl) und konnten nun bei -80°C gelagert werden. Zur Weiterverarbeitung wurde

gemäß Kapitel II.6.1.1 verfahren, auch hier wurden je 150 µl Chloroform pro 800 µl im Deep-Well zugegeben.

II.6.2 Affy-Chip Labelling und Hybridisierung

Mit Hilfe des Affy-Chip Labellings war es möglich, die Genexpressionsmuster in verschiedenen Monolayer- und Sphäroid-Kulturen zu analysieren. Das Prinzip des Chip Labellings beruht auf der komplementären Bindung von cRNA-Fragmenten lysierter Zellen an einzelne, „gespottete“ Gensequenzen auf einem Affimetrix Gen Chip. Dabei wurde die zuvor isolierte RNA (siehe II.6.1) zuerst in cDNA umgeschrieben, diese aufgereinigt und in cRNA übersetzt. Bei der Übersetzung wurde die cRNA gleichzeitig mit Biotin gelabelt. Vor der Fragmentierung der gelabelten cRNA, wurde diese erneut aufgereinigt. Die Visualisierung an den Gene Chip hybridisierter cRNA erfolgte über das an die cRNA gebundene Biotin. Anhand der Quantifizierung des Biotinsignals war es möglich, die Expressionsrate einzelner Gene in den zu untersuchenden Zellen zu bestimmen und zu vergleichen. Das in der vorliegende Arbeit durchgeführte Affy-Chip Labelling erfolgte nach Vorgaben des „Affy-Chip RNA Labelling and Hybridization Protocols“ von Avalon Pharmaceuticals Inc.:

Zur Synthese von cDNA mit Hilfe des GeneChip HT One-Cycle cDNA Synthesis Kits (Affymetrix) wurden auf Eis 0,5 - 1,0 µg der in Kapiteln II.6.1 isolierten RNA je Well einer 96-Well PCR Platte (Applied Biosystems) vorgelegt. Das finale Volumen jedes Wells wurde mit RNase-freiem Wasser (RNeasy Kit, Qiagen) auf 5 µl eingestellt (Proben mit einer Ausgangskonzentration > 0,5 - 1,0 µg/5 µl wurden mit Hilfe eines Speed Vacuum Trockners (Thermo Scientific) eingetrocknet und in 10 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert). Anschließend wurden 5 µl des 1x T7 Oligo(dT) Primers (GeneChip HT One-Cycle cDNA Synthesis Kit, Affymetrix) je Well zugegeben. Das „Primer Annealing“ erfolgt nach guter Durchmischung der Proben im PCR Thermo Cycler (70°C für 10 Minuten, dann 4°C für 5 Minuten), die 96-Well Platten wurden danach auf Eis gelagert. Im nächsten Schritt wurde der „1st strand cDNA Synthesis Mix“ vorbereitet (siehe Anhang 4a). Nach Zugabe von 10 µl dieses Gemisches je Well wurden die Proben (Gesamtvolume 20 µl) vorsichtig gemischt, im PCR Thermo Cycler inkubiert (42°C für 60 Minuten, dann 4°C für 5 Minuten) und erneut auf Eis gelagert. Für die Synthese des zweiten cDNA-Stranges wurde nun der „2nd strand cDNA Synthesis Mix“ vorbereitet (siehe Anhang 4a). Zusätzlich zu den 39 µl dieses „2nd strand cDNA Synthesis Mix“ wurden je Probe 91 µl destilliertes Wasser zugegeben. Nach vorsichtiger Durchmischung der Proben (Gesamtvolume 150 µl) erfolgte eine Inkubation im PCR Thermo Cycler (16°C für 120 Minuten, dann 4°C für 5 Minuten bzw. ÜN). Den Abschluß des GeneChip HT One-Cycle cDNA Synthesis Kits bildete die Zugabe von 4 µl „T4 mix“ (siehe Anhang 4a) je Well einer 96-Well-Platte mit anschließender Inkubation der Proben im PCR Thermo Cycler (16°C für

10 Minuten, 72°C für 10 Minuten, dann 4°C für 5 Minuten). Bis zur Aufreinigung der cDNA wurden die Proben bei 4°C gelagert.

Die Aufreinigung der cDNA erfolgte mittels Qiaquick 96-well Kit (Qiagen) laut Angaben des Herstellers, wobei die gereinigte, doppelsträngige cDNA abschließend in je 70 µl destilliertem Wasser eluiert wurde. Die Proben wurden dann in einem Speed Vacuum Trockner eingetrocknet und in 25 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

In einem nächsten Schritt sollte mit Hilfe des GeneChip HT IVT Labelling Kits (Affymetrix) die gereinigte cDNA in Biotin-gelabelte cRNA übersetzt werden. Dabei musste zunächst der „IVT Master Mix“ vorbereitet werden (siehe Anhang 4c). In einer neuen 96-Well PCR Platte wurden dann je Well 22 µl cDNA und 38 µl „IVT Master Mix“ vorsichtig gemischt und anschließend ÜN bei 37°C inkubiert.

Vor der Hybridisierung auf einem Affymetrix Gene Chip sollte die gelabelte cRNA aufgereinigt und fragmentiert werden. Dazu wurde ein modifiziertes Protokoll des RNeasy Kits (Qiagen) verwendet: in einer neuen 96-Deep-Well-Platte wurden die Proben (60 µl) mit 350 µl Lysepuffer (LNS) und 250 µl 100 % Ethanol gemischt, anschließend in RNeasy Reaktionsgefäß übertragen und in 70 µl destilliertem Wasser eluiert. Darauf folgte eine Qualitätskontrolle der gereinigten cRNA, indem je Probe 40 µl auf eine neue 96-Well-Microtiterplatte überführt und mit Hilfe eines Absorptionsmessgerätes (Microplate Reader) die cRNA Konzentrationen bestimmt wurden. Mit destilliertem Wasser wurde jede Probe auf eine finale Konzentration von 0,2 µg/µl eingestellt. Je 40 µl der eingestellten Proben wurden dann auf eine neue 96-Well PCR Platte überführt, mit 7 µl Fragmentationspuffer versetzt und bei 95°C für 35 Minuten inkubiert.

Die fragmentierten, Biotin-gelabelten cRNA-Proben konnten jetzt auf einen Affymetrix Gene Chip geladen werden. Vor jeder Hybridisierung wurden alle Puffer frisch angesetzt (siehe Anhang 4d) und benötigte 96-Well PEG-Platten (Affymetrix) adäquat vorbereitet. Dazu wurden die PEG-Platten spätestens 15 Minuten vor einer Hybridisierung in 96-Well „Pre-Hyb“-Mikrotiter-Platten eingetaucht, die mit Pre-Hyb Puffer (70 µl/Well) gefüllt waren. Ein Eintrocknen der PEG-Platten bis zur Hybridisierung sollte anschließend unbedingt vermieden werden. Weiterhin wurden je Well einer 96-Well PCR Platte 70 µl Hybridisierungspuffer vorgelegt und mit den fragmentierten cRNA-Proben vermischt (Gesamtvolumen ~ 110 µl). Zur Denaturierung der Proben in Hybridisierungspuffer folgte eine Inkubation in einem PCR Thermo Cycler bei 95°C für 5 Minuten. Letztendlich wurden die Proben auf einen Gene Chip (Hybridisierungplatte) geladen und die PEG-Platten aus den Pre-Hyb-Platten zügig auf den Gene Chip überführt. Beim Verschließen der Hybridisierungsplatten mit den PEG-Platten wurde darauf geachtet eventuell entstandene Luftblasen zu entfernen. Nach einer 16-stündigen Inkubation bei 37°C im Wärmeschrank konnten die Daten der Gene Chips mit Hilfe eines Affymetrix GeneChip HT Scanners eingelesen werden.

II.6.3 Expressionsanalyse

Die Auswertung der Affy-Chips erfolgte mit folgenden Analyse-Werkzeugen:

- Basic SAM (significance analysis of microarrays)
- GeneLinker™ Platinum von IOS (Improved Outcomes Software, Kingston, ON, CA)
- PCA (principal component analysis)

III. Ergebnisse

III.1 Standardisierung und Teilautomatisierung der Sphäroidkultivierung

Für einen möglichen Einsatz von Sphäroiden im High-Throughput-Verfahren sollten in dieser Arbeit mögliche Schritte zur Standardisierung und (Teil-)Automatisierung der Sphäroidkultivierung getestet bzw. etabliert werden. Dies beinhaltete v.a. die Testung neuer anti-adhäsiver Oberflächenbeschichtungen und der Einsatz eines „Automated Multichannel Pipetting Systems“ (Thermo Fisher Scientific).

III.1.1 Testung neuer anti-adhäsiver Oberflächenbeschichtungen für eine High-Throughput-Sphäroid-Kultur

Bezüglich der Testung neuer anti-adhäsiver Oberflächenbeschichtungen wurden mehrere 96-well Mikrotiterplatten (bakteriologische Zellkulturplatten, Zellkulturplatten für Suspensionszellen, usw.) von sechs Herstellern im Hinblick auf folgende Kriterien getestet: (a) Sphäroidbildung, Reproduzierbarkeit der Sphäroidbildung und des Sphäroiddurchmesser (b) innerhalb einer Platte, (c) zwischen mehreren Platten einer Produkcharge und (d) zwischen Platten mehrerer Produktchargen. Für einen dauerhaften Einsatz dieser Platten bei der Sphäroidkultivierung sollten Zellen vergleichbar mit den im „Liquid-Overlay“-Verfahren (siehe II.2.2) kultivierten Sphäroiden anwachsen. Agarose-beschichtete 96-Well Mikrotiterplatten zeichnen sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit bei der Sphäroidbildung und geringe Standardabweichung des Sphäroiddurchmessers nach einem Initiationsintervall von 96 h innerhalb einer Platte ($SD \leq 10\%$) aus (siehe Abbildung 6). Entsprechend der konkaven Oberflächen innerhalb einer Agarose-beschichteten Mikrotiterplatte, die eine Aggregation von Zellen im Zentrum eines Wells fördern, sollten in dieser Arbeit ausschließlich Rundboden-Mikrotiterplatten getestet werden. Als Referenz für diese Versuche diente die Kolonkarzinomzelllinie HT29, eine Ausweitung der Versuche auf weitere Zelllinien fand im Rahmen dieser Arbeit nicht statt. Die Versuche wurden für jede getestete Platte (Plattentyp und -charge) mindestens zweimal wiederholt.

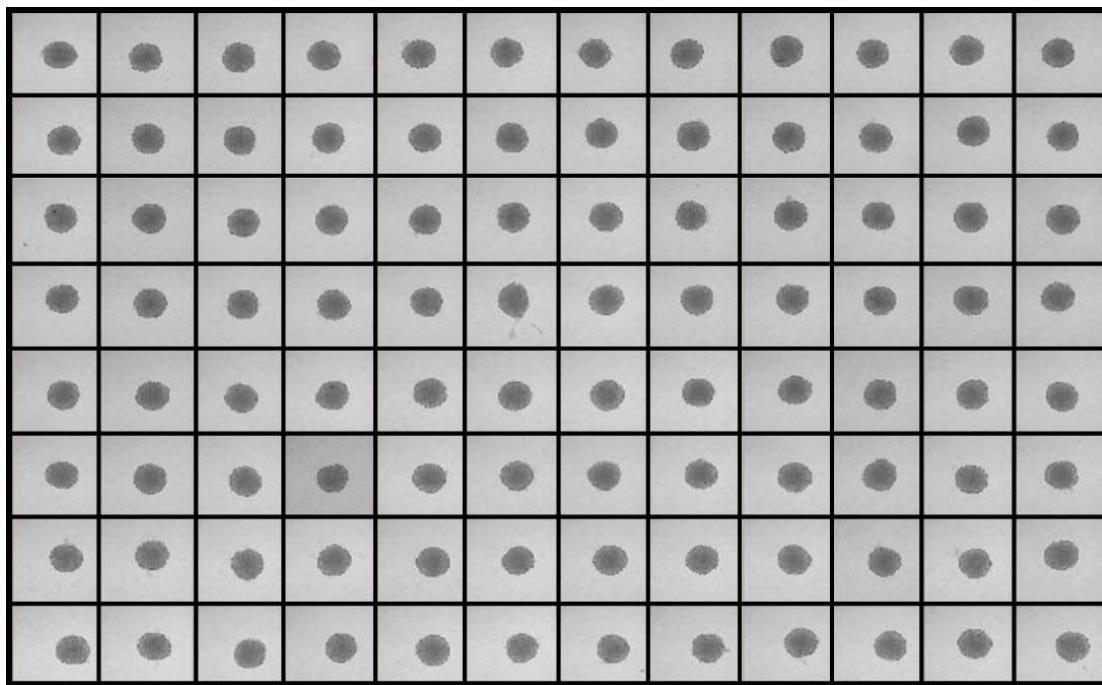


Abbildung 6. Repräsentative Phasenkontrastbilder von HT29 Zellen in einer Agarose-beschichteten 96-Well Mikrotiterplatten („Liquid-Overlay“, siehe II.2.2) nach 96 h Inkubation unter Standardbedingungen. Ausgesät wurden 1500 Zellen pro Well. Vergrößerung 5x Objektiv.

III.1.1.1 Tissue Culture Plate 96-Well Round Bottom Suspension Cells (Sarstedt)

Das Plattensystem der Fa. Sarstedt (#83.1837.500; „Tissue Culture Plate 96-Well Round Bottom Suspension Cells) wurde an HT29 Zellen getestet, die zur Sphäroidbildung unter Standardbedingungen inkubiert wurden. Zusätzlich wurden Platten auf einem von Sarstedt entwickelten und zur Verfügung gestellten Plattenschüttler unter Standardbedingungen inkubiert. Durch sanftes und gleichmäßiges Schütteln sollte die Adhäsion von Zellen am Plattenboden zusätzlich erschwert werden.

III.1.1.1.1 Inkubation ohne Schüttler

Die Kolonkarzinomzelllinie HT29 zeigt in „Tissue Culture Plates, 96-Well Round Bottom, Suspension Cells“ (Sarstedt) nur vereinzelt eine Sphäroidbildung, d.h. ein Sphäroid pro Well. Die Reproduzierbarkeit war zudem sehr gering (siehe Abbildung 7).

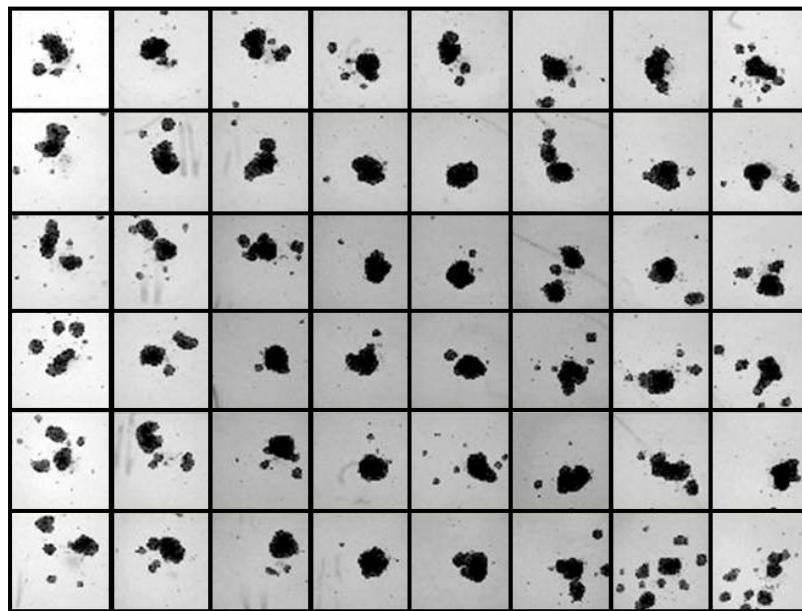


Abbildung 7. Repräsentative Phasenkontrastbilder von HT29 Zellen in „Tissue Culture Plate, 96-Well Round Bottom, Suspension Cells“ (Sarstedt) nach 96 h Inkubation unter Standardbedingungen. Ausgesät wurden 1500 Zellen pro Well. Vergrößerung 5x Objektiv.

III.1.1.1.2 Inkubation mit Schüttler

Unter Einsatz eines Schüttlers während des 4-tägigen Initiationsintervalls konnte die Sphäroidbildung von HT29 Zellen in „Tissue Culture Plates, 96-Well Round Bottom, Suspension Cells“ (Sarstedt) auffallend verbessert werden (siehe Abbildung 8). Leider konnten gleichmäßig geformte Sphäroide in höchstens 48 Wells einer 96-Well Platte nachgewiesen werden, d.h. die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Versuchsansatzes/einer Platte betrug $\leq 50\%$. Dieselben Ergebnisse wurden für weitere Versuchsansätze auf Platten einer Produktionscharge bzw. dreier unterschiedlicher Produktionschargen beobachtet, weitere Versuche mit diesen Platten wurden daher eingestellt.

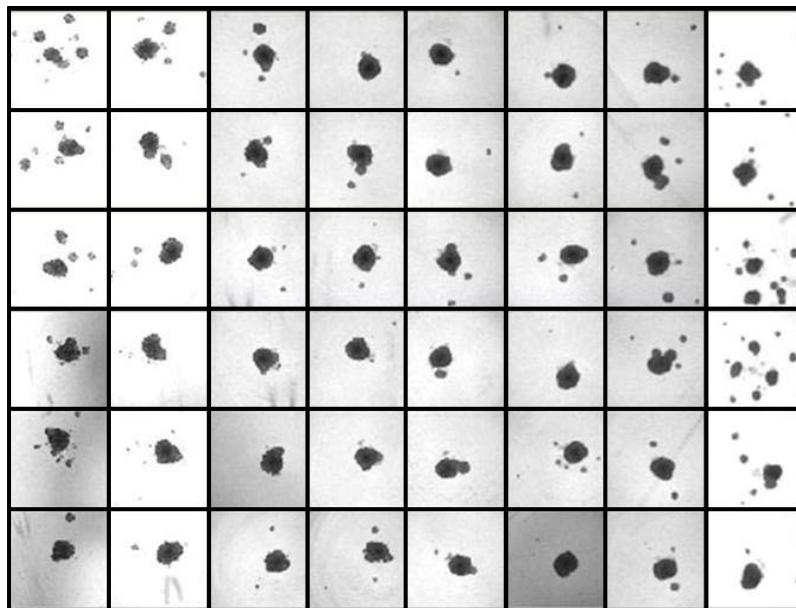


Abbildung 8. Repräsentative Phasenkontrastbilder von HT29 Zellen in „Tissue Culture Plate, 96-Well Round Bottom, Suspension Cells“ (Sarstedt) nach 96 h Inkubation auf einem Schüttler unter Standardbedingungen. Ausgesät wurden 1500 Zellen pro Well. Vergrößerung 5x Objektiv.

III.1.1.2 Zero-Trap TC (NoAb)

Das Plattenystem der Fa. NoAb (#TR-2302-2; Zero-Trap TC, Non-Binding Clear U-bot 96-well Microplates) wurde ebenfalls auf die Sphäroidbildung von HT29 Zellen hin untersucht. In diesem System trat Sphäroidbildung, d.h. ein Sphäroid pro Well, nur sporadisch zu Tage (siehe Abbildung 9), daher wurden nach dreifacher Testung die Versuche mit diesen Platten ebenfalls eingestellt.

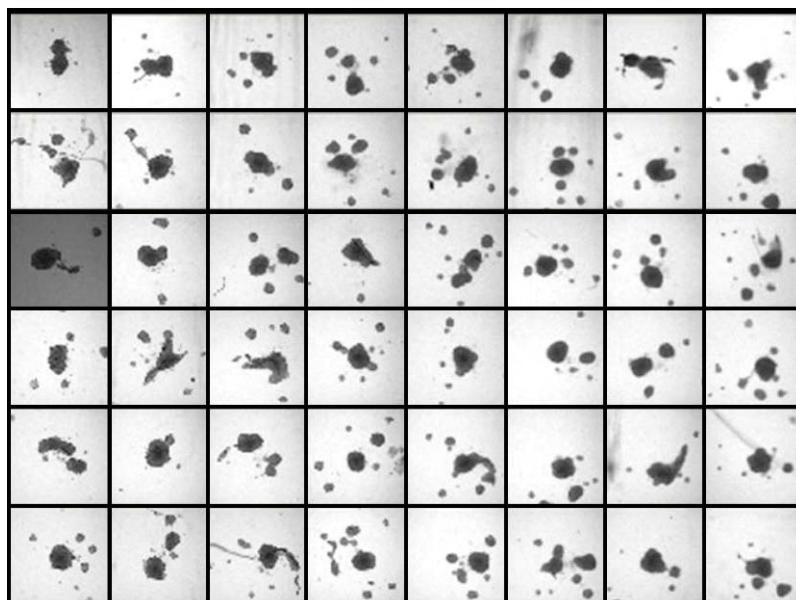


Abbildung 9. Repräsentative Phasenkontrastbilder von HT29 Zellen in „Zero-Trap TC“ 96-Well Mikrotiterplatten (NoAb) nach 96 h Inkubation unter Standardbedingungen. Ausgesät wurden 1500 Zellen pro Well. Vergrößerung 5x Objektiv.

III.1.1.3 Microplate, 96-well, U-Bottom (Greiner Bio-One)

Weitere Tests zur Sphäroidbildung von HT29 Zellen wurden auf Microplates, 96-well, U Bottom von Greiner Bio-One (#650161) durchgeführt. Nach Inkubation unter Standardbedingungen konnte auch hier nur sporadisch eine sphäroidartige Aggregation beobachtet werden (siehe Abbildung 10). Nach dreifacher Testung mit inadäquaten Ergebnis erfolgte keine weitere Testung dieser Platten.

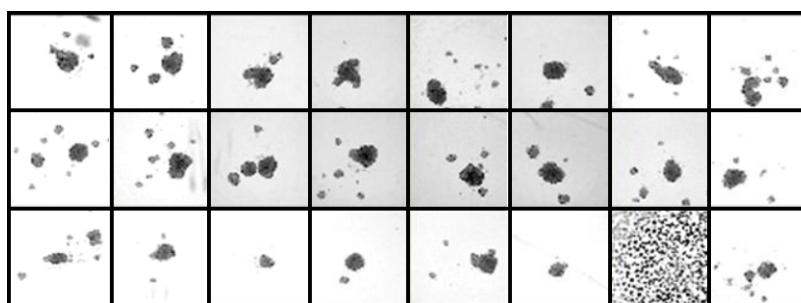


Abbildung 10. Repräsentative Phasenkontrastbilder von HT29 Zellen in „Microplates, 96-well, U Bottom (Greiner Bio-One) nach 96 h Inkubation unter Standardbedingungen. Ausgesät wurden 1500 Zellen pro Well. Vergrößerung 5x Objektiv.

III.1.1.4 96-well Standard Microplate (ABGene)

96-well Standard Microplates der Firma ABGene (#AB-0796) dienten der weiteren Untersuchung der Sphäroidbildung von HT29 Zellen auf neuen anti-adhäsiven Oberflächenbeschichtungen. Eine Sphäroidbildung nach entsprechendem Initiationsintervall unter Standardbedingungen blieb jedoch gänzlich aus (siehe Abbildung 11). Auch bei zweifacher Wiederholung konnte keine nennenswerte dreidimensionale Zellaggregation mit dem Ergebnis eines Sphäroides pro Well erreicht werden.

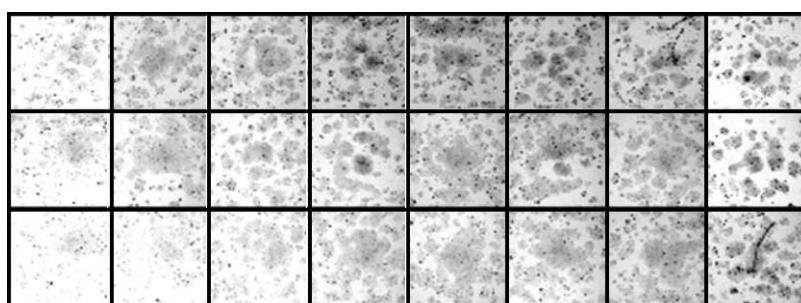


Abbildung 11. Repräsentative Phasenkontrastbilder von HT29 Zellen in „96-well Standard Microplates“ (ABGene) nach 96 h Inkubation unter Standardbedingungen. Ausgesät wurden 1500 Zellen pro Well. Vergrößerung 5x Objektiv.

III.1.1.5 Microtest™ U-Bottom (Becton-Dickinson Labware)

Weiterhin wurden Mikrotest™ U-Bottom Platten von Becton-Dickinson (#353077) auf die Sphäroidbildung von HT29 Zellen nach Inkubation unter Standardbedingungen untersucht. Jedoch konnte auch hier in wiederholten Ansätzen keine Sphäroidbildung nach entsprechendem Initiationsintervall unter Standardbedingungen beobachtet werden (siehe Abbildung 12).

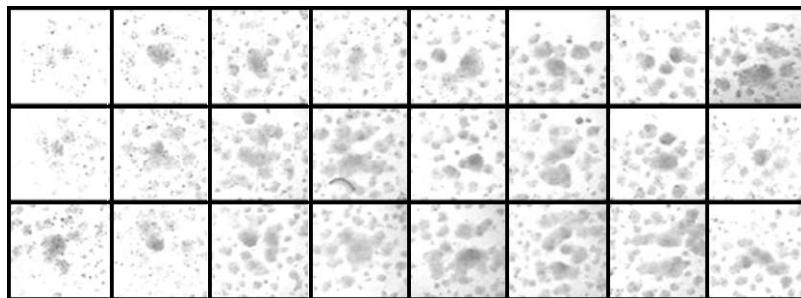


Abbildung 12. Repräsentative Phasenkontrastbilder von HT29 Zellen in „Mikrotest™ U-Bottom Plates“ (Becton-Dickinson) nach 96 h Inkubation unter Standardbedingungen. Ausgesät wurden 1500 Zellen pro Well. Vergrößerung 5x Objektiv.

III.1.1.6 Low-Cell-Binding U96 W Lid (Nunc™)

Abschließend wurden Plattsysteme der Fa. Nunc™ auf die Sphäroidbildung von HT29 Zellen nach Inkubation unter Standardbedingungen getestet. Mit der „Low-Cell-Binding U96“ Mikrotiterplatte (LCB, #145399) konnten erstmals an einem kommerziell erhältlichen Plattsystem sehr gute und reproduzierbare Sphäroide erzielt werden (siehe Abbildung 13).

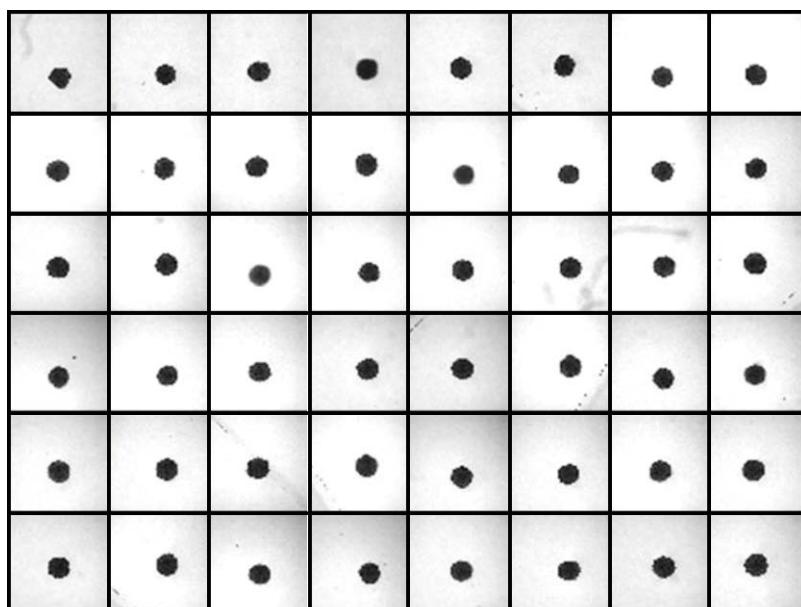


Abbildung 13. Repräsentative Phasenkontrastbilder von HT29 Zellen in „Low-Cell-Binding“ Mikrotiterplatten (Nunc™) nach 96 h Inkubation unter Standardbedingungen. Ausgesät wurden 1500 Zellen pro Well. Vergrößerung 5x Objektiv.

Der mittlere Durchmesser von Sphäroiden, die auf drei unterschiedlichen Platten der ersten Testcharge für 96 h unter Standardbedingungen kultivierten wurden betrug 360 (± 10) μm (siehe Tabelle 14). Dieses gute Ergebnis konnte auch auf Platten zweier weiterer Produktchargen reproduziert werden (siehe Tabelle 14). Die Standardabweichung des Sphäroiddurchmesser lag dabei sowohl innerhalb einer Produktcharge, als auch zwischen den unterschiedlichen Platten unter 5 %. Jedoch unterscheiden sich die Resultate vom Sphäroiddurchmesser der für 96 h unter Standardbedingungen im „Liquid-Overlay“-Verfahren kultivierten Sphäroide (395 (± 12) μm , siehe Tabelle 14).

Tabelle 14. Mittlerer Sphäroiddurchmesser und Lebendzellzahl/Sphäroid in HT29 Sphäroiden. HT29 Zellen wurden in Agarose-beschichteten Mikrotiterplatten und in LCB Mikrotiterplatten (NuncTM) dreier verschiedener Produktchargen ausgesät und für 96 h unter Standardbedingungen inkubiert. Ausgesät wurden jeweils 1500 Zellen pro Well.

Platte	mittlerer Sphäroiddurchmesser	lebende Zellen/Sphäroid
„Liquid-Overlay“	395 (± 12) μm	10424 (± 299)
LCB Testcharge 1	360 (± 10) μm	7924 (± 756)
LCB Testcharge 2	353 (± 12) μm	-
LCB Testcharge 3	359 (± 5) μm	-

Der Vergleich der Anzahl lebender Zellen im Sphäroid (siehe Kap. II.3.2) und Untersuchungen an Sphäroidschnittpräparaten (siehe Kap. II.3.3) zeigen, dass der geringere Durchmesser von Sphäroiden in LCB Mikrotiterplatten (NuncTM) auf eine verringerte Zellzahl im 3-D Zellverbund zurückzuführen ist (siehe Tabelle 14). Eine erhöhte Kompaktation von Zellen im Sphäroid konnte mittels histologischer Untersuchungen nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 14).

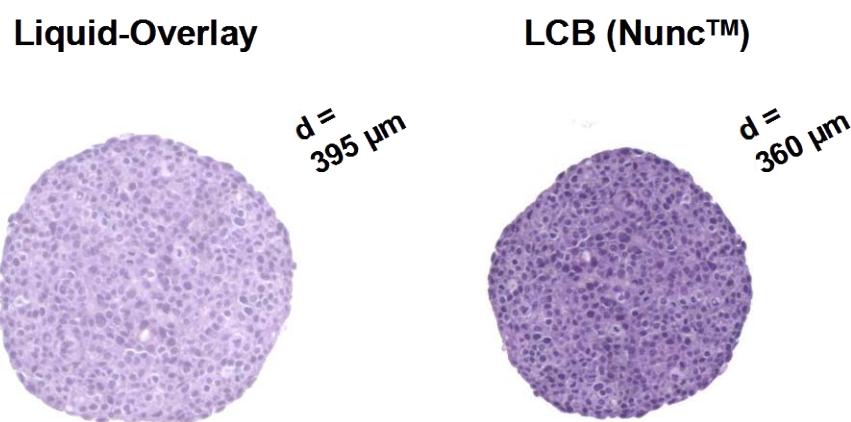


Abbildung 14. Repräsentative Phasenkontrastbilder H&E gefärbter, 5-6 μm dicker Mittelschnitte von HT29 Sphäroiden. HT29 Zellen wurden in einer Agarose-beschichteten und einer LCB Mikrotiterplatte (NuncTM) ausgesät und für 96 h unter Standardbedingungen inkubiert. Ausgesät wurden jeweils 1500 Zellen pro Well. Vergrößerung 10x Objektiv.

Für vergleichende Beobachtungen des Volumenwachstums von HT29 Sphäroiden in Agarose-beschichteten und LCB Mikrotiterplatten als Funktion der Zeit wurde der Kurvenverlauf mit Hilfe der Gompertz-Funktion beschrieben (siehe Kap. II.3.1.1). Es zeigte sich, dass die in LCB Mikrotiterplatten kultivierten HT29 Sphäroide im Vergleich zu den im „Liquid-Overlay“ kultivierten nach einem 96-stündigen Initiationsintervall unter Standardbedingungen wiederum einen verringerte Sphäroiddurchmesser, und damit auch ein verringertes Sphäroidvolumen aufweisen. Mit fortschreitender Dauer weisen die unterschiedlich kultivierten Sphäroide jedoch einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf für das Volumenwachstums auf (siehe Abbildung 15).

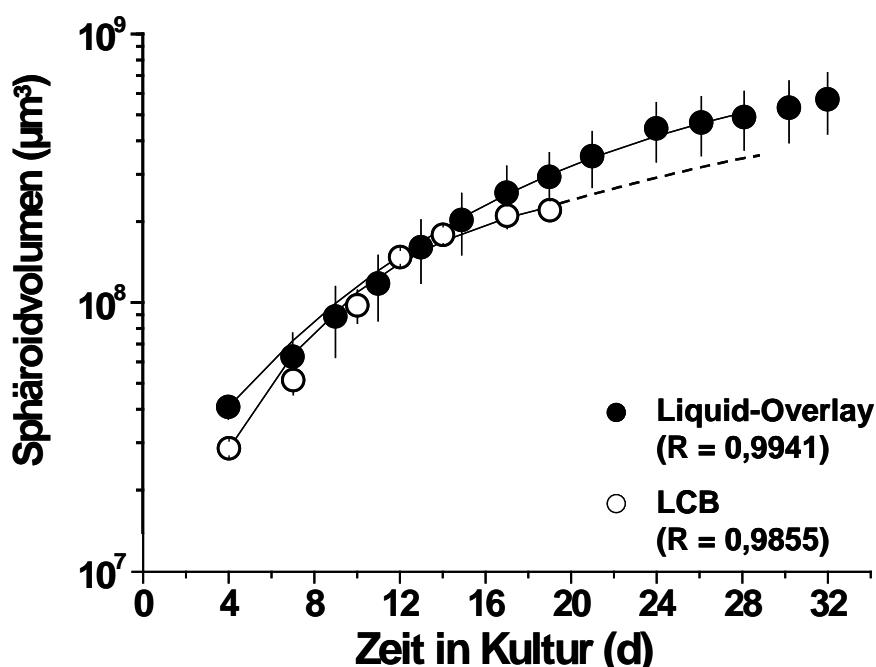


Abbildung 15. Darstellung des Volumenwachstums von HT29 Sphäroiden als Funktion der Zeit in einer Agarose-beschichteten und einer LCB Mikrotiterplatte (Nunc™) unter Standardbedingungen. Alle Datenpunkte sind mittlere Sphäroidvolumen \pm SD für $\leq n \leq 16$ Sphäroide. Nach Aussaat von jeweils 1500 HT29 Zellen pro Well und einem Initiationsintervall von 96 h unter Standardbedingungen wurde der Kurvenverlauf mit Hilfe der Gompertz-Funktion (siehe Kap. II.3.1.1) beschrieben:

$$\begin{array}{ll} \text{Liquid-Overlay} & V(0) = 4,1 \times 10^7 \mu\text{m}^3, \quad \alpha = 0,20829 \pm 0,00788, \quad \beta = 0,06540 \pm 0,00476 \\ \text{LCB} & V(0) = 2,9 \times 10^7 \mu\text{m}^3, \quad \alpha = 0,33002 \pm 0,02805, \quad \beta = 0,13956 \pm 0,01901 \end{array}$$

Neben der Referenzzelllinie HT29 konnten auf den Low-Cell-Binding Platten auch mit den beiden humanen Kolonkarzinomzelllinien HCT-116 und DLD-1 sehr gute und reproduzierbare Sphäroide erzielt werden. Der mittlere Durchmesser von HCT-116 Sphäroiden, die auf einer LCB-Platte für 96 h unter Standardbedingungen kultivierten wurden (Abbildung 16) betrug 420 (± 11) μm , die Standardabweichung des Sphäroiddurchmessers lag somit bei ca. 3 % (siehe Tabelle 15).

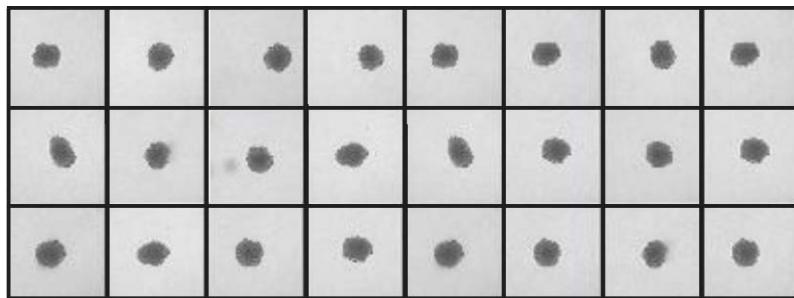


Abbildung 16. Repräsentative Phasenkontrastbilder von HCT-116 Zellen in „Low-Cell-Binding“ Mikrotiterplatten (Nunc™) nach 96 h Inkubation unter Standardbedingungen. Ausgesät wurden 750 Zellen pro Well. Vergrößerung 5x Objektiv.

Erneut unterschiedet sich dieser Wert vom Sphäroiddurchmesser der für 96 h unter Standardbedingungen im „Liquid-Overlay“-Verfahren kultivierten Kontrollsphäroide ($385 (\pm 14)$ µm, siehe Tabelle 15). Im Gegensatz zu HT29 Zellen, weisen HCT-116 Sphäroide, die in einer LCB-Platte kultiviert wurden einen größeren Durchmesser an Tag 4 nach der Aussaat auf.

Tabelle 15. Mittlerer Sphäroiddurchmesser in HCT-116 MCTS. HCT-116 Zellen wurden in einer Agarose-beschichteten und einer LCB Mikrotiterplatte (Nunc™) ausgesät und für 96 h unter Standardbedingungen inkubiert. Ausgesät wurden jeweils 750 Zellen pro Well.

Platte	mittlerer Sphäroiddurchmesser
„Liquid-Overlay“	$385 (\pm 14)$ µm
LCB Testcharge 1	$420 (\pm 11)$ µm

DLD-1 Sphäroiden, die auf einer LCB-Platte für 96 h unter Standardbedingungen kultiviert wurden (Abbildung 17) wiesen einen mittleren Durchmesser von $404 (\pm 13)$ µm auf (siehe Tabelle 16). Auch hier konnte eine sehr geringe Standardabweichung des Sphäroiddurchmessers von ca. 3 % beobachtet werden.

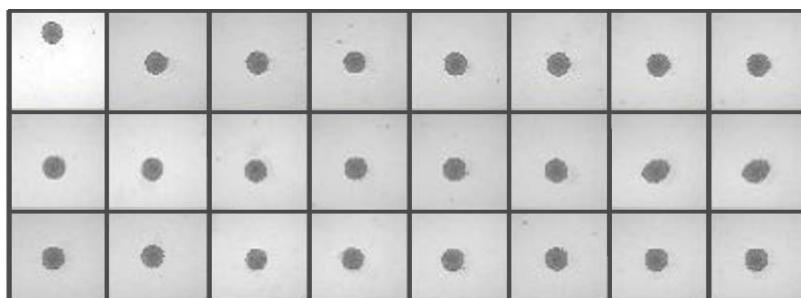


Abbildung 17. Repräsentative Phasenkontrastbilder von DLD-1 Zellen in „Low-Cell-Binding“ Mikrotiterplatten (Nunc™) nach 96 h Inkubation unter Standardbedingungen. Ausgesät wurden 4000 Zellen pro Well. Vergrößerung 5x Objektiv.

Anders als bei den beiden vorher getesteten Zelllinien scheint sich der Sphäroiddurchmesser nicht von dem der für 96 h unter Standardbedingungen im „Liquid-Overlay“-Verfahren kultivierten Sphäroide ($382 (\pm 8) \mu\text{m}$) zu unterscheiden (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16. Mittlerer Sphäroiddurchmesser in DLD-1 MCTS. DLD-1 Zellen wurden in einer Agarose-beschichteten und einer LCB Mikrotiterplatte (NuncTM) ausgesät und für 96 h unter Standardbedingungen inkubiert. Ausgesät wurden jeweils 4000 Zellen pro Well.

Platte	mittlerer Sphäroiddurchmesser
„Liquid-Overlay“	$382 (\pm 8) \mu\text{m}$
LCB Testcharge 1	$404 (\pm 13) \mu\text{m}$

Ehe weitere Untersuchungen zum Wachstum von HCT-116 und DLD-1 Sphäroiden auf LCB Platten (Zellzahlbestimmung, Sphäroidhistologie, Volumenwachstum) durchgeführt werden konnten, traten unerwartete Schwierigkeiten auf. So konnten in keiner der nachfolgenden Produktionschargen gute und reproduzierbar Ergebnisse bei der Ausbildung von Sphäroiden erzielt werden (siehe Abbildung 18). Da trotz intensiver Zusammenarbeit mit der Fa. NuncTM dieses Problem nicht nachvollziehbar und somit nicht lösbar war, mussten die Versuche mit diesen Platten im Frühjahr 2007 bedauerlicherweise eingestellt werden.

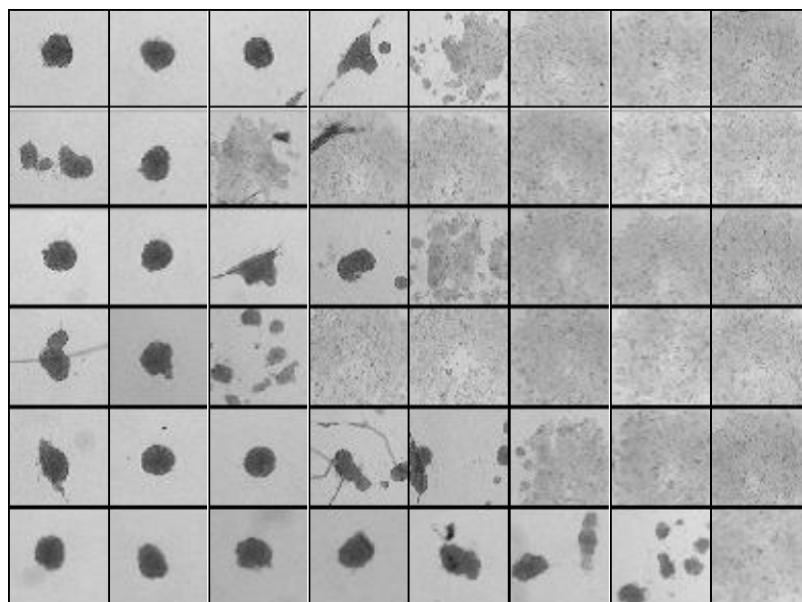


Abbildung 18. Repräsentative Phasenkontrastbilder von HT29 Zellen in einer „Low-Cell-Binding“ Mikrotiterplatte (NuncTM) einer nachfolgenden Produktcharge nach 96 h Inkubation unter Standardbedingungen. Ausgesät wurden 1500 Zellen pro Well. Vergrößerung 5x Objektiv.

III.1.1.7 HydroCell 96 Multi-well plate (Nunc™)

Erst im Herbst 2007 konnte ein weiteres Plattensystem der Fa. Nunc™ auf Sphäroidbildung hin untersucht werden. Auch mit dem HydroCell 96 Multi-well Plate System wurden sehr gute und reproduzierbare Ergebnisse erzielt (siehe Abbildung 19).

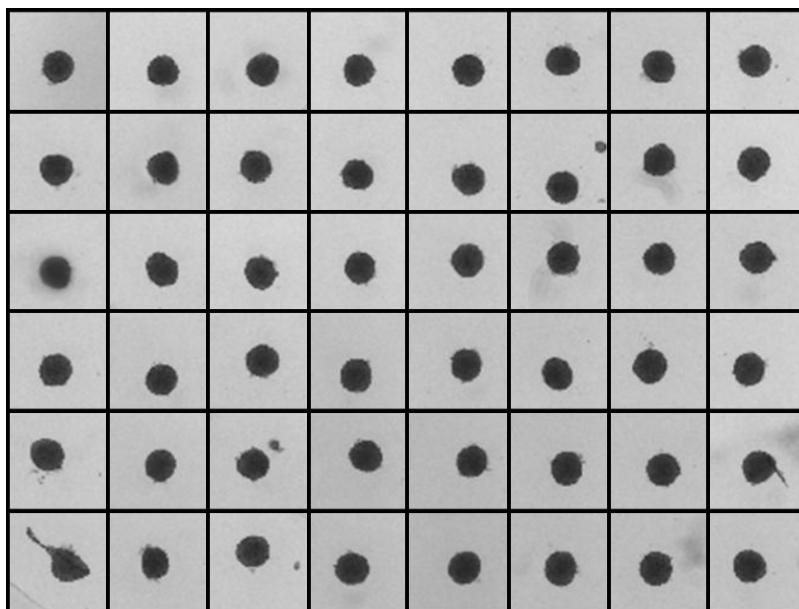


Abbildung 19. Repräsentative Phasenkontrastbilder von HT29 Zellen in „HydroCell“ Mikrotiterplatten (Nunc™) nach 96 h Inkubation unter Standardbedingungen. Ausgesät wurden 1500 Zellen pro Well. Vergrößerung 5x Objektiv.

Mit einer ersten Produktcharge des HydroCell Plattensystems wurden HT29 Sphäroide generiert, die nach dem 96-stündigen Initiationsintervall unter Standardbedingungen einen mittleren Durchmesser von $359 (\pm 7) \mu\text{m}$ aufwiesen (siehe Tabelle 17). Die Standardabweichung des Sphäroiddurchmessers innerhalb dieser Produktcharge lag bei ca. 2%. Ähnlich der Kultivierung auf „Low-Cell-Binding“ Platten, unterscheidet sich der Durchmesser der HT29 Sphäroide von den Ergebnissen der im „Liquid-Overlay“-Verfahren kultivierten Kontrollsphäroide ($382 (\pm 11) \mu\text{m}$, siehe Tabelle 17).

Tabelle 17. Mittlerer Sphäroiddurchmesser und Lebendzellzahl/Sphäroid in HT29 Sphäroiden. HT29 Zellen wurden in einer Agarose-beschichteten Mikrotiterplatten und einer „HydroCell“ Mikrotiterplatte (Nunc™) ausgesät und für 96 h unter Standardbedingungen inkubiert. Ausgesät wurden jeweils 1500 Zellen pro Well.

Platte	mittlerer Sphäroiddurchmesser	lebende Zellen/Sphäroid
„Liquid-Overlay“	$382 (\pm 11) \mu\text{m}$	$8988 (\pm 1069)$
HydroCell Test-charge 1	$359 (\pm 7) \mu\text{m}$	$7257 (\pm 874)$

Auch hier zeigen Untersuchungen an Sphäroidschnittpräparaten und der Vergleich der Anzahl lebender Zellen im Sphäroid, dass der geringere Durchmesser von Sphäroiden in den kommerziell erhältlichen Mikrotiterplatten auf eine verringerte Zellzahl im 3-D Zellverbund zurückgeführt werden muss (siehe Tabelle 17). Histologische Untersuchungen lassen erneut nicht auf eine erhöhte Kompaktation der Zellen im Sphäroid schließen (siehe Abbildung 20).

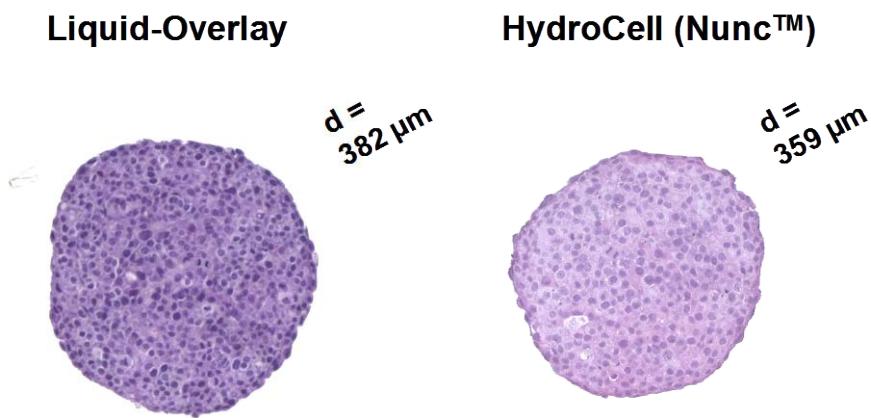


Abbildung 20. Repräsentative Phasenkontrastbilder H&E gefärbter, 5-6 µm dicker Mittelschnitte von HT29 Sphäroiden. HT29 Zellen wurden in einer Agarose-beschichteten und einer „HydroCell“ Mikrotiterplatte (Nunc™) ausgesät und für 96 h unter Standardbedingungen inkubiert. Ausgesät wurden jeweils 1500 Zellen pro Well. Vergrößerung 10x Objektiv.

Parallel zu den Versuchen mit der Referenzzelllinie HT29 wurde auf den HydroCell Platten auch die Sphäroidbildung der beiden humanen Kolonkarzinomzelllinien HCT-116 und HCT-15 untersucht. Beide Zelllinien zeigten hierbei adäquate und reproduzierbare Ergebnisse. So betrug der mittlere Durchmesser von HCT-116 Sphäroiden, die auf einer HydroCell Platte kultiviert wurden (Abbildung 21) $425 (\pm 14) \mu\text{m}$, die Standardabweichung des Sphäroid-durchmesser lag somit bei ca. 3 % (siehe Tabelle 18).

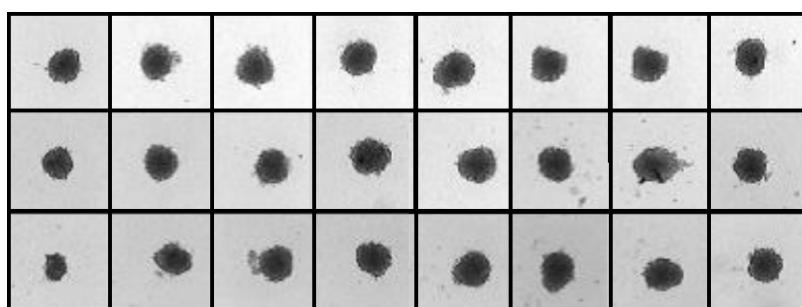


Abbildung 21. Repräsentative Phasenkontrastbilder von HCT-116 Zellen in einer „HydroCell“ Mikrotiterplatten (Nunc™) nach 96 h Inkubation unter Standardbedingungen. Ausgesät wurden 750 Zellen pro Well. Vergrößerung 5x Objektiv.

Erneut weisen HCT-116 Sphäroide, die auf Platten der Fa. NuncTM kultiviert wurden im Vergleich zu Kontrollsphäroiden im „Liquid-Overlay“ (383 (± 19) μm , siehe Tabelle 18) einen größeren Durchmesser an Tag 4 nach der Aussaat auf.

Tabelle 18. Mittlerer Sphäroiddurchmesser in HCT-116 MCTS. HCT-116 Zellen wurden in einer Agarose-beschichteten und einer „HydroCell“Mikrotiterplatte (NuncTM) ausgesät und für 96 h unter Standardbedingungen inkubiert. Ausgesät wurden jeweils 750 Zellen pro Well.

Platte	mittlerer Sphäroiddurchmesser
„Liquid-Overlay“	382 (± 8) μm
HydroCell Testcharge 1	425 (± 14) μm

HCT-15 Sphäroiden, die auf einer HydroCell Platte kultiviert wurden (Abbildung 22) zeigten nach dem 96-stündigen Initiationsintervall unter Standardbedingungen einen mittleren Durchmesser von 452 (± 21) μm (siehe Tabelle 19), die Standardabweichung des Sphäroiddurchmesser innerhalb dieser Platten betrug somit ca. 5 %. Parallel dazu wurden HCT-15 Sphäroide im „Liquid-Overlay“-Verfahren kultiviert, deren Durchmesser mit 382 (± 8) μm bestimmt wurde (siehe Tabelle 19). Vergleichbar mit HCT-116 Zellen kann bei HCT-15 Sphäroide im HydroCell Plattensystem ein größerer Durchmesser an Tag 4 nach der Aussaat beobachtet werden.

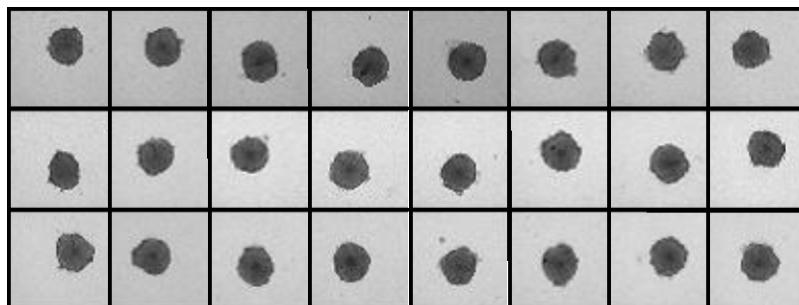


Abbildung 22. Repräsentative Phasenkontrastbilder von HCT-15 Zellen in einer „HydroCell“ Mikrotiterplatten (NuncTM) nach 96 h Inkubation unter Standardbedingungen. Ausgesät wurden 4000 Zellen pro Well. Vergrößerung 5x Objektiv.

Tabelle 19. Mittlerer Sphäroiddurchmesser in HCT-15 MCTS. HCT-15 Zellen wurden in einer Agarose-beschichteten und einer „HydroCell“Mikrotiterplatte (Nunc™) ausgesät und für 96 h unter Standardbedingungen inkubiert. Ausgesät wurden jeweils 4000 Zellen pro Well.

Platte	mittlerer Sphäroiddurchmesser
„Liquid-Overlay“	388 (± 8) μm
LCB Testcharge 1	452 (± 21) μm

Leider konnte von diesem Plattensystem bislang nur eine Produktionscharge getestet werden, da sich dieses noch in einer Testphase befindet. Weitere Versuche mit neuen Produktionschargen, die Ende September 2008 zur Verfügung stehen sollten, sind in Zusammenarbeit mit Nunc™ bereits geplant.

III.1.2 Sphäroidkultivierung mit Hilfe des **SeriaMate®** (Thermo Fisher Scientific)

Zur (Teil-)Automatisierung der Sphäroidkultivierung wurden Pipettierautomaten mehrerer Hersteller – u.a. der epMotion 5070 (Eppendorf), der Aquarius™ (Tecan) oder der Precision™ XS Microplate Sample Processor (BioTek) – in Betracht gezogen und getestet. Nicht zuletzt wegen seiner einfachen Handhabung wurde in der vorliegenden Arbeit das **SeriaMate®** Automated Multichannel Pipetting System (siehe Abbildung 23) verwendet. Mit diesem System konnte die Aussaat von Sphäroiden im „Liquid-Overlay“-Verfahren, die Zugabe frischen Mediums zu den 96-Well-Platten und zusätzlich die Wirkstoffbehandlung der Sphäroide (siehe II.4) teilautomatisiert werden. Dieselben Schritte wurden ebenfalls für die Kultivierung von Monolayerkulturen im 96-Well Format validiert.



Abbildung 23. Darstellung des **SeriaMate® Automated Multichannel Pipetting System (Thermo Fisher Scientific).** In der Detailabbildung (rechte Seite) werden die Positionen der Pipettenspitzen (1), der Flüssigkeitsreservoirs (2) und der 96-Well Platten (3) gezeigt.

Um steriles Arbeiten mit den Zellen zu gewährleisten wurde der *SerialMate®* unter einer Reinluftwerkbank positioniert. Mit Hilfe der mitgelieferten *ControlMate®* Software (Thermo Fisher Scientific) wurden Protokolle generiert, mit denen der Ablauf jedes benötigten Arbeitsvorganges festgelegt werden konnte. Die Software konnte sowohl über ein Touch-Screen-Dialogfenster direkt am *SerialMate®*, als auch über einen an Gerät angeschlossenen Computer bedient werden. Je nach Positionierung von Pipettenspitzen und 96-Well Mikrotiterplatten konnten alle Arbeitsschritte im 8-Kanal- oder im 12-Kanal-Verfahren durchgeführt werden.

Zur Aussaat von Tumorzellen wurden Zellsuspensionen und Agarose-beschichtete Platten gemäß II.2.2.1 vorbereitet. Position 1 des Pipettierautomaten wurde mit sterilen Pipettenspitzen besetzt, die Zellsuspensionen wurden unter sterilen Bedingungen in die von der Firma Matrix hergestellten Flüssigkeitsreservoirs umgefüllt, die dann auf Position 2 gegeben wurden. Je nach Versuchsansatz (Aussaat von Monolayer- bzw. Sphäroid-Kulturen) wurde Position 3 mit (Agarose-beschichteten) 96-Well Mikrotiterplatten besetzt. Das Protokoll zur Zellaussaat wurde in der *ControlMate®* Software wie folgt programmiert:

- Aufnahme neuer Spitzen
- Resuspendieren der Zellsuspension in den Reservoirs durch einmaliges Auf- und Abpipettieren
- Transfer von 200 µl Zellsuspension je Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte
- Abwurf der Spitzen in Abfallbehälter

Durch Einsatz des Pipettierautomaten konnte die Abweichung (SD) des Sphäroiddurchmessers von vier Tage alten Sphäroiden eines Versuchsansatzes auf < 5% reduziert werden.

Beim Füttern bzw. bei der Behandlung von Zellkulturen wurden zuerst je Well 100 µl Überstand abgenommen und in einen Abfallbehälter entsorgt. Ein Verlust von Zellen durch Absaugen des Überstandes konnte mit Hilfe des *SerialMate®* nahezu ausgeschlossen werden. Für den Verbleib von exakt 100 µl je Well wurde die Eintauchhöhe der Pipettenspitzen genau festgelegt. Dies war vor allem für die Wirkstoffbehandlung von großem Vorteil, da damit die gleich bleibende Wirkstoffkonzentration zwischen Wells einer Versuchsreihe gewährleistet werden konnte. Nach Abnahme des Überstandes wurden je nach Bedarf 100 µl frisches Standardmedium bzw. Wirkstoffverdünnungen zu den Zellkulturen zugegeben. Um eine Verschleppung verschiedener Zelltypen oder Wirkstoffkonzentrationen zwischen den Reihen einer Platte bzw. zwischen zwei Platten zu verhindern, konnten verwendeter Spitzen innerhalb eines Protokolls jederzeit abgeworfen werden.

III.2 Standardisierung und Teilautomatisierung der Sphäroidanalytik

III.2.1 Bildaufnahme mittels AxioVision 4.5 Software (Zeiss)

Die Bildaufnahme von Sphäroiden einer 96-Well Mikrotiterplatte konnte mit Hilfe eines Axiovert 200 M (Zeiss) Mikroskops (Abbildung 24) und der AxioVision 4.5 Software vollständig automatisiert werden. Detaillierte Abbildungen zum Ablauf einer automatisierten Bildaufnahme finden sich in Anhang 6, das ermittelte Protokoll ist im Folgenden wiedergegeben:

- Platzieren der 96-Well Platten auf dem motorisierten Mikroskopoptisch
- Einstellungen des Live-Bilds im Arbeitsbereich „Mikroskop“
- Auswahl des passenden Objektivs, der passenden Aufnahmgeschwindigkeit und Kontrastierung nach Öffnen des Live-Bilds
- Weitere Live-Bild Einstellungen (Belichtungszeit, Weißabgleich, etc.) im Arbeitsbereich „Kameras → AxioCam MR“
- Aufnahme einzelne Bilder durch Aktivierung des „Aufnahme“-Feldes
- Manuelle Definition einer Nullposition auf der 96-Well Platte (standardmäßig Well A1) zur automatischen Bildaufnahme

Zur automatischen Bildaufnahme muss manuell eine Nullposition auf der 96-Well Platte definiert werden, die standardmäßig als Well A1 bestimmt wurde. Dazu wird die Wellposition A1 im Live-Bild-Modus bei einer 2,5fachen Vergrößerung zentral im Blickfeld positioniert. Als nächstes wird das Fenster „Mark + Find“ geöffnet. Hier wird nun die Start-/0-Position manuell festgesetzt. Im Arbeitsbereich „Mehrdimensionale Bildaufnahme“ werden nun folgende Einstellungen in den Untermenüs vorgenommen. Im Untermenü „Experiment“ wird der zu fotografierenden 96-Well Platte ein Dateiname zugeteilt. Zurück im „Mark + Find“ Bereich wird im Untermenü „Multiwell-Grafik“ die Art des zu fotografierenden Objektträgers, sowie dessen relevante Positionen angegeben. Weiterhin kann hier im Untermenü „Fokus“ der Bereich des automatischen Fokus bestimmt werden. Im Untermenü „XY“ im Bereich „Mehrdimensionale Bildaufnahme“ werden die ausgewählten Wellpositionen nun für die automatische Bildaufnahme eingelesen. Weiter wird im Untermenü „C“ unter „Aufnahme“ die optimale Belichtungszeit für die unter „Hardware Einstellungen“ festgelegte Vergrößerung (5x oder 10x) eingestellt und der Autofokus aktiviert. Nach „Start“ wird die Bildaufnahme der gewünschten Positionen mit Hilfe des motorisierten Tisches und der automatischen Fokussierung selbstständig ausgeführt. Die digitalen Bilder wurden in einem Ordner unter entsprechendem Bildnamen mit Angabe der Wellposition gespeichert. Der generelle Zeitbedarf für die automatische Aufnahme aller 96 Sphäroide einer Platte beträgt nun < 10 Minuten (ohne Autofokus) bzw. 12 Minuten (mit Autofokus), gegenüber 30 Minuten pro Platte bei manueller Bildaufnahme.

III.2.2 Bestimmung von Sphäroiddurchmesser und -volumen

Durchmesser und Volumen der in III.2.1 dokumentierten Sphäroide konnten mittels eines eigens hierfür erstellten Skriptes im Softwareprogramm AxioVision 4.5 bestimmt werden. Detaillierte Abbildungen zum Ablauf einer teilautomatisierten Bildanalyse befinden sich in Anhang 7, das ermittelte Protokoll ist im Folgenden wiedergegeben:

Zum Starten der Auswertung wird das Fenster „(Skript) Wiederholen“ geöffnet. Darin werden die Quelldateien und das zu verwendende Skript (hier „Sphäroid“) ausgewählt. Innerhalb des Skriptes wird für jedes Bild zunächst ein „MedianImage“ erstellt, bei dem ein Graustufenweichzeichner angewendet wird. Im Fenster „Schwellwerte interaktiv“ kann nun der zu bestimmende Graustufenbereich manuell angegeben werden. Nach Bestätigen dieses Bereichs wird mit Hilfe des Binärbildeditors über die Zwischenstufen „SegmentedImage“, BinFillImage“ und „BinScrapImage“ ein Binärbild erzeugt, bei dem Löcher automatisch aufgefüllt und Regionen definierter Größe automatisch entfernt werden. An diesem Bild können nochmals abschließende Korrekturen (Entfernen, Hinzufügen) vorgenommen werden, ehe über die Taste „OK“ die Messung gestartet wird. Danach kann der gesamte Ablauf für das folgende Bild wiederholt werden.

Alle Daten eines Ansatzes werden nach Beendigung der Messung des letzten Bildes in einer regionsspezifischen Excel-Tabelle („RegionTableSpheroid“) im Format .csv zusammengefasst. Angegeben werden dabei Sphäroidfläche (Area), durchschnittlicher Sphäroiddurchmesser (Diameter), Sphäroidvolumen (Volume), minimaler und maximaler Sphäroiddurchmesser (FeretMin, FeretMax), Zirkularität (FormCirc) und Dateiname (ImageName).

Abbildung 24 gibt einen Überblick über die Bildaufnahme und -analyse mittels des automatisierten Axiovert 200 M Mikroskopsystems (Zeiss) und der AxioVision 4.5 Software (Zeiss).

Abbildung 24. Überblick über die Bildaufnahme und -analyse von Sphäroiden. Sphäroide wurden in 96-Well Mikrotiterplatten unter Standardbedingungen kultiviert und anschließend auf den motorisierten Objektträgertisch des Axiovert 200 M Inversmikroskops (Zeiss) überführt (rechts). Phasenkontrastbilder wurden in den Vergrößerungen 5x oder 10x Objektiv aufgenommen (siehe 1). Die teilautomatisierte Bildanalyse erfolgte mittels eigens hierfür erstellter Algorithmen im Softwareprogramm AxioVision 4.5 (Zeiss). Die zuverlässige und reproduzierbare Auswahl der Sphäroidfläche (siehe 2 – roter Bereich) ermöglicht die Bestimmung des Sphäroiddurchmessers und -volumens. Eine routinemäßig erzeugte Datentabelle gibt die folgenden morphometrischen Informationen des festgelegten Auswahlbereiches (siehe 3 – rote Markierung) wieder: Sphäroidfläche (Area), durchschnittlicher Sphäroiddurchmesser (Diameter), Sphäroidvolumen (Volume), minimaler und maximaler Sphäroiddurchmesser (FeretMin, FeretMax), Zirkularität (FormCirc) und Dateiname (ImageName). Der Dateinahme richtet sich dabei nach Zelllinie, Datum und Zeitpunkt der Messung, Lokalisation auf der Platte und Plattennummer.

III.3 2-dimensionales Auswachsen von Sphäroidzellen auf Oberflächenbeschichteten 96-Well Mikrotiterplatten

Aus Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe der Betreuerin dieser Doktorarbeit (persönliche Mitteilung Elisabeth Huber) ist bekannt, dass HT29 Sphäroidzellen auf Kollagen Typ I beschichteten Platten ein starkes Auswachsverhalten zeigen. Kollagen Typ I ist in Tumoren häufig sehr stark exprimiert und daher bezüglich der Tumorzellmigration von besonderer Bedeutung. Die Charakterisierung des Auswachsverhaltens von Sphäroid-Kulturen als Kriterium für Zelladhäsion, -migration und -proliferation könnte für ein Wirkstoff-Screening von großem Interesse sein. Deshalb sollte in dieser Arbeit ein Beitrag dazu geleistet werden die Analyse des Auswachsverhaltens von Sphäroiden auf Kollagen Typ I beschichteten 96-Well Mikrotiterplatten zu optimieren.

III.3.1 Auswachsen von HT29-Sphäroiden auf Kollagen Typ I beschichteten Platten

Zunächst sollten verschiedene, mit Kollagen Typ I beschichtete Mikrotiterplatten für ein optimales Auswachsen von HT29 Sphäroiden getestet werden.

Für diese Versuche wurden Microtest™ Zellkulturplatten sowohl mit flachem als auch mit Rundboden (Becton Dickinson) laut II.3.4.1 mit Kollagen Typ I beschichtet. Weiterhin wurden kommerziell erhältliche, Kollagen Typ I beschichtete Flachbodenplatten (BD BioCoat™ Kollagen 1 Cellware, Becton Dickinson) getestet. An Tag 4 nach Aussaat wurden HT29 Sphäroide mit einer 8-Kanalpipette auf die mit Kollagen Typ I beschichtete Mikrotiterplatten transferiert. Das Auswachsverhalten an Tag 4 und 7 wurde mittels Phasenkontrastaufnahmen und manueller Bestimmung der Auswachsfläche in der AxioVision 4.5 Software dokumentiert (siehe Abbildungen 25 & 26).

Das stärkste Auswachsverhalten zeigen HT29 Sphäroidzellen auf eigenbeschichteten Rundbodenplatten. Hier befanden sich fast alle Sphäroide nach dem Umsetzen zentral im Well, was die Gefahr eines randständigen Anwachsens minimiert. In beiden getesteten Typen von Flachbodenplatten lagerten sich die Sphäroide meist am Rand des Wells ab. Beim Auswachsen der Zellen ist die Bestimmung der Auswachsfläche dadurch enorm beeinträchtigt.

Die manuelle Auswertung der Auswachsfläche mit der AxioVision 4.5 Software gestaltete sich aufgrund des geringen Kontrastunterschiedes zwischen Hintergrund und ausgewachsenen Zellen als sehr schwierig (siehe Abbildung 25). Für eine (Teil-)automatisierte Analyse könnte dieser Kontrast, z.B. durch Färbung der Zellkerne verstärkt werden.

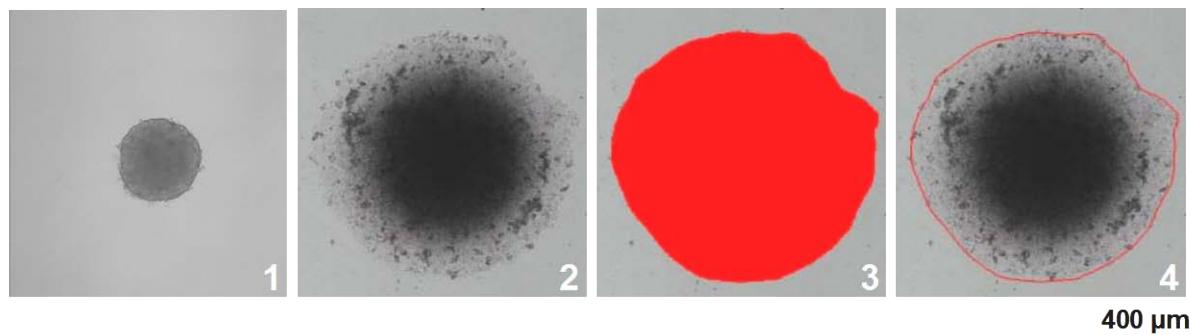


Abbildung 25. Überblick über Analyse des Auswachsverhaltens von HT29 Sphäroiden. Sphäroide wurden in 96-Well Mikrotiterplatten unter Standardbedingungen kultiviert und an Tag 4 nach der Aussaat auf Kollagen Typ I beschichtete Platten überführt (siehe 1). Nach einem definierten Inkubationsintervall (hier 120 h) wurden Phasenkontrastbilder der ausgewachsenen Sphäroidzellen mit der Vergrößerung 10x Objektiv aufgenommen (siehe 2). Die teilautomatisierte Bildanalyse erfolgte mittels eigens hierfür erstellter Algorithmen im Softwareprogramm AxioVision 4.5 (Zeiss), die eine zuverlässige und reproduzierbare Auswahl der Auswachsfläche eines Sphäroids (siehe 3 – roter Bereich) ermöglichen. Eine routinemäßig erzeugte Datentabelle (vgl. Abbildung 24) gibt die folgenden morphometrischen Informationen des festgelegten Auswahlbereiches (siehe 4 – rote Markierung) wieder: Sphäroidfläche (Area), durchschnittlicher Durchmesser der Auswahlfläche (Diameter), minimaler und maximaler Durchmesser der Auswahlfläche (FeretMin, FeretMax), und Dateiname (ImageName).

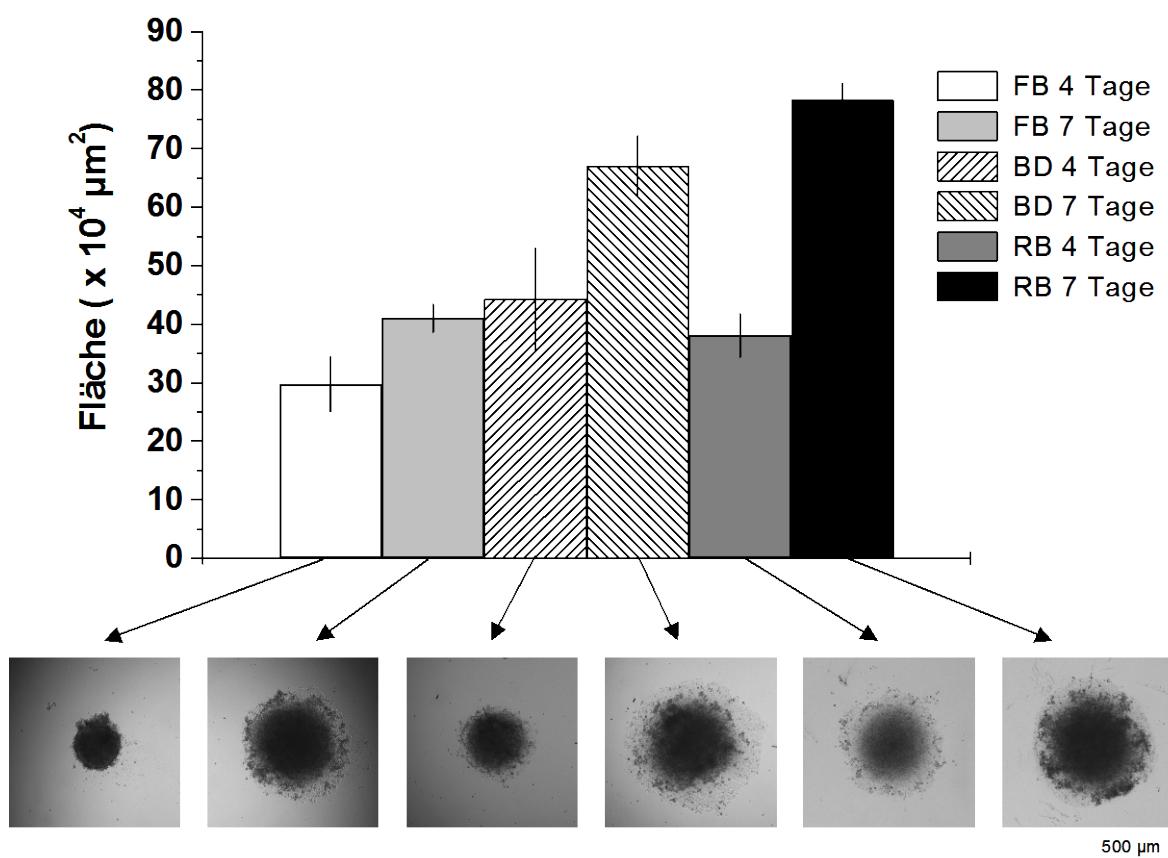


Abbildung 26. Auswachsverhalten von HT29 Sphäroidzellen an Tag 4 und Tag 7 nach Umsetzen auf eigenbeschichtete Flachbodenplatten (FB), BD BioCoat™ Kollagen 1 Cellware Flachbodenplatten (BD) und eigenbeschichtete Rundbodenplatten (RB). Die Auswachsfläche wurde manuell mit Hilfe der AxioVision 4.5 Software ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD für $n = 8$ Sphäroide. Zusätzlich sind repräsentative Phasenkontrastbilder von ausgewachsenen HT29 Sphäroiden abgebildet. Vergrößerung 10x Objektiv.

III.3.2 Hemmung der Proliferation in Sphäroiden mittels Mitomycin C

Bei Langzeituntersuchungen mit 3-5 Tagen Beobachtungszeit, wie für HT29 notwendig, dürfte das Auswachsverhalten der Zellen primär auf Monolayerwachstum bzw. -proliferation beruhen und weniger auf reine Zelladhärenz und Migration zurückzuführen sein. Mit Hilfe des Proliferationshemmers Mitomycin C sollte daher dargestellt werden, ob das Auswachsen von HT29 Sphäroidzellen auf Zellproliferation oder -migration beruht.

Um die Wirksamkeit von Mitomycin C in Sphäroiden zu untersuchen, wurden Sphäroide vor dem Umsetzen wie in II.3.4.2 beschrieben mit Mitomycin C behandelt. Der Nachweis der Wirksamkeit 8 h nach der Behandlung mit dem Proliferationshemmer erfolgte mittels Anti-BrdU-Färbung (siehe II.3.4.2.1) bzw. Ki-67-Färbung (siehe II.3.4.2.2). Eine zytotoxische Wirkung des Mitomycin C in MCTS per se konnte nach Bestimmung der Zellvitalität in unbehandelten und Mitomycin C-behandelten Sphäroiden mittels APH Assay (siehe Kapitel II .5.3) ausgeschlossen werden. Abbildung 27 zeigt, dass sich eine Ki-67-Färbung anscheinend nicht zum Nachweis der Wirksamkeit von Mitomycin C 8 h nach der Behandlung eignet. Eine erste Betrachtung der Sphäroid-Schnittpräparate lässt keinen Unterschied in der Anzahl Ki67-gefärbter – und damit proliferierender – Zellen (dunkelbraun) in den Kontrollen (siehe Abbildung 27a) und behandelten Sphäroiden (siehe Abbildung 27b) erkennen.

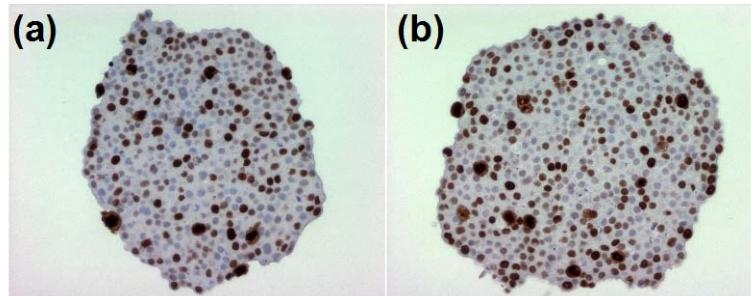


Abbildung 27. Repräsentative Phasenkontrastbilder Ki-67/H&E-gefärbter, 5-6 µm dicker Mittelschnitte von (a) Mitomycin C-unbehandelten und (b) Mitomycin C-behandelten HT29 Sphäroiden 8 h nach Behandlung. Größe der Sphäroide *in vivo*: d = 372 µm (a) und d = 395 µm (b); Vergrößerung 10x Objektiv.

Beim Nachweis mittels Anti-BrdU-Färbung konnte jedoch gezeigt werden, dass Mitomycin C tatsächlich den Einbau von BrdU in die Sphäroidzell-DNA, und folglich die Proliferation von MCTS-Zellen hemmt. 8 h nach der Behandlung mit Mitomycin C beträgt der Anteil proliferierender Zellen in HT29-Sphäroiden lediglich 2,8%, HT29-Kontroll-Sphäroide weisen zum selben Zeitpunkt 11,6% proliferierende Zellen auf (siehe Abbildung 28).

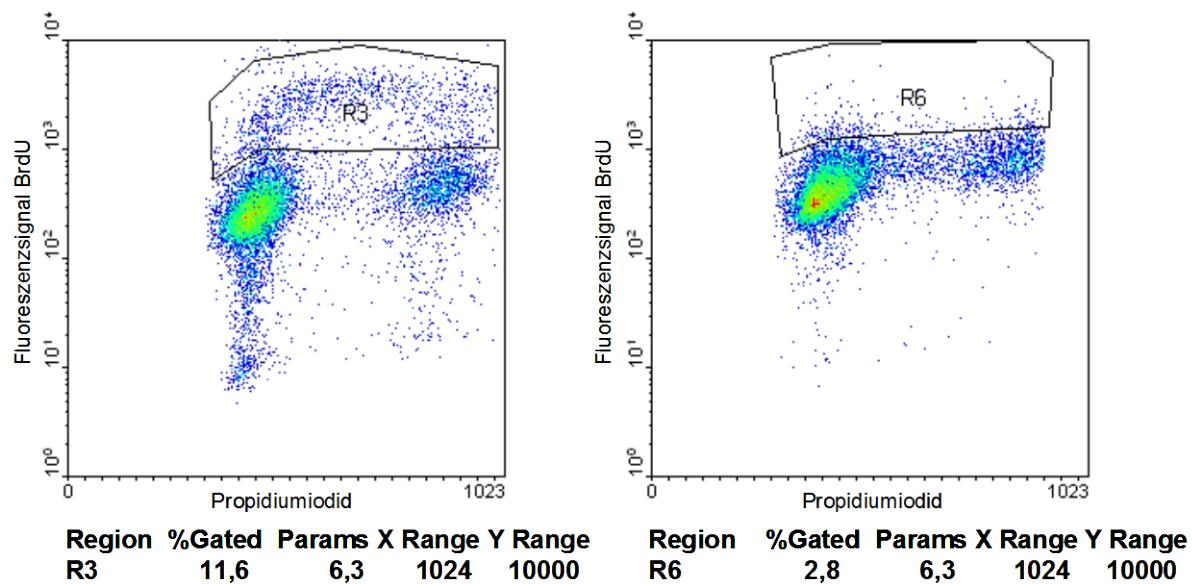


Abbildung 28. Durchflußzytometrische Analyse Mitomycin C-unbehandelter (linkes Diagramm) und Mitomycin C-behandelter (rechtes Diagramm) HT29 Sphäroidzellen. HT29 Zellen wurden für 30 min mit 10 μ mol/l BrdU und 5 μ mol/l dC inkubiert. Nach 3-maligem Waschen wurden die Sphäroide für 8h unter Standardbedingungen inkubiert. Die Färbung der Zellen erfolgte mittleres Anti-BrdU- und sekundärem FITC-Antikörper. Die statistische Auswertung erfolgte mittels regionenspezifischer Auswahlanalyse.

Nachdem die Proliferationshemmende Wirkung von Mitomycin C in Sphäroiden nachgewiesen werden konnte, sollte in ersten Versuchen untersucht werden, ob bereits bei Beobachtungszeiten von bis zu 24 h die Zellproliferation der aus dem Sphäroid auswachsenden Monolayer-Kultur in die Messwert für das Auswachsverhalten eingehen kann. Sphäroide wurden deshalb vor dem Umsetzen wie in II.3.4.2 beschrieben mit Mitomycin C behandelt. Die Auswachsfläche der HT29 Sphäroide wurde 8 h und 24 h nach Zugabe von Mitomycin C ermittelt. Nach 8 h konnte noch kein Unterschied des Auswachsverhaltens unbehandelter und Mitomycin C-behandelter Sphäroide beobachtet werden (Abbildung 29). Nach 24 h jedoch zeigten Mitomycin C-behandelte HT29-Sphäroide im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ein verringertes Auswachsen auf Kollagen Typ 1 beschichteten Rundbodenplatten (Abbildung 29).

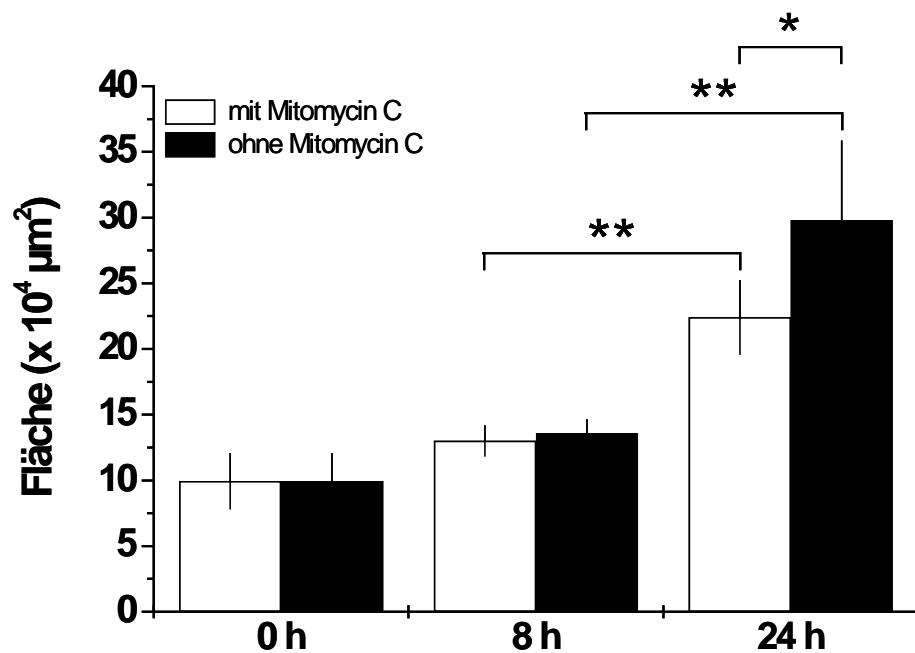


Abbildung 29. Auswachsverhalten Mitomycin C-unbehandelter (schwarze Balken) und Mitomycin C-behandelter (weiße Balken) HT29 Sphäroidzellen 0 h, 8 h, und 24 h nach Umsetzen auf eigenbeschichtete Rundbodenplatten. Die Auswachsfläche wurde manuell mit Hilfe der AxioVision 4.5 Software ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SD für $n = 8$ Sphäroide. Zur statistischen Auswertung wurde ein zweiseitiger TTest verwendet: * $P = 0,05$; ** $P = 0,005$.

III.4 Zellzahlbestimmung/Vitalitätsbestimmung mittels APH Assay

III.4.1 Nachweis eines linearen Zusammenhangs zwischen APH-Signal und Lebendzellzahl in Sphäroiden

Wie bereits erwähnt, wurden bereits verschiedenste Zellvitalitäts-/Zytotoxizitätsassays ohne Erfolg an Sphäroiden getestet (siehe Kapitel I.2.3). In der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht, den auf einer enzymatischen Aktivität beruhenden APH Assay für einen Einsatz an Sphäroiden zu validieren. Erste Tests mit dem APH Assay erfolgten an Sphäroiden der beiden Kolonkarzinomzelllinien HT29 und HCT-116. Zur Bestätigung der Anwendbarkeit des APH Assays für eine zuverlässige und aussagekräftige Bestimmung der Zytotoxizität/Vitalität in Sphäroiden sollte ein linearer Zusammenhang zwischen APH-Signal und der Anzahl lebender Zellen im Sphäroid nachgewiesen werden.

Für die Testung bekannter und neuer Anti-Tumor-Wirkstoffkandidaten, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit vorgesehen war, galt es nekrotische Einflüsse auf die Zytotoxizitäts/Vitalitätsbestimmung nach einer Behandlung zu vermeiden. Für eine Wirkstofftestung kamen also primär Sphäroide mit einem Durchmesser von < 500 - 600 µm in Frage, die noch keine Anzeichen für eine sekundäre Nekrose zeigen (siehe Kapitel I.2.1). Neben den beiden Zelllinien HT29 und HCT-116 sollte der linearer Zusammenhang zwischen APH-Signal und der Anzahl lebender Zellen in Sphäroiden bis zu Größen von 500 - 600 µm auch für fünf weitere Kolonkarzinomzelllinien gezeigt werden.

Für alle Versuche wurden Sphäroide der insgesamt sieben kolorektalen Zelllinien laut Kapitel II.2.2 an aufeinander folgenden Tagen ausgesät. Die Inkubationszeitspanne unter Standardbedingungen reichte dabei, abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit bis zum Erreichen der maximalen Größe der unterschiedlichen Kolonkarzinomzell-Sphäroide, von 4 bis 20 Tagen. Danach wurde an den Sphäroiden unterschiedlicher Größe sowohl die Lebendzellzahl nach Dissoziation, als auch die APH Aktivität mittels APH Assays bestimmt.

III.4.1.1 HT29 Sphäroide

In HT29-Sphäroiden mit Zellzahlen im Bereich von $8,0 \times 10^2$ bis $4,0 \times 10^4$ /Sphäroid war das Absorptionssignal linear (Abbildung 30). Dieser Bereich schließt Sphäroide bis zu einer Größe von $650 \mu\text{m}$ ein und erfüllt somit die gesetzten Anforderungen für eine Wirkstofftestung. HT29 Sphäroide größer als $650 \mu\text{m}$ mit Zellzahlen größer als $4,0 \times 10^4$ /Sphäroid zeigen einen stärkeren Anstieg des Absorptionssignals bei 405 nm. Dieser Anstieg konnte bis jetzt nicht erklärt werden (Friedrich et al. 2007b). Für Sphäroide mit Zellzahlen $> 5,0 \times 10^4$ /Sphäroid ist eine zuverlässige Bestimmung des Absorptionssignals zudem nicht mehr möglich, da die Messwerte über dem angegebenen maximalen Messbereich des Absorptionsmessgerätes ($\text{OD}_{405} = 1,0 - 1,2$) liegen.

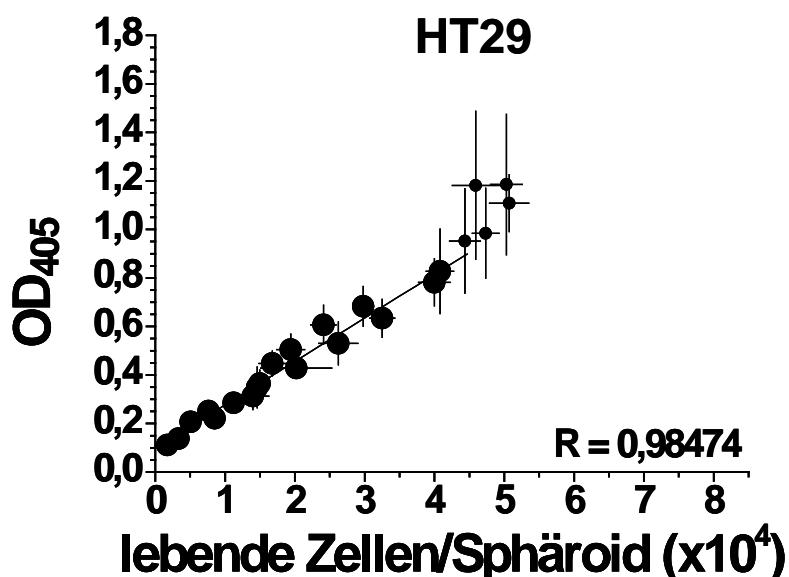


Abbildung 30. Kolorimetrische Messung der APH Aktivität in HT29 Sphäroiden (Mittelwerte $\pm \text{SD}$, $n \geq 8$) als Funktion der mittleren Lebendzellzahl/Sphäroid, ermittelt durch automatische Zellzahlbestimmung nach Sphäroiddissoziation (bis zu einem Durchmesser von $800 \mu\text{m}$). Für jeden Datenpunkt wurden 3 Aliquots mit je 20-25 Sphäroiden gemessen.

III.4.1.2 HCT-116 Sphäroide

In HCT-116 Sphäroiden war das APH Signal bis zu einer maximalen Zellzahl von $8,0 \times 10^4$ /Sphäroid und einem Durchmesser von ungefähr 900 μm linear (Abbildung 31). Die Linearität geht hier weit über den zu untersuchenden Größenbereich von 500 - 600 μm hinaus. Dem Einsatz des APH Assays zur Detektion von Zytotoxizität/Vitalität in HCT-116 Sphäroiden bis zu einer Größe von 600 μm steht somit nichts entgegen (Friedrich et al. 2007b). Ab Zellzahlen von $> 8,0 \times 10^4$ /Sphäroid kann bei HCT-116 Sphäroide ein stärkerer Anstieg des Absorptionssignals bei 405 nm beobachtet werden, der entsprechend den Ergebnissen mit HT29 Sphäroiden bislang nicht geklärt werden konnte.

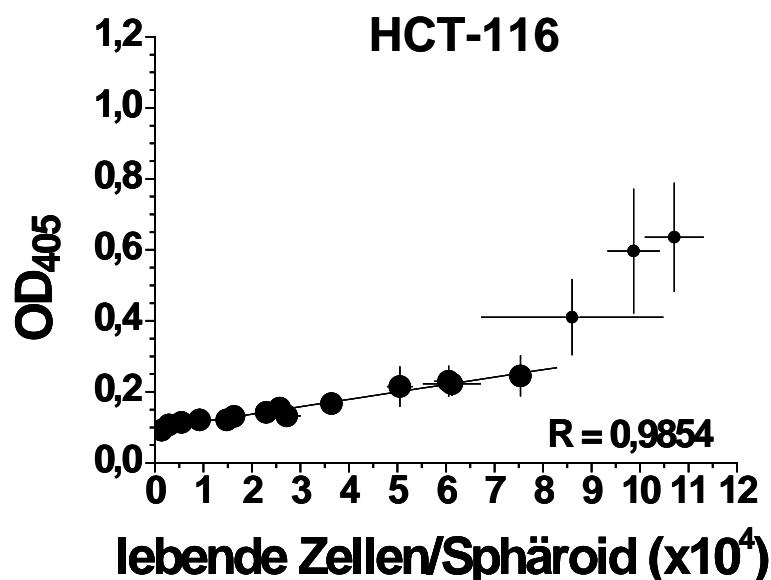


Abbildung 31. Kolorimetrische Messung der APH Aktivität in HCT-116 Sphäroiden (Mittelwerte \pm SD, $n \geq 8$) als Funktion der mittleren Lebendzellzahl/Sphäroid, ermittelt durch automatische Zellzahlbestimmung nach Sphäroiddissoziation (bis zu einem Durchmesser von 1200 μm). Für jeden Datenpunkt wurden 3 Aliquots mit je 20-25 Sphäroiden gemessen.

III.4.1.3 HCT-15 Sphäroide

Für HCT-15-Sphäroide war das Absorptionssignal im Zellzahlbereich von $8,0 \times 10^3$ bis $3,5 \times 10^4$ /Sphäroid linear (Abbildung 32). Dieser Bereich schließt Sphäroide bis zu einer Größe von 530 μm ein und erfüllt somit nur annähernd die gesetzten Anforderungen. Allerdings war aus Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe der Betreuerin dieser Doktorarbeit (persönliche Mitteilung) schon vorher bekannt, dass die Wachstumskurve von Sphäroiden dieser Zelllinie unter Standardbedingungen ab einem kritischen Durchmesser von 530 μm mit dem Zerfall der Sphäroide ohne vorheriges Erreichen eines Plateau-Phase-Wachstums endet.

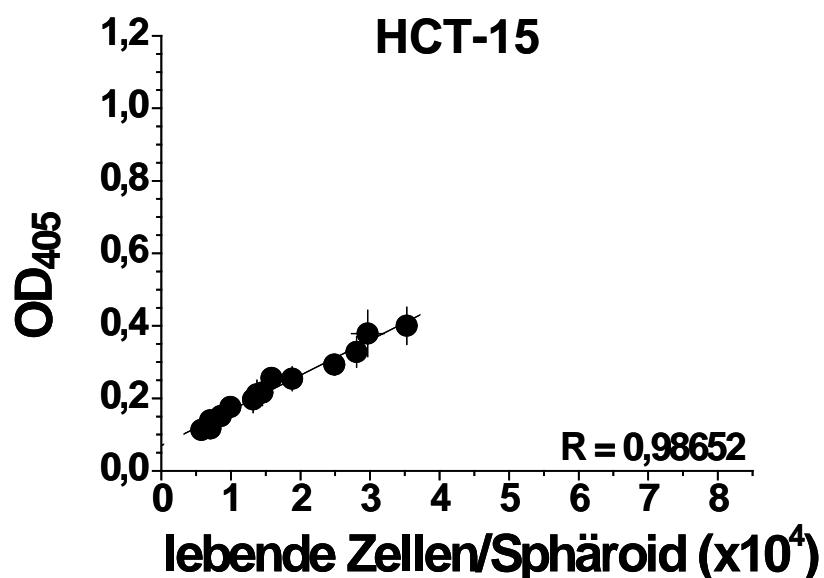


Abbildung 32. Kolorimetrische Messung der APH Aktivität in HCT-15 Sphäroiden (Mittelwerte \pm SD, $n \geq 8$) als Funktion der mittleren Lebendzellzahl/Sphäroid, ermittelt durch automatische Zellzahlbestimmung nach Sphäroiddissoziation (bis zu einem Durchmesser von 530 μm). Für jeden Datenpunkt wurden 3 Aliquots mit je 20-25 Sphäroiden gemessen.

III.4.1.4 DLD-1 Sphäroide

In DLD-1 Sphäroiden konnte die Linearität des APH Signals bis zu einer maximalen Zellzahl von $7,0 \times 10^4$ /Sphäroid und einem Durchmesser von ungefähr 780 μm nachgewiesen werden (Abbildung 33). Eine Wirkstofftestung auf Basis des APH Assays kann an DLD-1 Sphäroiden somit ohne Bedenken durchgeführt werden. Aufgrund des spezifischen Wachstums von DLD-1 Sphäroiden unter Standardbedingungen konnten keine Aussagen über einen linearen Zusammenhang ab einem Sphäroiddurchmesser von 780 μm getroffen werden. Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe (persönliche Mitteilung) zeigten, dass DLD-1 Sphäroide über einem kritischen Durchmesser von 780 μm hinaus nicht mehr weiter wachsen und letztendlich zerfallen.

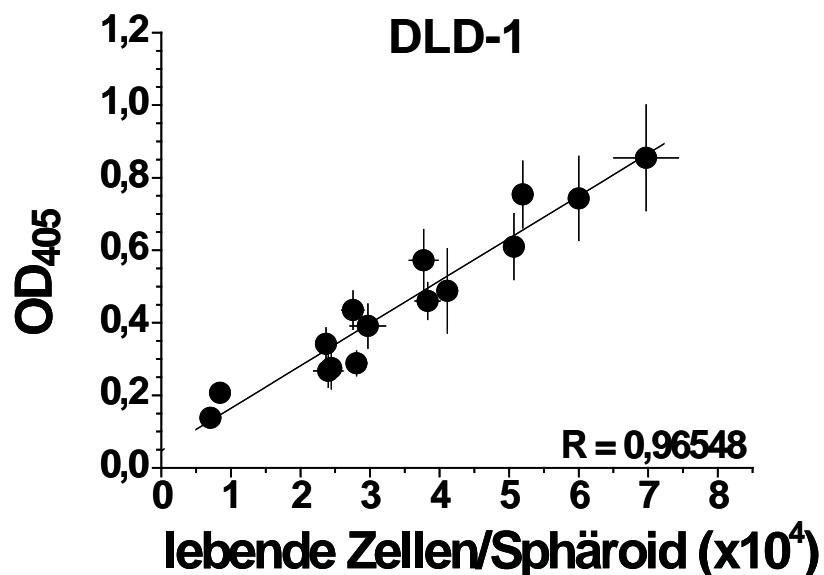


Abbildung 33. Kolorimetrische Messung der APH Aktivität in DLD-1 Sphäroiden (Mittelwerte \pm SD, $n \geq 8$) als Funktion der mittleren Lebendzellzahl/Sphäroid, ermittelt durch automatische Zellzahlbestimmung nach Sphäroiddissoziation (bis zu einem Durchmesser von 780 μm). Für jeden Datenpunkt wurden 3 Aliquots mit je 20-25 Sphäroiden gemessen.

III.4.1.5 KM12L4A Sphäroide

KM12L4A Sphäroiden zeigen in einem Zellzahlbereich von $3,0 \times 10^2$ bis $11,5 \times 10^4$ /Sphäroid einen linearen Zusammenhang zwischen APH Signal und Zellzahl /Sphäroid (Abbildung 34). Die ermittelte maximale Zellzahl/Sphäroid entspricht hier einem Durchmesser von 1000 μm . Auch KM12L4A Sphäroide stehen einer Testung von Anti-Tumor-Wirkstoff-Kandidaten mittels des APH Assays ohne Einfluss einer sekundären Nekrose uneingeschränkt zur Verfügung. Für Sphäroide mit Zellzahlen $> 11,5 \times 10^4$ /Sphäroid lässt sich keine Aussage über die Linearität des Assay Signals zur Zellzahl treffen. Da die Messwerte über dem angegebenen maximalen Messbereich des Absorptionsmessgerätes ($\text{OD}_{405} = 1,0 - 1,2$) liegen, ist eine zuverlässige Bestimmung des Absorptionssignals hier nicht mehr möglich.

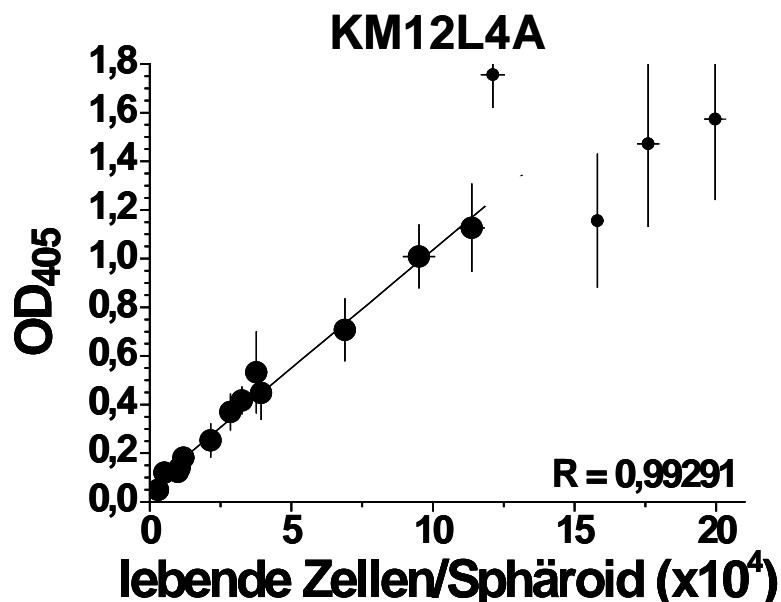


Abbildung 34. Kolorimetrische Messung der APH Aktivität in KM12L4A Sphäroiden (Mittelwerte \pm SD, $n \geq 8$) als Funktion der mittleren Lebendzellzahl/Sphäroid, ermittelt durch automatische Zellzahlbestimmung nach Sphäroiddissoziation (bis zu einem Durchmesser von 1200 μm). Für jeden Datenpunkt wurden 3 Aliquots mit je 20-25 Sphäroiden gemessen.

III.4.1.6 KM20L2 Sphäroide

Der linearen Zusammenhang zwischen APH Signal und Zellzahl/Sphäroid konnte in KM20L2 Sphäroiden bis zu einem maximalen Durchmesser von 830 μm nachgewiesen werden. Bei der Zelllinie KM20L2 entspricht dieser Sphäroiddurchmesser einer Zellzahl von $8,0 \times 10^4/\text{Sphäroid}$ (Abbildung 35). Darüber hinaus ist eine zuverlässige Bestimmung des Absorptionssignals nicht mehr möglich. Auch hier kann aufgrund des limitierten maximalen Messbereiches des Absorptionsmessgerätes ($\text{OD}_{405} = 1,0 - 1,2$) keine Aussage über die Linearität des Assay Signals zur Zellzahl mehr getroffen werden. Da ein linearer Zusammenhang im geforderten Größenbereich gezeigt werden konnte, erfüllen KM20L2 Sphäroide dennoch die Anforderungen für eine Wirkstofftestung mit Hilfe des APH Assays.

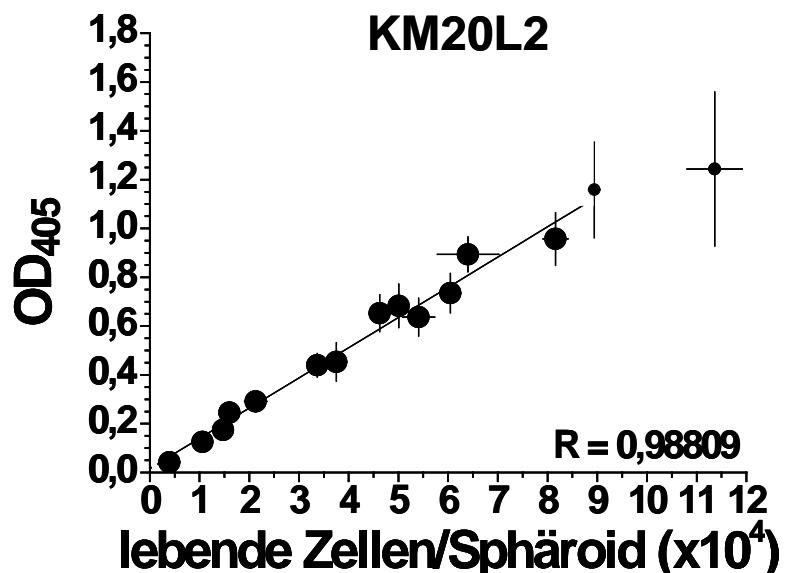


Abbildung 35. Kolorimetrische Messung der APH Aktivität in KM20L2 Sphäroiden (Mittelwerte $\pm \text{SD}$, $n \geq 8$) als Funktion der mittleren Lebendzellzahl/Sphäroid, ermittelt durch automatische Zellzahlbestimmung nach Sphäroiddissoziation (bis zu einem Durchmesser von 930 μm). Für jeden Datenpunkt wurden 3 Aliquots mit je 20-25 Sphäroiden gemessen.

III.4.1.7 WiDr Sphäroide

In WiDr Sphäroiden konnte die Linearität des APH Signals bis zu einer maximalen Zellzahl von $4,7 \times 10^4$ /Sphäroid und einem Durchmesser von ungefähr 760 μm gezeigt werden (Abbildung 36). Eine Wirkstofftestung auf Basis des APH Assays ist mit WiDr Sphäroiden demnach jederzeit durchführbar. Für Sphäroide mit Zellzahlen $> 4,7 \times 10^4$ /Sphäroid ist eine zuverlässige Bestimmung des Absorptionssignals erneut nicht mehr möglich. Die Absorptionssignale für WiDr Sphäroide liegen in diesem Bereich über dem angegebenen maximalen Messbereich des Absorptionsmessgerätes ($\text{OD}_{405} = 1,0 - 1,2$).

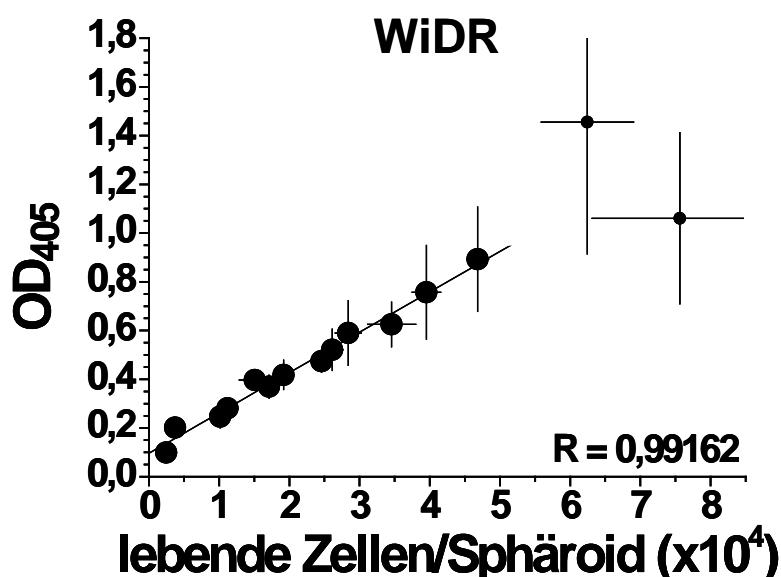


Abbildung 36. Kolorimetrische Messung der APH Aktivität in WiDr Sphäroiden (Mittelwerte \pm SD, $n \geq 8$) als Funktion der mittleren Lebendzellzahl/Sphäroid ermittelt, durch automatische Zellzahlbestimmung nach Sphäroiddissoziation (bis zu einem Durchmesser von 820 μm). Für jeden Datenpunkt wurden 3 Aliquots mit je 20-25 Sphäroiden gemessen.

III.4.1.8 Übersicht der Ergebnisse zur Linearität des APH Signals

Tabelle 20 zeigt eine Übersicht der maximalen Zellzahlen/Sphäroid bzw. der maximalen Sphäroiddurchmesser der jeweiligen Zelllinie, für die eine linearer Zusammenhang zwischen APH Signal und der Zellzahl/Sphäroid nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 20. Übersicht der maximalen Zellzahlen/Sphäroid und der maximalen Sphäroiddurchmesser humaner Kolonkarzinomzelllinien für ein lineares APH Signal.

Zelllinie	maximale Zellzahl/Sphäroid	maximaler Sphäroiddurchmesser
DLD-1	$7,0 \times 10^4$	780 µm
HCT-116	$8,0 \times 10^4$	900 µm
HCT-15	$3,5 \times 10^4$	530 µm
HT29	$4,0 \times 10^4$	650 µm
KM12L4A	$11,5 \times 10^4$	1000 µm
KM20L2	$8,0 \times 10^4$	830 µm
WiDr	$4,7 \times 10^4$	760 µm

III.4.2 Vergleich der Lebendzellzahl und des APH-Signals in 5-Fluorouracil-behandelten HT29-Sphäroiden

Nachdem ein linearer Zusammenhang von APH Assaysignal und der Anzahl lebender Zellen in HT29 Sphäroiden bis zu einer Größe von 600 µm nachgewiesen werden konnte, sollte nun die APH Aktivität der Anzahl lebender Zellen in dissozierten HT29 Sphäroiden nach einer Behandlung mit 5-Fluorouracil (5-FU) gegenübergestellt werden. Ist der APH Assay tatsächlich ein zuverlässiges Mittel, um die Wirksamkeit eines Wirkstoffes in Sphäroiden zu untersuchen, so sollte das Assay Signal mit der Anzahl lebender Zellen in behandelten Sphäroiden korrelieren.

Für diese Fragestellung wurden Sphäroide an Tag 4 nach der Aussaat für 72 h mit 5-FU behandelt. Der Sphäroiddurchmesser bei Behandlungsbeginn betrug 380 bis 400 µm, was ca. $(0,9-1) \times 10^4$ lebenden Zellen entspricht. Die Wirksamkeit von 5-FU wurde relativ zur entsprechenden unbehandelten Kontrolle (= 100%) ausgewertet. Bei den Kontrollen lag der Totzellanteil unter 10%, Sphäroide zeigten kein nekrotisches/apoptotisches Zentrum. Bei den Analysemethoden zeigte sich für den eingesetzten 5-FU Konzentrationsbereich ein vergleichbarer Kurvenverlauf, die APH Aktivität spiegelt also tatsächlich das Zellüberleben in HT29 Sphäroiden nach einer Behandlung wider (Friedrich et al. 2007b). Auffallend ist, dass bei der automatischen Zellzahlanalyse dissoziierter Sphäroide der Wirkstoffeffekt reproduzierbar um

10% - 20% höher ist (siehe Abbildung 37). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit soll dieser Aspekt eingehend diskutiert werden.

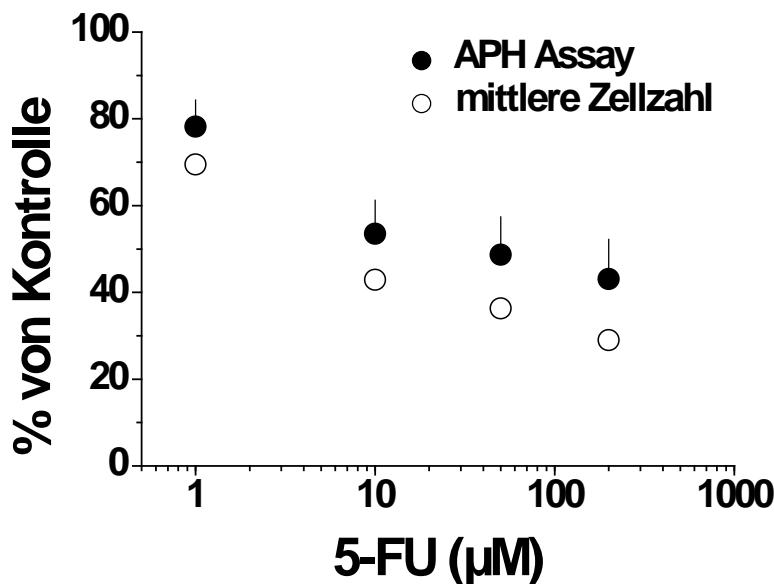


Abbildung 37. Vergleich von APH Aktivität (APH Assay) und Lebendzellzahl in dissoziierten HT29 Sphäroiden. Behandlung mit 5-Fluorouracil (5-FU) für 72 h an Tag 4 nach Aussaat. Die Wirksamkeit von 5-FU wurde relativ zur entsprechenden unbehandelten Kontrolle verzeichnet. Kontrollen wurden gemittelt und auf 100% festgelegt. Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SDs (8 \leq n \leq 16 für APH Assay; n = 3 für Dissoziation mit je 8 Sphäroiden).

III.5 Detektion anti-tumoraler Effekte in Monolayer- und Sphäroid-Kulturen der beiden Kolonkarzinomzelllinien HT29 und HCT-116

Durch die oben genannten Vorarbeiten zum APH Assays war es möglich, die Wirkstoffwirksamkeit verschiedener Substanzen in Monolayer- und MCTS-Kulturen vergleichend zu untersuchen. Zur Wirkstofftestung wurde eine Gruppe von zehn bereits bekannten Wirkstoffen (Doxorubicin, Paclitaxel, Carboplatin, Cisplatin, 5-Fluorouracil, Cyclophosphamid, Mitoxantron, CCNU/Lomustin, Epidoxorubicin und Irinotecan) und zwei neue Anti-Tumor-Wirkstoff-Kandidaten (WMC-79 und C-1311) ausgewählt. Monolayer- (600 Zellen/Well) und Sphäroid-Kulturen (1500 bzw. 750 Zellen/Well) wurden ausgesät, für 96 h unter Standardbedingungen inkubiert und anschließend für 72 h behandelt (siehe II.4). Die Substanzen wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,1-200 μ M eingesetzt, Ausnahmen hierbei waren Epidoxorubicin, Mitoxantron (0,001-200 μ M), WMC-79 (0,00001-200 μ M) und Paclitaxel (0,00001-50 μ M). In den meisten Fällen nahm das APH Assaysignal nach einer Behandlung relativ zur unbehandelten Kontrolle abhängig von der eingesetzten Konzentration reproduzierbar ab. Als Beispiel für die hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des APH Assays an Sphäroiden zeigt Abbildung 38 die Vitalitätsbestimmung für drei individuelle Experimente.

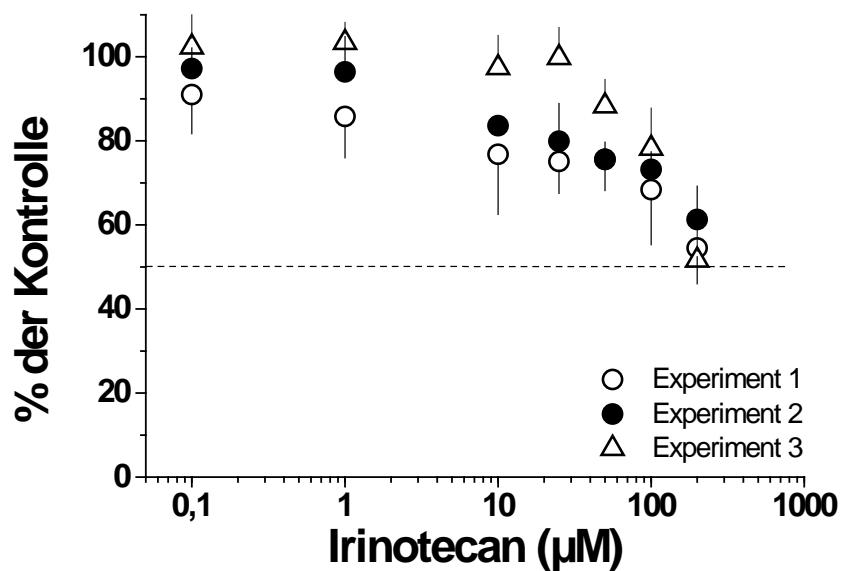


Abbildung 38. APH Aktivität/ Zellvitalität in HT29 Sphäroid-Kulturen nach 72-stündiger Behandlung mit Irinotecan. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für $n = 8$ behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Gezeigt sind 3 individuelle Experimente.

Mit Hilfe der GraphPad Prism 4 Software wurde die Wirksamkeit der einzelnen Wirkstoffe als sigmoidale Dosis-Wirkungskurven mit variabler Neigung (= slope) dargestellt. Den Berechnungen lag dabei folgende Gleichung zu Grunde:

$$y = \text{Bottom} + \frac{(\text{Top} - \text{Bottom})}{10(\text{LogIC}_{50} - x) * \text{Hill Slope}}$$

Bottom: niedrigster y-Wert der Kurve

Top: höchster y-Wert der Kurve

IC_{50} : (= Konzentration, die nötig ist, um die Zellvitalität *in vitro* um 50% zu inhibieren)

Hill Slope: Maß für die Steilheit der Kurve

Die Variable „Hill Slope“ beschreibt die Steilheit der Dosis-Wirkungskurve. Ist sie positiv, so steigt die Kurve mit wachsendem x-Werten an. Bei negativen Werten für den Hill Slope sinkt der Kurvenverlauf mit steigendem x. Für Standard-Dosis-Wirkungskurven mit sigmoidalem Verlauf ist der Hill Slope auf 1,0 festgesetzt.

Die berechneten IC_{50} Werte konnten zudem dazu verwendet werden, um den Unterschied einer Behandlung in 2-D gegenüber 3-D Zellkulturen hervorzuheben.

Zusätzlich zur Bestimmung anti-tumoraler Effekte mittels des APH Assays wurde für jeden Versuchsansatz das Sphäroidvolumenwachstum und die -integrität nach einer Behandlung aufgezeichnet und bewertet. Für die Bestimmung des Volumenwachstums wurde das Sphäroidvolumen am Tag der Behandlung (V_{d4}) und nach dem 72-stündigen Inkubationsintervall (V_{d7}) bestimmt.

III.5.1 DNA/RNA Antimetaboliten

III.5.1.1 5-Fluorouracil

Bei einer Applikation von $0,1 \mu\text{M}$ 5-Fluorouracil konnte eine nur unerhebliche Reduktion des Assaysignals in HT29 Monolayer- und Sphäroid-Kulturen beobachtet werden. Eine Behandlung von Monolayerkulturen mit $200 \mu\text{M}$ 5-Fluorouracil resultierte letztendlich in einem Verlust der Zellviabilität von mehr als 30%. Der berechnete IC_{50} Wert für Monolayerkulturen liegt bei $5,6 \pm 3,3 \mu\text{M}$ (Abbildung 39). HT29 Sphäroide zeigten eine deutlich verringerte Sensitivität gegenüber 5-FU. Bei einer maximalen Wirkstoffkonzentration von $200 \mu\text{M}$ wurde in Sphäroiden keine Reduktion des APH Signals um 50% erreicht. Ein IC_{50} Wert kann für den verwendeten Konzentrationsbereich somit nicht angegeben werden (Abbildung 39).

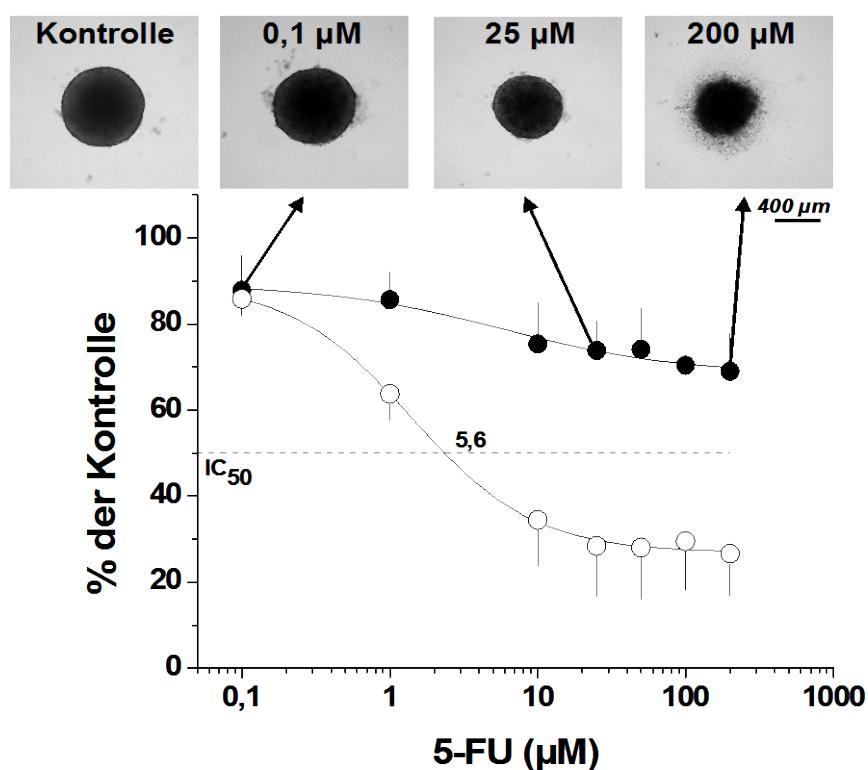


Abbildung 39. APH Aktivität/ Zellvitalität in HT29 Monolayer- (○) und Sphäroid-Kulturen (●) nach 72-stündiger Behandlung mit 5-Fluorouracil (5-FU). Alle Datenpunkte der Dosis-Wirkungskurven sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 3$ individuelle Experimente mit je 8 behandelten und gemessenen Wells bzw. Sphäroiden pro Bedingung. Repräsentative Phasenkontrastbilder zeigen die Sphäroidintegrität nach Behandlung mit $0 \mu\text{M}$, $0,1 \mu\text{M}$, $25 \mu\text{M}$ und $200 \mu\text{M}$ 5-FU. Vergrößerung 10x Objektiv. Hill Slope: Monolayer -0,3725; Sphäroid -0,1649.

Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass eine Behandlung mit $200 \mu\text{M}$ 5-FU das Volumenwachstum von HT29 Sphäroiden um mehr ca. 90% relativ zur unbehandelten Kontrolle hemmt (Abbildung 40). Bereits ab Dosen $\geq 25 \mu\text{M}$ wurde eine Reduktion des Volumenwachstums von mehr als 50% beobachtet. Bei Beurteilung der Sphäroidintegrität fiel auf, dass das

Wachstum von Sphäroiden bei einer Behandlung mit der maximalen Wirkstoffkonzentration nicht nur verlangsamt/gehemmt ist, sondern sich vielmehr Zellen aus dem 3-D Verbund lösen (Abbildung 39). Trotz dieses Zellverlustes lag das APH Assay Signal immer noch bei 70% relativ zur unbehandelten Kontrolle.

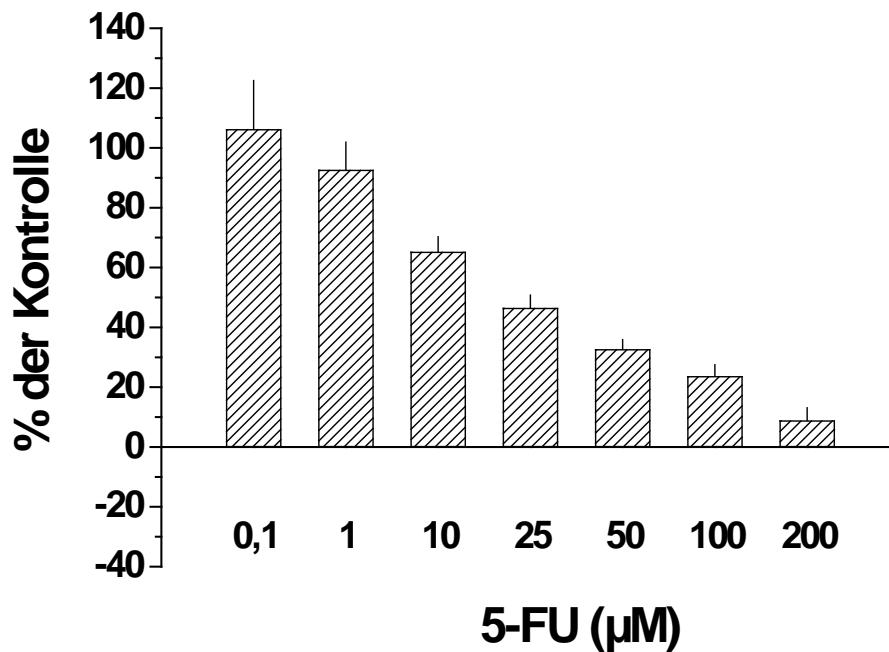


Abbildung 40. Volumenwachstum von HT29 Sphäroiden nach 72-stündiger Behandlung mit 5-FU. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für 8 behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Berechnet wurde $\Delta V = V_{d7} - V_{d4}$, das Volumenwachstum ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ($\Delta V_{\text{Kontrolle}} = 100\%$) dargestellt.

Bereits bei einer Applikation von 0,1 μM 5-Fluorouracil konnte in HCT-116 Monolayerkulturen eine leichte Reduktion des Assaysignals beobachtet werden. Eine Behandlung mit 200 μM 5-Fluorouracil resultierte letztendlich in einem Verlust der Zellzahl von mehr als 90%. Der berechnete IC_{50} Wert für Monolayerkulturen liegt bei $7,4 \pm 2,9 \mu\text{M}$ (Abbildung 41). Die Daten der HCT-116 Sphäroide unterscheiden sich erst in Dosen $> 25 \mu\text{M}$ deutlich von den Ergebnissen der Monolayerkulturen. Sphäroide zeigen in diesem Bereich eine deutlich verringerte Sensitivität gegenüber 5-FU. Bei einer maximalen Wirkstoffkonzentration von 200 μM kam es in Sphäroiden zu keiner Reduktion des APH Signals um mehr als 70%. Der IC_{50} Wert für MCTS-Kulturen wurde auf $23,6 \pm 19,7 \mu\text{M}$ bestimmt (Abbildung 41).

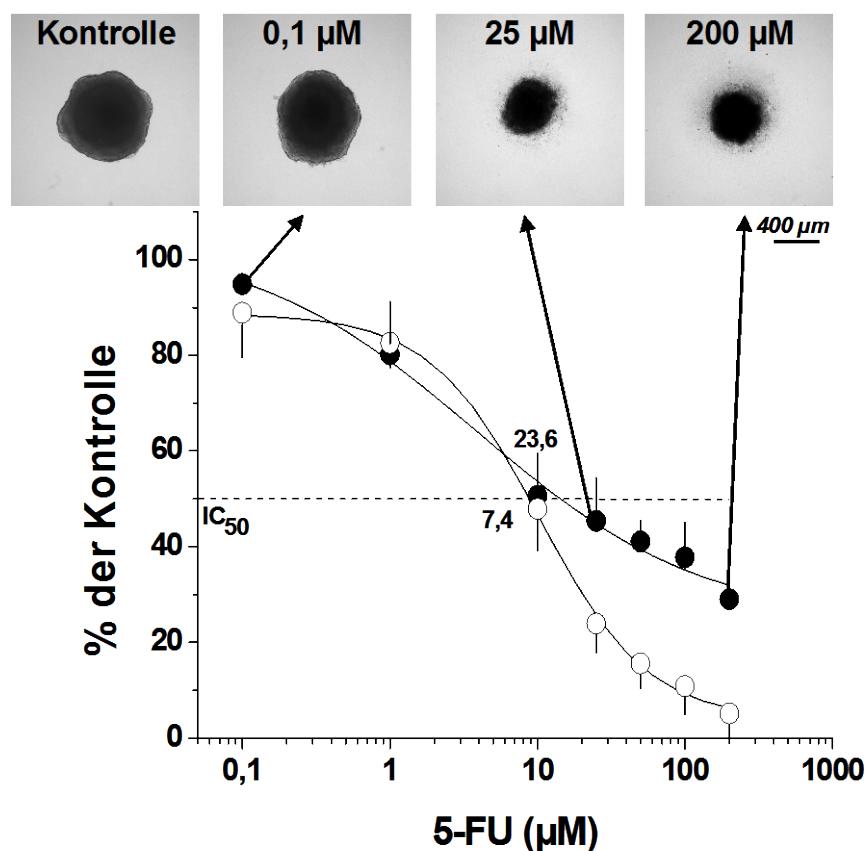


Abbildung 41. APH Aktivität/ Zellvitalität in HCT-116 Monolayer- (○) und Sphäroid-Kulturen (●) nach 72-stündiger Behandlung mit 5-FU. Alle Datenpunkte der Dosis-Wirkungskurven sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 3$ individuelle Experimente mit je 8 behandelten und gemessenen Wells bzw. Sphäroiden pro Bedingung. Repräsentative Phasenkontrastbilder zeigen die Sphäroidintegrität nach Behandlung mit 0 μ M, 0,1 μ M, 25 μ M und 200 μ M 5-FU. Vergrößerung 10x Objektiv. Hill Slope: Monolayer -0,6638; Sphäroid -0,3793.

Die Analyse des Volumenwachstums lässt auf eine stärkere Wirkung von 5-FU auf HCT-116 Sphäroide schließen. So verringerte sich das Wachstum bei einer Behandlung mit 10 μ M bereits um 85% relativ zur unbehandelten Kontrolle. In Dosen $\geq 25 \mu$ M nahm das Sphäroidvolumen nach 72-stündiger Behandlung im Vergleich zum Ausgangsvolumen - bestimmt beim Beginn der Behandlung - ab (Abbildung 42). Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen der Sphäroidintegrität überein, da für Konzentrationen $\geq 25 \mu$ M eine zunehmende Ablösung von Zellen aus den Sphäroiden gezeigt werden konnte (Abbildung 41). Dennoch lag die Enzymaktivität, die mittels des APH Assays bestimmt wurde in Sphäroiden nach der Behandlung mit der maximalen Wirkstoffkonzentration immer noch bei 30% relativ zur unbehandelten Kontrolle.

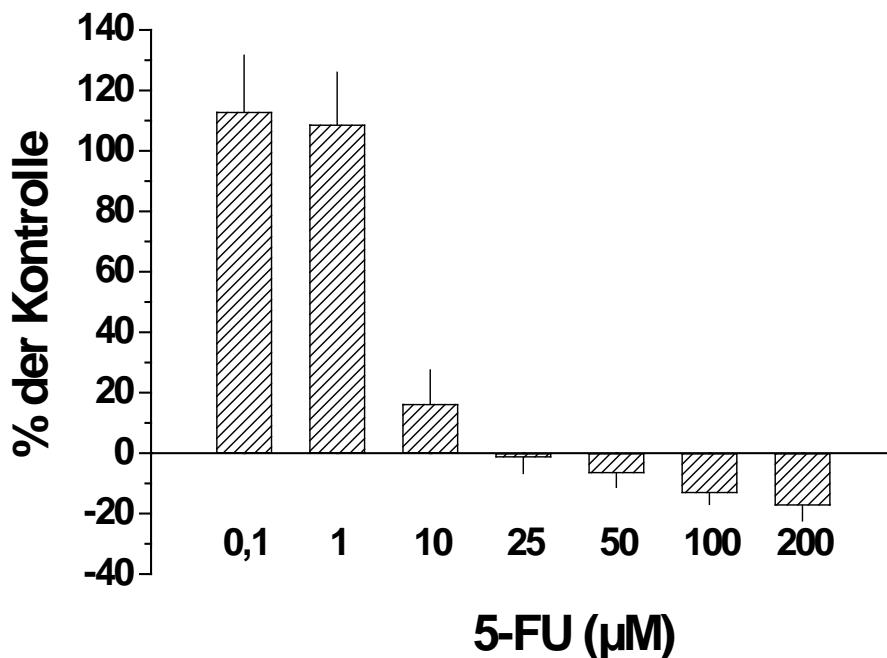


Abbildung 42. Volumenwachstum von HCT-116 Sphäroiden nach 72-stündiger Behandlung mit 5-FU. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für 8 behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Berechnet wurde $\Delta V = V_{d7} - V_{d4}$, das Volumenwachstum ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ($\Delta V_{\text{Kontrolle}} = 100\%$) dargestellt.

III.5.2 Alkylierende Substanzen

III.5.2.1 Cyclophosphamid

Keine verringerte Enzymaktivität zeigten sowohl HT29 Monolayer- als auch Sphäroid-Kulturen nach Behandlung mit Cyclophosphamid (Abbildung 43). Bei einer maximalen Konzentration von 200 μM konnte eine Reduktion des Assaysignals um lediglich 10-15% beobachtet werden. Im eingesetzten Konzentrationsbereich konnten somit weder für Monolayer- noch für Sphäroid-Kulturen IC_{50} Werte berechnet werden. Auch die Analyse der Sphäroidintegrität (Abbildung 43) und des Volumenwachstums zeigte keinen Effekt von Cyclophosphamid auf HT29 Sphäroide (Abbildung 44).

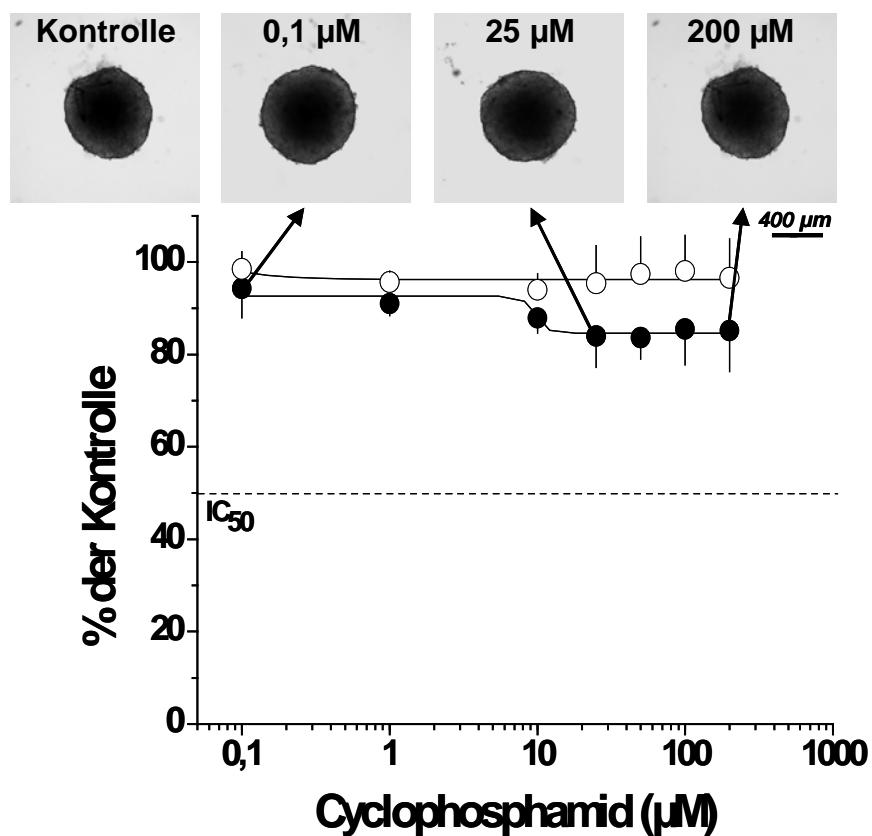


Abbildung 43. APH Aktivität/ Zellvitalität in HT29 Monolayer- (○) und Sphäroid-Kulturen (●) nach 72-stündiger Behandlung mit Cyclophosphamid. Alle Datenpunkte der Dosis-Wirkungskurven sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 3$ individuelle Experimente mit je 8 behandelten und gemessenen Wells bzw. Sphäroiden pro Bedingung. Repräsentative Phasenkontrastbilder zeigen die Sphäroidintegrität nach Behandlung mit 0 μ M, 0,1 μ M, 25 μ M und 200 μ M Cyclophosphamid. Vergrößerung 10x Objektiv. Hill Slope: Monolayer -0,01460; Sphäroid -0,1252.

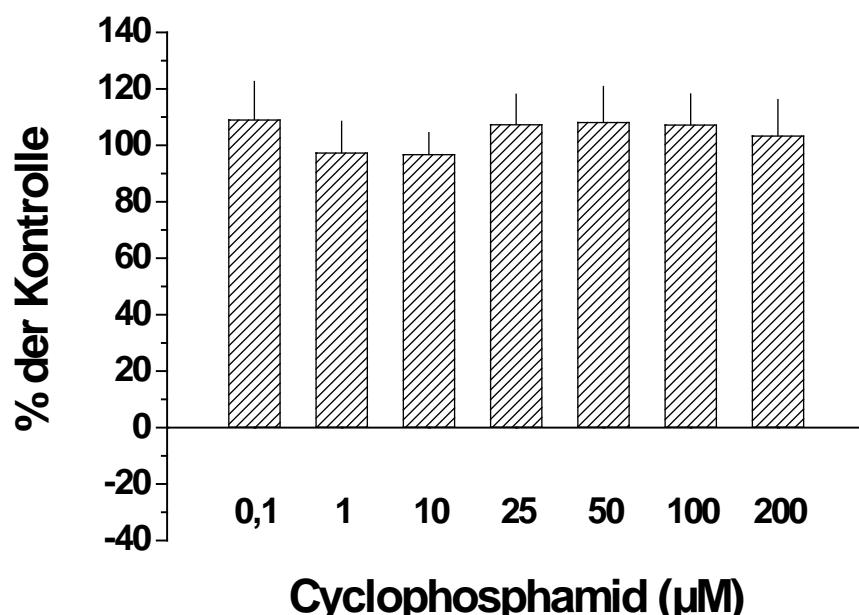


Abbildung 44. Volumenwachstum von HT29 Sphäroiden nach 72-stündiger Behandlung mit Cyclophosphamid. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für 8 behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Berechnet wurde $\Delta V = V_{d7} - V_{d4}$, das Volumenwachstum ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ($\Delta V_{\text{Kontrolle}} = 100\%$) dargestellt.

Cyclophosphamid zeigte in HCT-116 Monolayerkulturen für den eingesetzten Konzentrationsbereich nur eine geringe Reduktion der Enzymaktivität. Bei einer maximalen Konzentration von 200 μ M konnte eine Reduktion des Assaysignals um lediglich 10% beobachtet werden. Ein IC_{50} Wert konnte somit nicht berechnet werden (Abbildung 45). Dagegen wurde eine deutliche Zunahme des Wirkstoffeffekts von Cyclophosphamid in HCT-116 Sphäroiden mit steigender Konzentration verzeichnet. Letztendlich konnte durch Applikation von 200 μ M Wirkstoff die Enzymaktivität um ~ 50% verringert werden (Abbildung 45). Der IC_{50} Wert liegt somit an der oberen Grenze des eingesetzten Konzentrationsbereich bei ≥ 200 μ M. Die Analyse des Volumenwachstums zeigte im Vergleich zur Dosis-Wirkungskurve einen ähnlichen Verlauf. Erst Konzentrationen ≥ 25 μ M zeigen eine Effekt auf das Wachstum von HCT-116 Sphäroiden. Eine Behandlung mit 200 μ M Cyclophosphamid resultierte in einer maximalen Reduktion des Volumenwachstums von 70% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 46). Das verringerte Volumen dieser Sphäroide kann nicht auf eine Absonderung von Zellen zurückgeführt, alle Sphäroid zeigen ein gleichförmiges Wachstum und sind intakt (Abbildung 45).

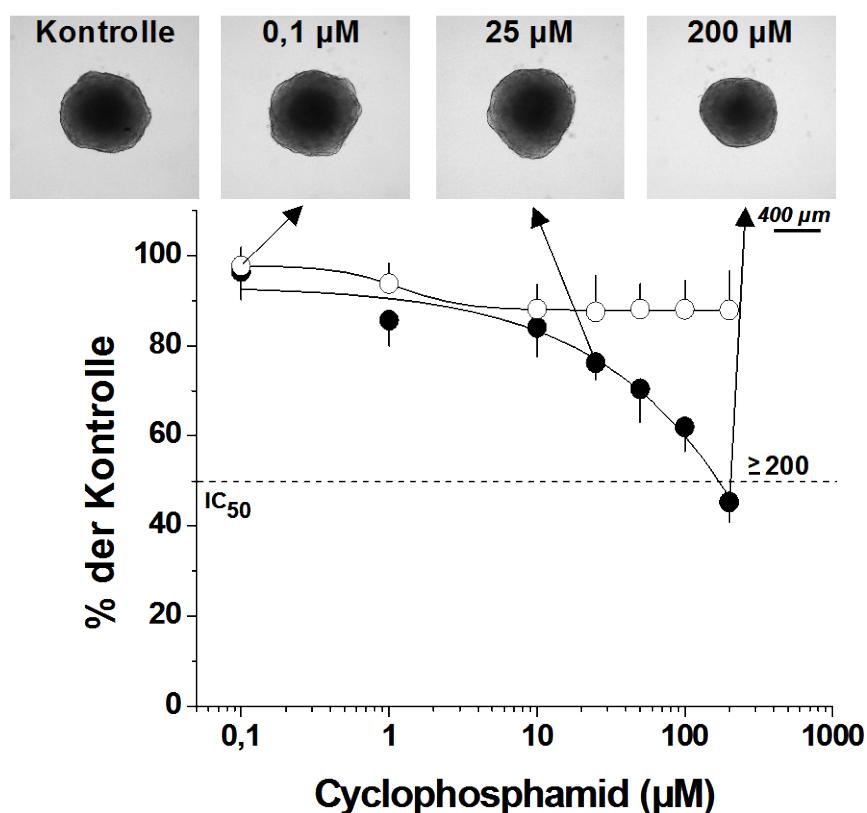


Abbildung 45. APH Aktivität/ Zellvitalität in HCT-116 Monolayer- (○) und Sphäroid-Kulturen (●) nach 72-stündiger Behandlung mit Cyclophosphamid. Alle Datenpunkte der Dosis-Wirkungskurven sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 3$ individuelle Experimente mit je 8 behandelten und gemessenen Wells bzw. Sphäroiden pro Bedingung. Repräsentative Phasenkontrastbilder zeigen die Sphäroidintegrität nach Behandlung mit 0 μ M, 0,1 μ M, 25 μ M und 200 μ M Cyclophosphamid. Vergrößerung 10x Objektiv. Hill Slope: Monolayer $2,981 \times 10^{-6}$; Sphäroid: -0,5028.

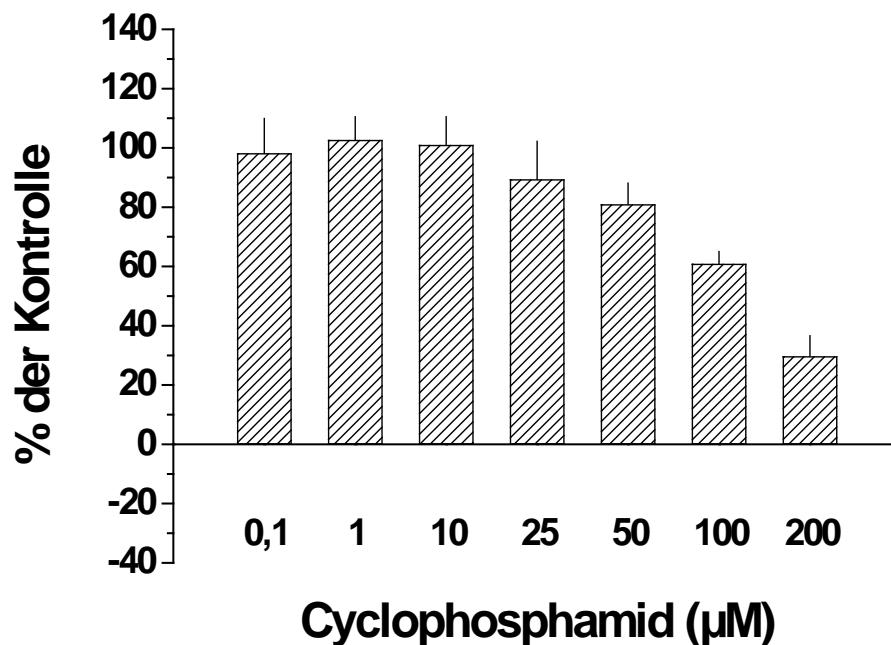


Abbildung 46. Volumenwachstum von HCT-116 Sphäroiden nach 72-stündiger Behandlung mit Cyclophosphamid. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für 8 behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Berechnet wurde $\Delta V = V_{d7} - V_{d4}$, das Volumenwachstum ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ($\Delta V_{\text{Kontrolle}} = 100\%$) dargestellt.

III.5.2.2 Carboplatin

Nach den Ergebnissen des APH Assays ist Carboplatin in HT29 Zellen sowohl in Monolayer- als auch in Sphäroid-Kultur unwirksam. Bei einer maximalen Konzentration von 200 μM konnte eine Reduktion des Assaysignals um lediglich 20% beobachtet werden. Im eingesetzten Konzentrationsbereich konnten somit weder für Monolayer- noch für Sphäroid-Kulturen IC_{50} Werte berechnet werden (Abbildung 47). Im Gegensatz dazu zeigte die Analyse des Volumenwachstums sehr wohl einen Effekt von Carboplatin auf HT29 Sphäroide. So wurde bei Behandlung mit 200 μM Carboplatin das Volumenwachstums auf 35% relativ zur unbehandelten Kontrolle reduziert (Abbildung 48). Da auch bei Einsatz der höchsten Wirkstoffkonzentration alle behandelten Sphäroide nach 72 h intakt und nicht zerfallen sind, kann das verringerte Volumenwachstum nicht auf einen Zellverlust zurückgeführt werden (Abbildung 47).

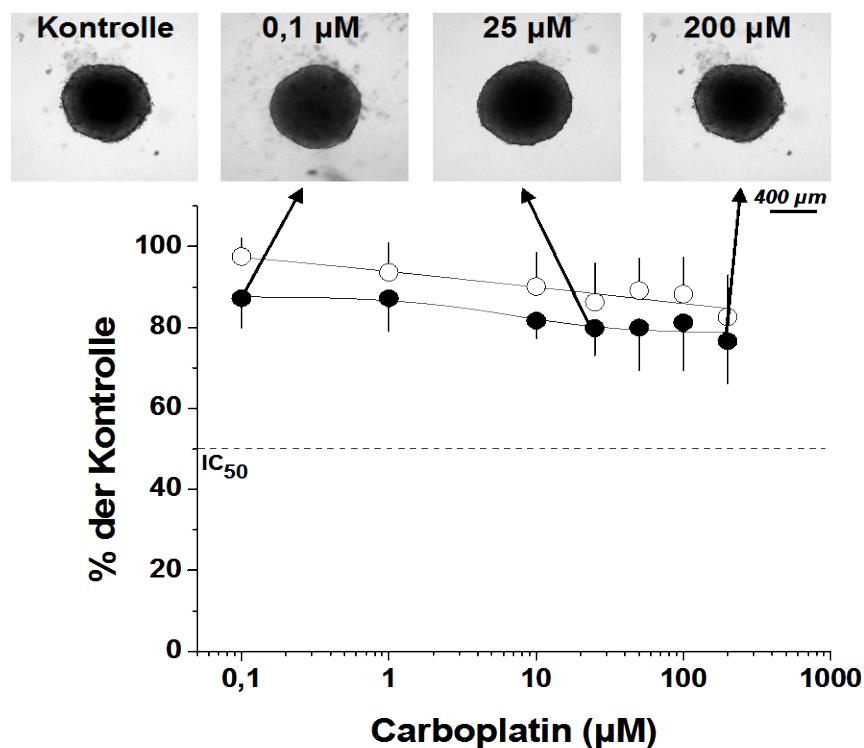


Abbildung 47. APH Aktivität/ Zellvitalität in HT29 Monolayer- (○) und Sphäroid-Kulturen (●) nach 72-stündiger Behandlung mit Carboplatin. Alle Datenpunkte der Dosis-Wirkungskurven sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 3$ individuelle Experimente mit je 8 behandelten und gemessenen Wells bzw. Sphäroiden pro Bedingung. Repräsentative Phasenkontrastbilder zeigen die Sphäroidintegrität nach Behandlung mit 0 μ M, 0,1 μ M, 25 μ M und 200 μ M Carboplatin. Vergrößerung 10x Objektiv. Hill Slope: Monolayer -0,2019; Sphäroid -0,09751.

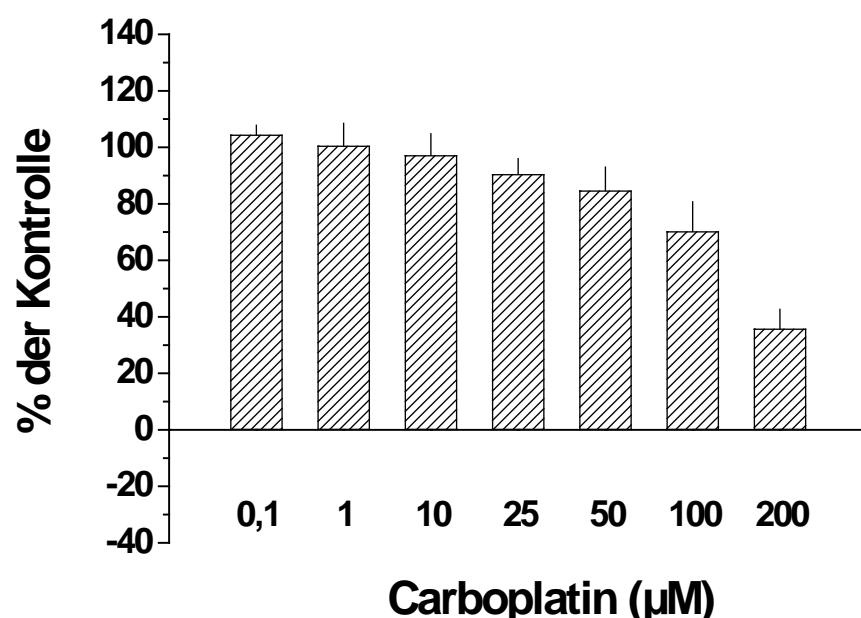


Abbildung 48. Volumenwachstum von HT29 Sphäroiden nach 72-stündiger Behandlung mit Carboplatin. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für 8 behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Berechnet wurde $\Delta V = V_{d7} - V_{d4}$, das Volumenwachstum ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ($\Delta V_{\text{Kontrolle}} = 100\%$) dargestellt.

In HCT-116 Kulturen zeigte die Behandlung mit Carboplatin eine ähnliche Wirkung wie auf HT29 Zellen. Auch hier konnte mittels des APH Assays weder im Monolayer noch im Sphäroid ein Effekt auf das Zellüberleben beobachtet werden. Bei einer maximalen Konzentration von 200 μ M wurde eine Reduktion des Enzymaktivität um lediglich 10% festgestellt. Im eingesetzten Konzentrationsbereich konnten somit weder für Monolayer- noch für Sphäroid-Kulturen IC₅₀ Werte ermittelt werden (Abbildung 49). Die Berechnung des Volumenwachstums wiederum zeigte erneut einen deutlichen Effekt von Carboplatin auf das Wachstum von MCTS. Bereits 100 μ M Carboplatin hemmen das Volumenwachstums von HCT-116 Sphäroiden um ca. 50%, eine Behandlung mit 200 μ M Carboplatin ergab eine Reduktion um 70% relativ zur unbehandelten Kontrolle reduziert (Abbildung 50). Nach Beurteilung der Sphäroidintegrität konnte festgestellt werden, dass HCT-116 Sphäroide, die für 72 h einer Wirkstoffkonzentration von 200 μ M ausgesetzt waren, keine Anzeichen eines Zerfalls bzw. einer Ablösung von Zellen aufweisen (Abbildung 49).

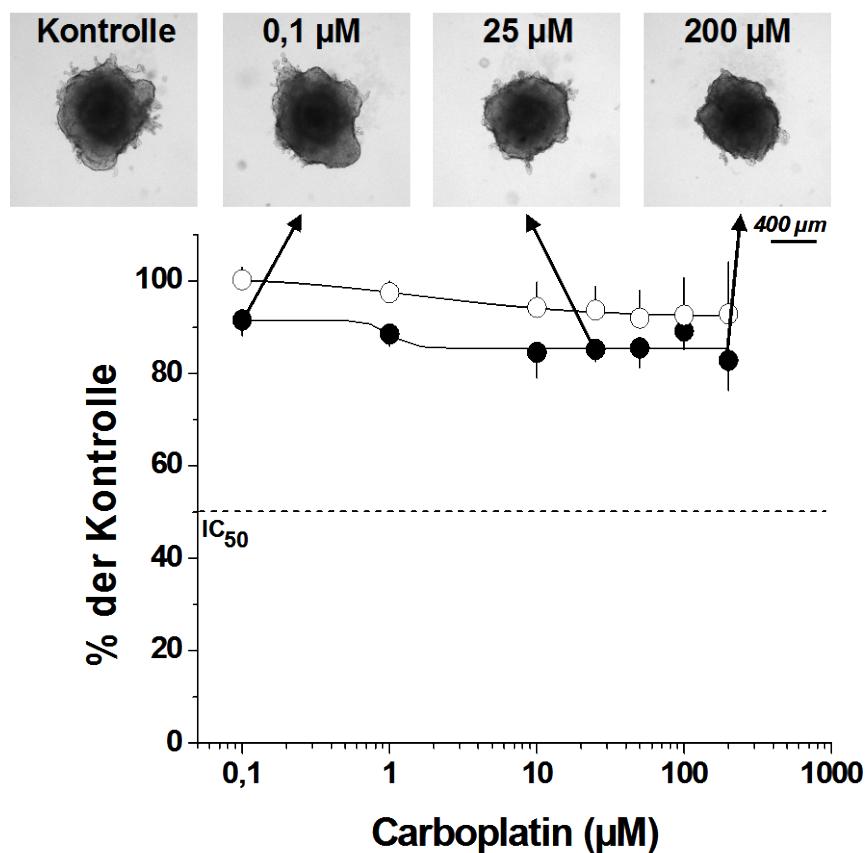


Abbildung 49. APH Aktivität/ Zellvitalität in HCT-116 Monolayer- (○) und Sphäroid-Kulturen (●) nach 72-stündiger Behandlung mit Carboplatin. Alle Datenpunkte der Dosis-Wirkungskurven sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 3$ individuelle Experimente mit je 8 behandelten und gemessenen Wells bzw. Sphäroiden pro Bedingung. Repräsentative Phasenkontrastbilder zeigen die Sphäroidintegrität nach Behandlung mit 0 μ M, 0,1 μ M, 25 μ M und 200 μ M Carboplatin. Vergrößerung 10x Objektiv. Hill Slope: Monolayer -0,2178; Sphäroid -3,306 \times 10⁻⁸.

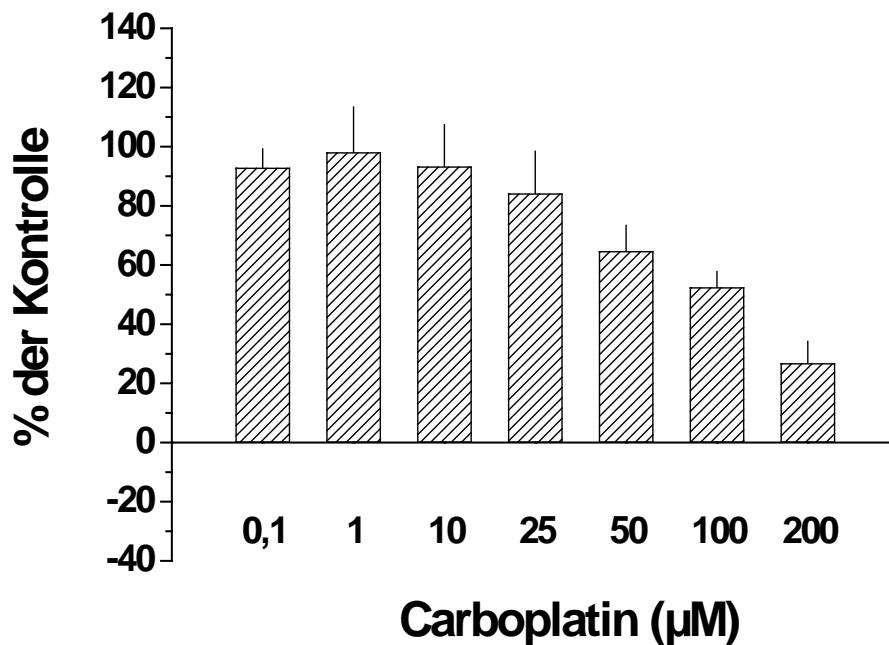


Abbildung 50. Volumenwachstum von HCT-116 Sphäroiden nach 72-stündiger Behandlung mit Carboplatin. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für 8 behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Berechnet wurde $\Delta V = V_{d7} - V_{d4}$, das Volumenwachstum ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ($\Delta V_{\text{Kontrolle}} = 100\%$) dargestellt.

III.5.2.3 Cisplatin

Gegenüber Cisplatin wiesen HT29 Monolayer- und MCTS-Kulturen eine identische Sensitivität auf. Die Behandlung mit 0,1 μM Wirkstoff resultierte in einer nur unerheblichen Reduktion des Assaysignals. Erst in höheren Dosen war eine Wirkung von Cisplatin auf das Assaysignal zu erkennen. Durch Zugabe von 200 μM Wirkstoff konnte die Enzymaktivität auf maximal 30-40% reduziert werden. Der berechnete IC_{50} Wert für Monolayerkulturen liegt bei $100,8 \pm 37,1 \mu\text{M}$, für Sphäroid-Kulturen bei $149,8 \pm 65,7 \mu\text{M}$ (Abbildung 51). Ähnliche Effekte konnte auch auf das Volumenwachstum von HT29 Sphäroiden beobachtet werden. Eine Reduktion des Wachstum um 50% relativ zur unbehandelten Kontrolle wurde nach einer Behandlung mit 100 μM Cisplatin erreicht, eine Applikation von 200 μM Wirkstoff resultierte in einer Hemmung um ca. 80% (Abbildung 52). Mit steigenden Konzentrationen nahm das Sphäroidvolumen zwar ab, ein Verlust der Sphäroidintegrität wurde jedoch nicht nachgewiesen (Abbildung 51).

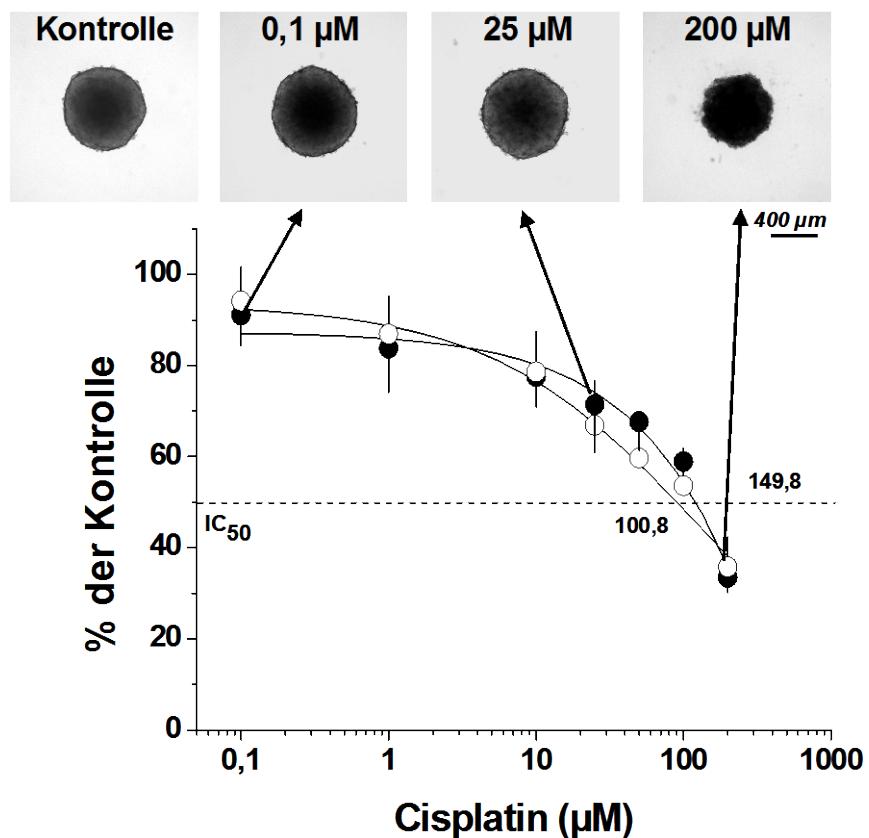


Abbildung 51. APH Aktivität/ Zellvitalität in HT29 Monolayer- (○) und Sphäroid-Kulturen (●) nach 72-stündiger Behandlung mit Cisplatin. Alle Datenpunkte der Dosis-Wirkungskurven sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 3$ individuelle Experimente mit je 8 behandelten und gemessenen Wells bzw. Sphäroiden pro Bedingung. Repräsentative Phasenkontrastbilder zeigen die Sphäroidintegrität nach Behandlung mit 0 μ M, 0,1 μ M, 25 μ M und 200 μ M Cisplatin. Vergrößerung 10x Objektiv. Hill Slope: Monolayer -0,4940; Sphäroid -0,4629.

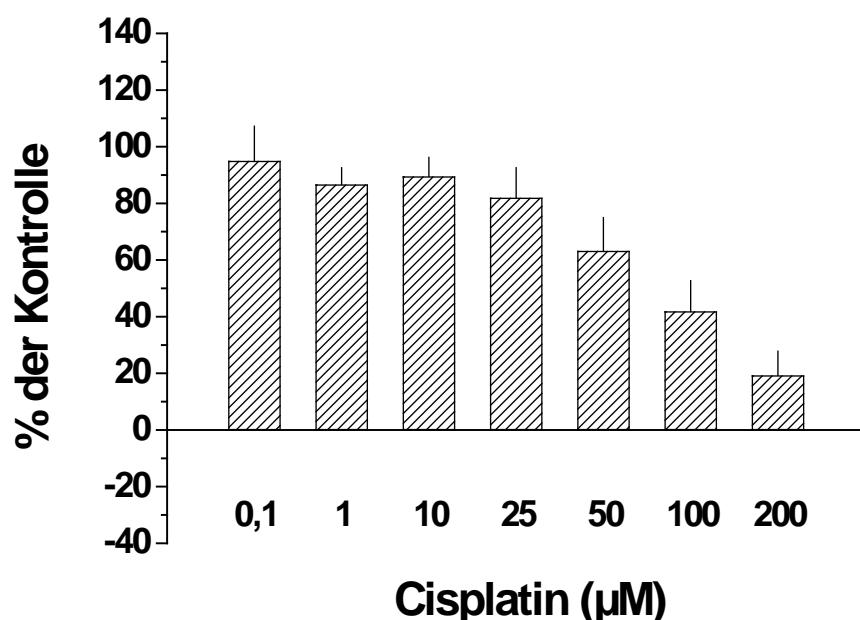


Abbildung 52. Volumenwachstum von HT29 Sphäroiden nach 72-stündiger Behandlung mit Cisplatin. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für 8 behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Berechnet wurde $\Delta V = V_{d7} - V_{d4}$, das Volumenwachstum ist relativ zur un behandelten Kontrolle ($\Delta V_{\text{Kontrolle}} = 100\%$) dargestellt.

HCT-116 Monolayer- und MCTS-Kulturen wiesen gegenüber Cisplatin einen ähnlichen Verlauf der Dosis-Wirkungskurven auf. Da Sphäroid-Kulturen in Dosen $< 50 \mu\text{M}$ sensitiver, im Bereich $> 50 \mu\text{M}$ jedoch resistenter gegenüber Cisplatin sind, kann hier ein flacherer Kurvenverlauf im Vergleich zu Monolayerkulturen beobachtet werden. Die Behandlung mit $0,1 \mu\text{M}$ Wirkstoff resultierte in einer nur unerheblichen Reduktion des Assaysignals. Erst in höheren Dosen war eine Wirkung von Cisplatin auf das Assaysignal zu erkennen. Durch Zugabe von $200 \mu\text{M}$ Wirkstoff konnte die Enzymaktivität im Monolayer auf maximal 20% reduziert werden, in Sphäroiden dagegen auf nur 35%. Der berechnete IC_{50} Wert für Monolayerkulturen liegt bei $57,3 \pm 16,1 \mu\text{M}$, für Sphäroid-Kulturen bei $61,8 \pm 41,6 \mu\text{M}$ (Abbildung 53). Eine verstärkte Wirkung von Cisplatin konnte bei der Berechnung des Volumenwachstums von HCT-116 Sphäroide festgestellt werden. So verringerte sich das Wachstum bei einer Behandlung mit $25 \mu\text{M}$ bereits um 50% relativ zur unbehandelten Kontrolle. Weiterhin fiel auf, dass das Sphäroidvolumen nach 72-stündiger Behandlung mit der maximalen Wirkstoffkonzentration im Vergleich zum Ausgangsvolumen - bestimmt beim Beginn der Behandlung - sogar geringer war (Abbildung 54). Nach Analyse der Sphäroidintegrität konnte diese Abnahme jedoch nicht mit einer Ablösung von Zellen aus dem 3-D Verband erklärt werden (Abbildung 53).

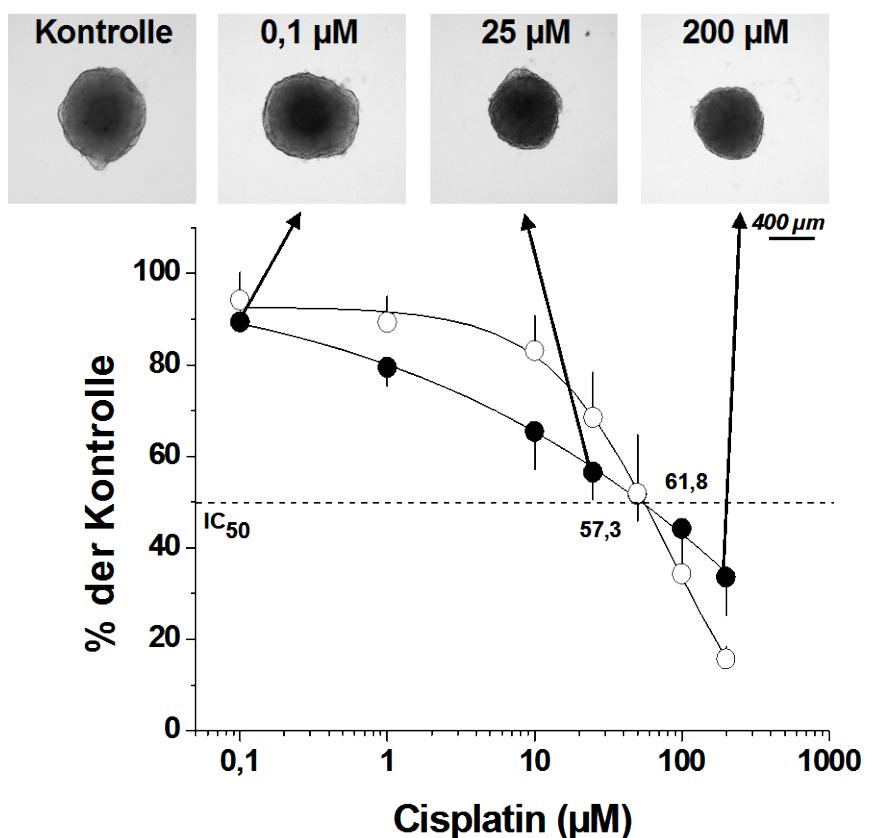


Abbildung 53. APH Aktivität/ Zellvitalität in HCT-116 Monolayer- (○) und Sphäroid-Kulturen (●) nach 72-stündiger Behandlung mit Cisplatin. Alle Datenpunkte der Dosis-Wirkungskurven sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 3$ individuelle Experimente mit je 8 behandelten und gemessenen Wells bzw. Sphäroiden pro Bedingung. Repräsentative Phasenkontrastbilder zeigen die Sphäroidintegrität nach Behandlung mit $0 \mu\text{M}$, $0,1 \mu\text{M}$, $25 \mu\text{M}$ und $200 \mu\text{M}$ Cisplatin. Vergrößerung 10x Objektiv. Hill Slope: Monolayer -1,028; Sphäroid -0,3707.

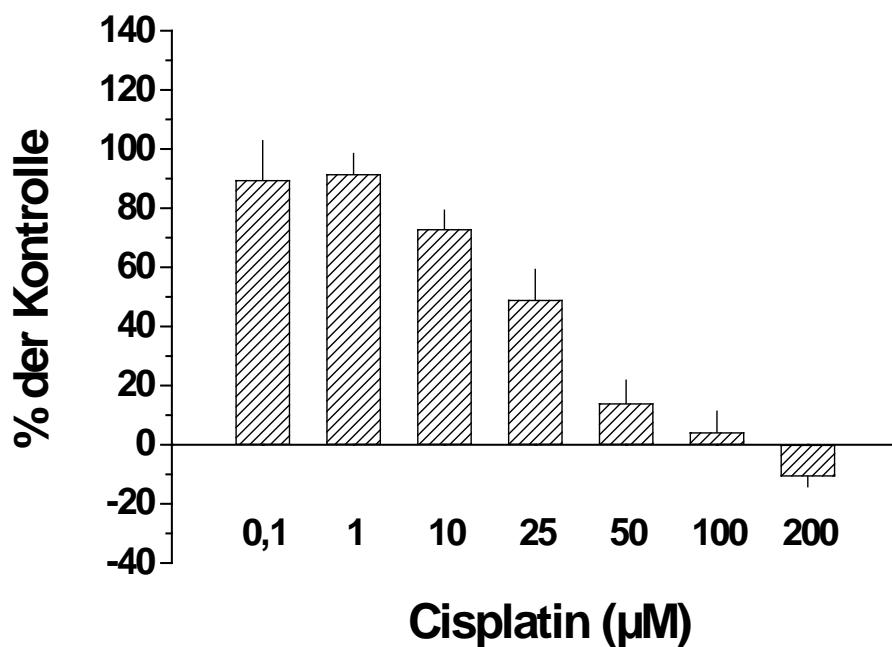


Abbildung 54. Volumenwachstum von HCT-116 Sphäroiden nach 72-stündiger Behandlung mit Cisplatin. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für 8 behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Berechnet wurde $\Delta V = V_{d7} - V_{d4}$, das Volumenwachstum ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ($\Delta V_{\text{Kontrolle}} = 100\%$) dargestellt.

III.5.2.4 CCNU/Lomustin

Gegenüber CCNU/Lomustin wiesen Monolayer- und MCTS-Kulturen eine gleichermaßen niedrige Sensitivität auf. Eine Behandlung mit CCNU/Lomustin ergab sowohl in Monolayer- als auch in Sphäroid-Kulturen eine nur mäßig verringerte Enzymaktivität. Bei einer maximalen Konzentration von 200 μM konnte eine Reduktion des Assaysignals in Monolayerkulturen auf lediglich 60-70%, in Sphäroid-Kulturen auf lediglich 70-80% beobachtet werden (Abbildung 55). Im eingesetzten Konzentrationsbereich konnten somit weder für Monolayer- noch für Sphäroid-Kulturen IC_{50} Werte berechnet werden. Auf das Volumenwachstums von HT29 Sphäroiden zeigte CCNU/Lomustin jedoch einen deutlicheren Effekt. Bereits eine Wirkstoffkonzentration von 50 μM konnte das Wachstum um ca. 50% hemmen. Bei einer Behandlung mit 200 μM CCNU/Lomustin wurde das Volumenwachstums auf etwa 15% relativ zur unbehandelten Kontrolle reduziert (Abbildung 56). Trotz der nachgewiesenen Effekte von CCNU/Lomustin auf das Wachstum von HCT-116 Sphäroiden konnte kein Einfluss auf die Sphäroidintegrität beobachtet werden (Abbildung 55).

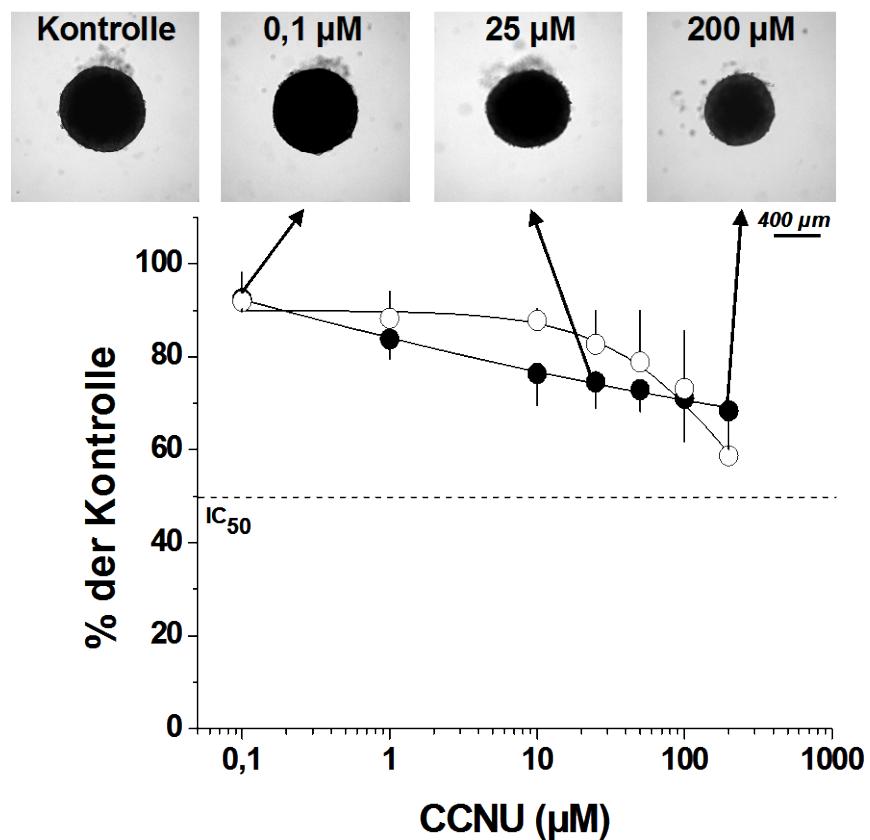


Abbildung 55. APH Aktivität/ Zellvitalität in HT29 Monolayer- (○) und Sphäroid-Kulturen (●) nach 72-stündiger Behandlung mit CCNU/Lomustin. Alle Datenpunkte der Dosis-Wirkungskurven sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 3$ individuelle Experimente mit je 8 behandelten und gemessenen Wells bzw. Sphäroiden pro Bedingung. Repräsentative Phasenkontrastbilder zeigen die Sphäroidintegrität nach Behandlung mit 0 μ M, 0,1 μ M, 25 μ M und 200 μ M CCNU/Lomustin. Vergrößerung 10x Objektiv. Hill Slope: Monolayer -0,3840; Sphäroid -0,1873.

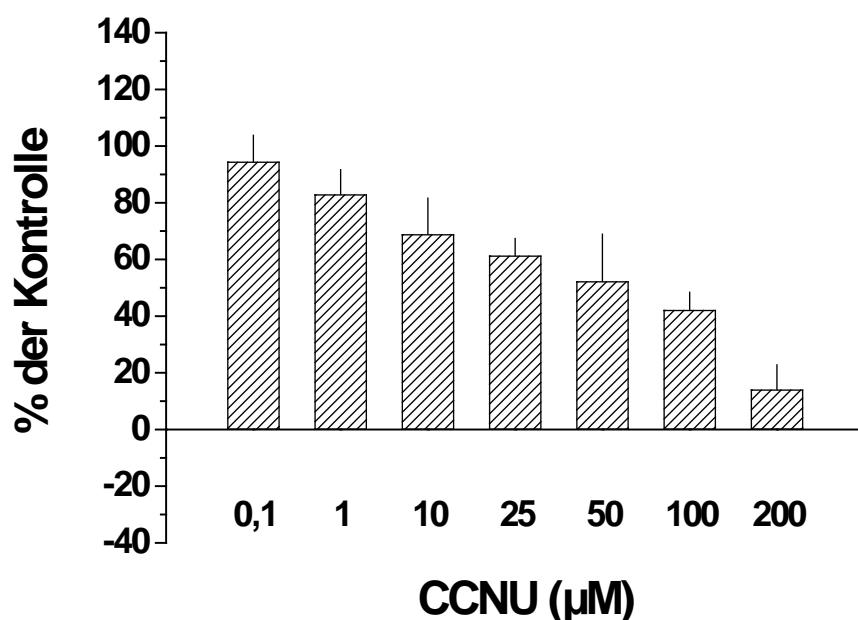


Abbildung 56. Volumenwachstum von HT29 Sphäroiden nach 72-stündiger Behandlung mit CCNU/Lomustin. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für 8 behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Berechnet wurde $\Delta V = V_{d7} - V_{d4}$, das Volumenwachstum ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ($\Delta V_{\text{Kontrolle}} = 100\%$) dargestellt.

HCT-116 Monolayer- und MCTS-Kulturen zeigten für CCNU/Lomustine einen ähnlichen Verlauf der Dosis-Wirkungskurven. Auffallend war, dass die Effekte des Wirkstoffes bei Sphäroid-Kulturen reproduzierbar um 10-20% höher lagen. Allerdings zeigte die Behandlung mit CCNU/Lomustin sowohl in Monolayer- als auch in Sphäroid-Kulturen insgesamt eine nur mäßig verringerte Zellzahl bzw. APH Enzymaktivität. Bei einer maximalen Konzentration von 200 μ M konnte weder bei Monolayer- noch bei Sphäroid-Kulturen eine Reduktion des Assaysignals von 50% erreicht werden (Abbildung 57). Im eingesetzten Konzentrationsbereich konnten somit weder für Monolayer- noch für Sphäroid-Kulturen IC_{50} Werte berechnet werden. Entsprechend den Ergebnissen mit der Zelllinie HT29 zeigte CCNU/Lomustin auch auf das Volumenwachstums von HCT-116 Sphäroiden einen verstärkten Effekt. Erneut trat hier eine Hemmung des Wachstums um ca. 50% bereits bei einer Wirkstoffkonzentration von 50 μ M auf. Bei Behandlung mit 200 μ M CCNU/Lomustin wurde eine Reduktion des Volumenwachstums um 70% bestimmt (Abbildung 58). Ein Einfluss des Wirkstoffes auf die Sphäroidintegrität konnte auch bei HCT-116 Sphäroiden nicht nachgewiesen werden (Abbildung 57).

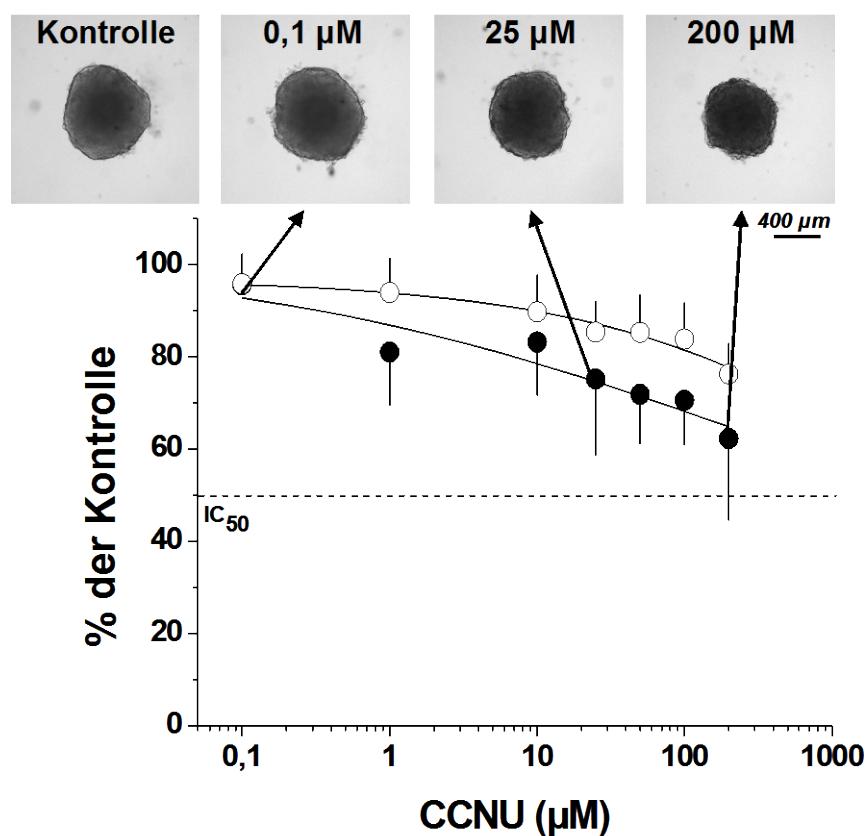


Abbildung 57. APH Aktivität/ Zellvitalität in HCT-116 Monolayer- (○) und Sphäroid-Kulturen (●) nach 72-stündiger Behandlung mit CCNU/Lomustin. Alle Datenpunkte der Dosis-Wirkungskurven sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 3$ individuelle Experimente mit je 8 behandelten und gemessenen Wells bzw. Sphäroiden pro Bedingung. Repräsentative Phasenkontrastbilder zeigen die Sphäroidintegrität nach Behandlung mit 0 μ M, 0,1 μ M, 25 μ M und 200 μ M CCNU/Lomustin. Vergrößerung 10x Objektiv. Hill Slope: Monolayer -0,2807; Sphäroid $1,623 \times 10^{-8}$.

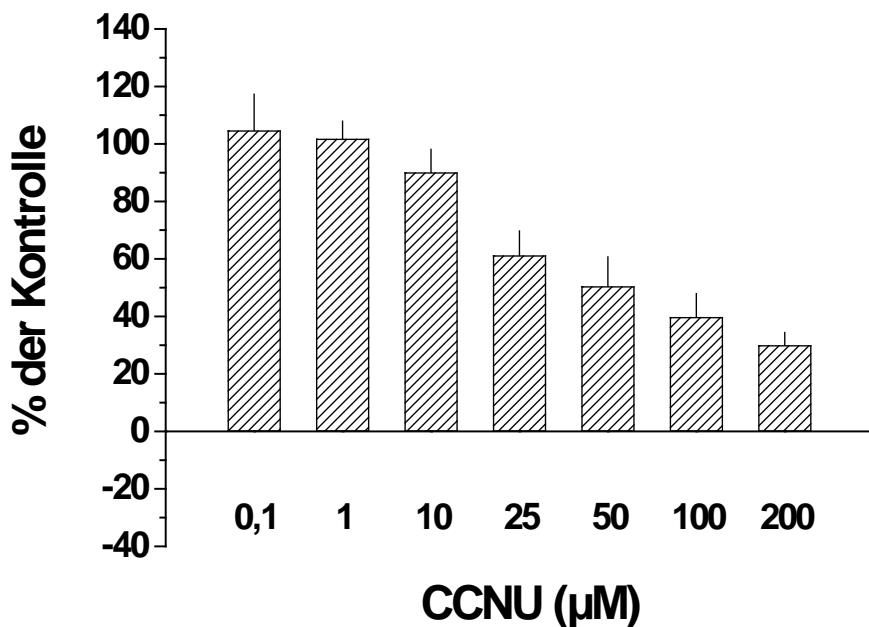


Abbildung 58. Volumenwachstum von HCT-116 Sphäroiden nach 72-stündiger Behandlung mit CCNU/Lomustin. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für 8 behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Berechnet wurde $\Delta V = V_{d7} - V_{d4}$, das Volumenwachstum ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ($\Delta V_{\text{Kontrolle}} = 100\%$) dargestellt.

III.5.3 Antimitotische Wirkstoffe

III.5.3.1 Paclitaxel

Aufgrund der hohen Sensitivität von Monolayer- und Sphäroid-Kulturen der beiden Zelllinien HT29 und HCT-116 gegenüber Paclitaxel wurde der routinemäßig eingesetzte Konzentrationsbereich von 0,1 - 200 μM nach ersten Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) in den Bereich von 0,01 nM - 50 μM verschoben.

Die Behandlung mit 0,01 nM Paclitaxel zeigte noch keinen Effekt auf die Enzymaktivität in HT29 Monolayerkulturen. Durch Behandlung mit Konzentrationen $\geq 0,01 \mu\text{M}$ war das APH Signal auf 5-10% relativ zur unbehandelten Kontrolle reduziert. Der berechnete IC_{50} Wert für Monolayerkulturen liegt bei $1,9 \pm 9,2 \text{ nM}$ (Abbildung 59). Sphäroide wiesen gegenüber Paclitaxel eine veränderte Sensitivität auf. Hier resultierte bereits die Behandlung mit 0,01 nM Paclitaxel in einer leichten Reduktion (~10-15%) des Assaysignals. Paclitaxel ist die einzige der in dieser Arbeit getesteten Substanzen, die in niedrigen Konzentrationen (0,01-1 nM) besser in Sphäroid-Kulturen als in Monolayerkulturen wirkt. Dagegen zeigten höhere Dosen Paclitaxel im Vergleich zu Monolayerkulturen eine eher geringe Wirkung in Sphäroiden. Ab einer Wirkstoffkonzentration von 0,1 μM war die Enzymaktivität um etwa 80% reduziert (Abbildung 59). Der berechnete IC_{50} Wert für Sphäroid-Kulturen liegt bei $7,3 \pm 5,7 \text{ nM}$.

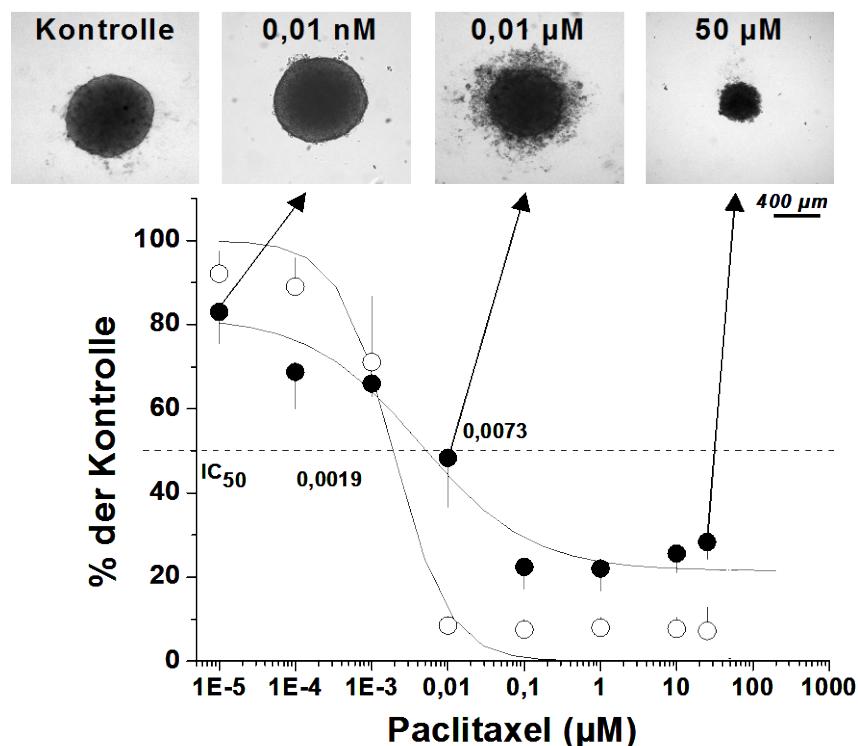


Abbildung 59. APH Aktivität/ Zellvitalität in HT29 Monolayer- (○) und Sphäroid-Kulturen (●) nach 72-stündiger Behandlung mit Paclitaxel. Alle Datenpunkte der Dosis-Wirkungskurven sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 3$ individuelle Experimente mit je 8 behandelten und gemessenen Wells bzw. Sphäroiden pro Bedingung. Repräsentative Phasenkontrastbilder zeigen Sphäroidintegrität und -volumen nach Behandlung mit 0 μ M, 0,01 nM, 0,01 μ M und 50 μ M Paclitaxel. Vergrößerung 10x Objektiv. Hill Slope: Monolayer -1,199; Sphäroid -0,1770.

Die Analyse des Volumenwachstum von HT29 Sphäroiden nach einer Behandlung mit Paclitaxel ergab, dass Wirkstoffkonzentrationen $< 0,001 \mu\text{M}$ keinen Einfluss auf das Wachstum zeigen. Bei einer Applikation von $0,01 \mu\text{M}$ Paclitaxel konnte jedoch eine sprunghafte Reduktion des Volumenwachstums um ca. 60% beobachtet werden (Abbildung 60), die mit einer starken Ablösung von Zellen aus dem 3-D Verband einher geht (Abbildung 59). Für Sphäroide, die mit Konzentrationen $\geq 0,01 \mu\text{M}$ behandelt wurden konnte kein Volumenwachstum mehr berechnet werden, da hier mehr als 50% der behandelten Sphäroide zerfallen sind. Abbildung 59 zeigt exemplarisch eine Phasenkontrastaufnahme eines der wenigen intakten Sphäroide nach Behandlung mit der maximalen Wirkstoffkonzentration von $50 \mu\text{M}$. Trotz des Zerfalls der meisten Sphäroide nach einer Behandlung mit $0,01 \mu\text{M}$ lag das APH Assay Signal in diesen Wells immer noch bei 20-30% relativ zur unbehandelten Kontrolle.

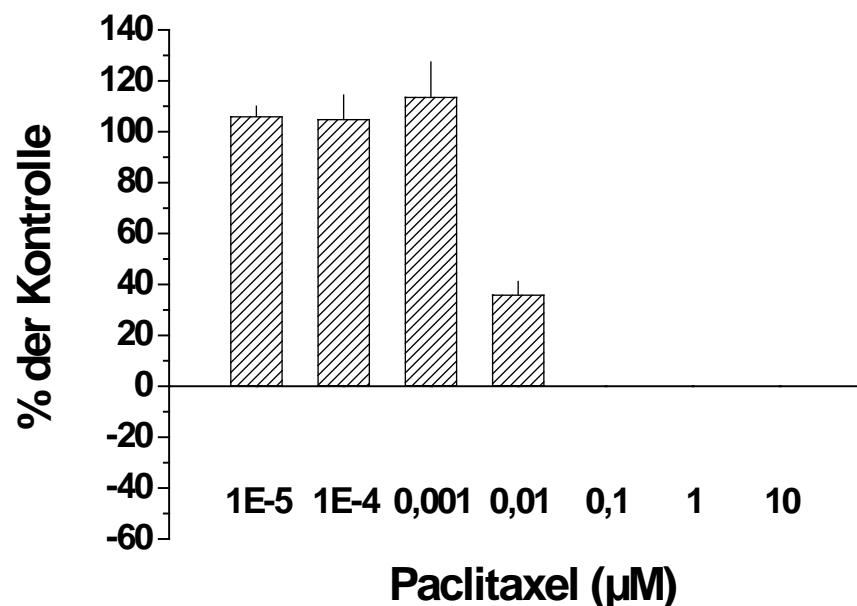


Abbildung 60. Volumenwachstum von HT29 Sphäroiden nach 72-stündiger Behandlung mit Paclitaxel. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für 8 behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Berechnet wurde $\Delta V = V_{d7} - V_{d4}$, das Volumenwachstum ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ($\Delta V_{\text{Kontrolle}} = 100\%$) dargestellt.

Auch in HCT-116 Monolayerkulturen zeigte die Behandlung mit 0,01 nM Paclitaxel noch keinen Effekt auf die Enzymaktivität. Nach einer Behandlung mit Konzentrationen $\geq 0,01 \mu\text{M}$ konnte das APH Signal auf 5-15% relativ zur unbehandelten Kontrolle reduziert werden. Der berechnete IC_{50} Wert für Monolayerkulturen liegt bei $3,8 \pm 0,5 \text{ nM}$ (Abbildung 61). In HCT-116 Sphäroiden resultierte die Behandlung mit 0,01 nM Paclitaxel ebenfalls nicht in einer Reduktion des Assaysignals, in höhere Dosen zeigte Paclitaxel im Vergleich zu Monolayerkulturen eine eher geringe Wirkung in Sphäroid-Kulturen. Mit einer Wirkstoffkonzentration von $200 \mu\text{M}$ konnte die Enzymaktivität lediglich um etwa 60-65% reduziert werden (Abbildung 61). Der berechnete IC_{50} Wert für Sphäroid-Kulturen liegt bei $50 \pm 30 \text{ nM}$. Bei der Berechnung des Volumenwachstum zeigte Paclitaxel identische Effekte auf HCT116 Sphäroide wie schon bei HT29 Kulturen. Nach einer Behandlung mit $< 0,001 \mu\text{M}$ Paclitaxel konnte kein Einfluss auf das Wachstum festgestellt werden. Erst bei einer Applikation von $0,01 \mu\text{M}$ Wirkstoff wurde eine drastische Reduktion des Volumenwachstums um ca. 60% beobachtet (Abbildung 62). Vergleichbar zu HT29 MCTSs kam es auch hier zu einem erheblichen Verlust von Zellen im Sphäroid (Abbildung 61). Für Konzentrationen $\geq 0,01 \mu\text{M}$ konnte erneut kein Volumenwachstum der Sphäroide mehr berechnet werden, da mehr als 50% der behandelten Sphäroide zerfallen sind. Als Beispiel für eines der wenigen intakten Sphäroide nach Behandlung mit maximaler Wirkstoffkonzentration soll die Phasenkontrastaufnahme in Abbildung 61 dienen. Auffallend war, dass das APH Assay Signal der zerfallenen Sphäroide immer noch bei $\geq 30\%$ relativ zur unbehandelten Kontrolle lag (Abbildung 61).

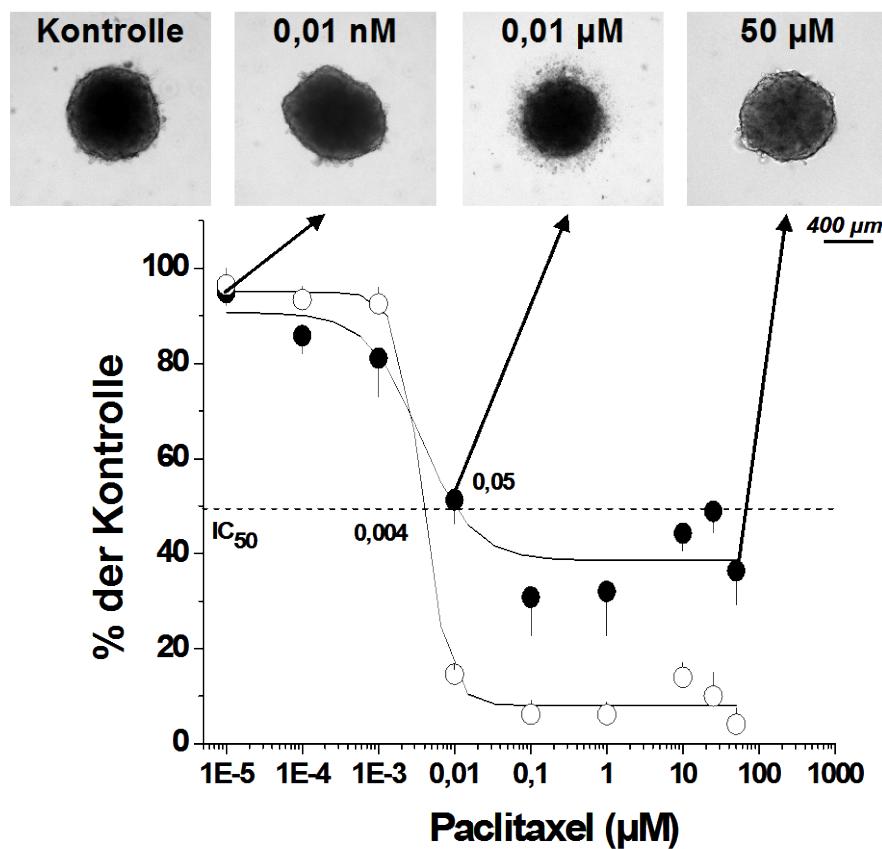


Abbildung 61. APH Aktivität/ Zellvitalität in HCT-116 Monolayer (○) und Sphäroid-Kulturen (●) nach 72-stündiger Behandlung mit Paclitaxel. Alle Datenpunkte der Dosis-Wirkungskurven sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 3$ individuelle Experimente mit je 8 behandelten und gemessenen Wells bzw. Sphäroiden pro Bedingung. Repräsentative Phasenkontrastbilder zeigen die Sphäroidintegrität nach Behandlung mit 0 μ M, 0,01 nM, 0,01 μ M und 50 μ M Paclitaxel. Vergrößerung 10x Objektiv. Hill Slope: Monolayer -2,416; Sphäroid -0,1572.

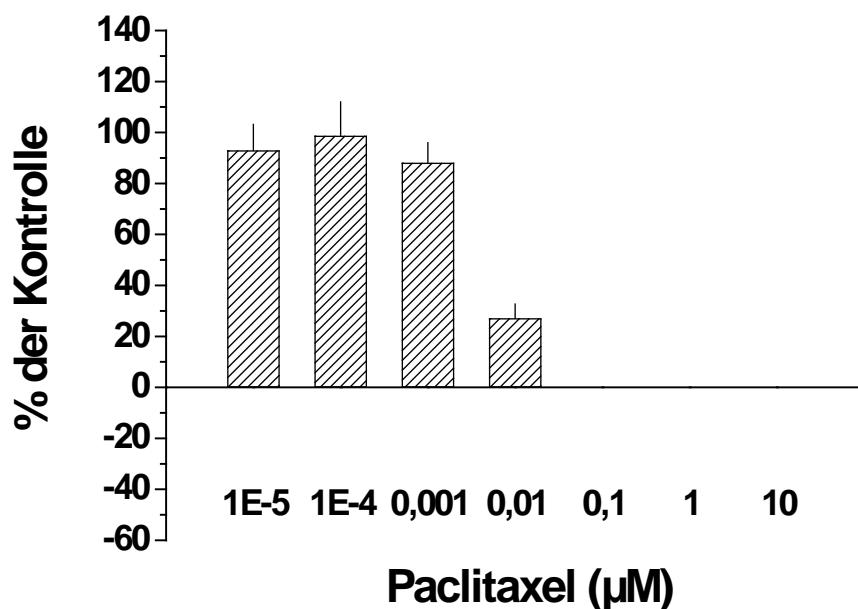


Abbildung 62. Volumenwachstum von HCT-116 Sphäroiden nach 72-stündiger Behandlung mit Paclitaxel. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für 8 behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Berechnet wurde $\Delta V = V_{d7} - V_{d4}$, das Volumenwachstum ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ($\Delta V_{\text{Kontrolle}} = 100\%$) dargestellt.

III.5.4 DNA/RNA-interkalierende Wirkstoffe

III.5.4.1 Mitoxantron

Erste Versuche mit Mitoxantron zeigten im Monolayer (sowohl für die Zelllinie HT29, als auch HCT-116) bereits bei einer Konzentration von 0,1 μM relativ zur unbehandelten Kontrolle eine um > 50% verringerte Phosphataseaktivität (Daten nicht gezeigt). Daher wurde der routinemäßig eingesetzte Konzentrationsbereich in den Bereich von 0,001 μM - 200 μM verschoben.

Eine Behandlung mit 0,001 μM Mitoxantron verringerte die Enzymaktivität in HT29 Monolayerkulturen relativ zur unbehandelten Kontrolle bereits auf etwa 80%. Nach einer Behandlung ab 10 μM Mitoxantron war das Assaysignal durchwegs kleiner als 10% (Abbildung 63). Der berechnete IC_{50} Wert für Monolayerkulturen liegt bei $0,03 \pm 0,03 \mu\text{M}$. Sphäroide zeigten eine verringerte Sensitivität gegenüber Mitoxantron. Erst die Behandlung mit 0,1 μM Mitoxantron resultierte hier in einer Reduktion des Assaysignals um 10%. Nur in höheren Dosen zeigte Mitoxantron eine signifikante Wirkung auf Sphäroid-Kulturen. Durch Zugabe von 200 μM Wirkstoff kann die Enzymaktivität auf etwa 35% reduziert werden (Abbildung 63). Der berechnete IC_{50} Wert für Sphäroid-Kulturen liegt bei $16,4 \pm 8,3 \mu\text{M}$.

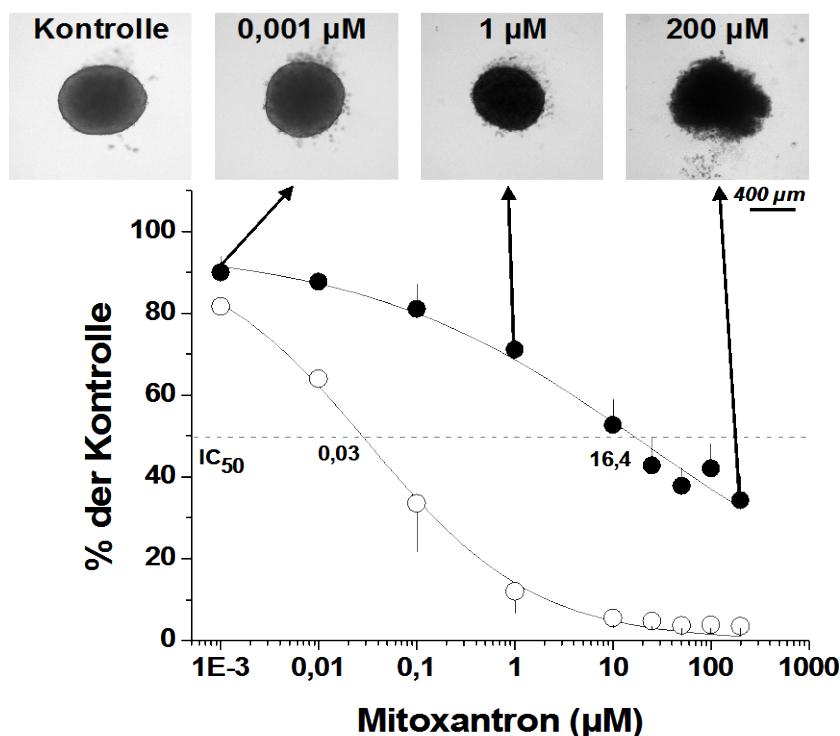


Abbildung 63. APH Aktivität/ Zellvitalität in HT29 Monolayer- (○) und Sphäroid-Kulturen (●) nach 72-stündiger Behandlung mit Mitoxantron. Alle Datenpunkte der Dosis-Wirkungskurven sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 3$ individuelle Experimente mit je 8 behandelten und gemessenen Wells bzw. Sphäroiden pro Bedingung. Repräsentative Phasenkontrastbilder zeigen die Sphäroidintegrität nach Behandlung mit 0 μM , 0,001 μM , 1 μM und 200 μM Mitoxantron. Vergrößerung 10x Objektiv. Hill Slope: Monolayer -0,4899; Sphäroid -0,2714.

Wirkstoffkonzentrationen von 0,001 bzw. 0,01 μM zeigten auch bei der Analyse des Volumenwachstums von HT29 Sphäroiden einen Einfluss auf deren Wachstum. So wurde hier eine Hemmung des Wachstums um 15% beobachtet. Bereits in diesen Konzentrationen kam es zu einer Ablösung von Zellen aus den 3-D Aggregaten (Abbildung 63). Eine Behandlung mit 0,1 μM Mitoxantron reduzierte das Volumenwachstum um mehr als 50% (Abbildung 64). Für Dosen $\geq 25 \mu\text{M}$ zerfielen mehr als 50% der behandelten Sphäroide, d.h. ein Volumenwachstum konnte nicht mehr berechnet werden. Trotz des Zerfalls der Sphäroide nach einer Behandlung mit 200 μM (Abbildung 63) lag das APH Assay Signal in diesen Wells immer noch bei $\sim 35\%$ relativ zur unbehandelten Kontrolle.

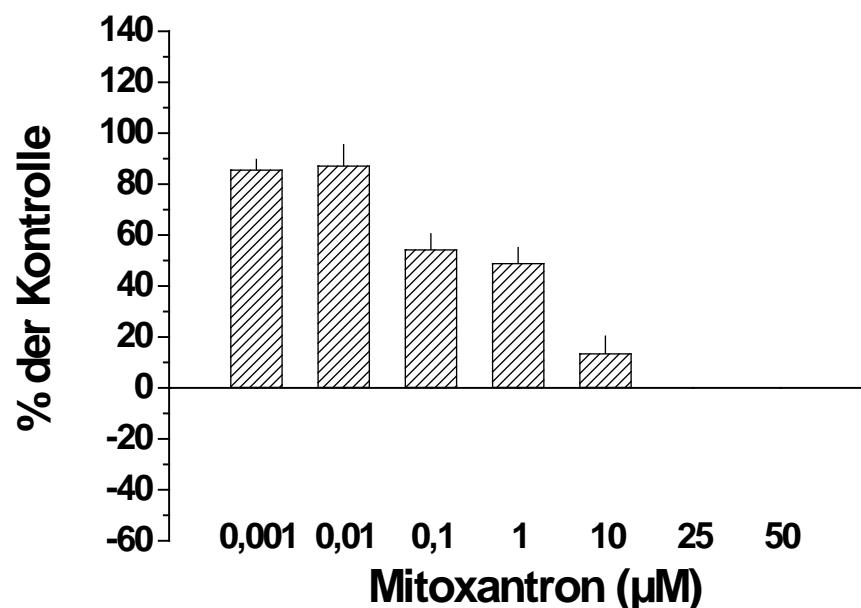


Abbildung 64. Volumenwachstum von HT29 Sphäroiden nach 72-stündiger Behandlung mit Mitoxantron. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für 8 behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Berechnet wurde $\Delta V = V_{d7} - V_{d4}$, das Volumenwachstum ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ($\Delta V_{\text{Kontrolle}} = 100\%$) dargestellt.

Eine Behandlung mit 0,001 μM Mitoxantron verringerte die APH-Enzymaktivität in HCT-116 Monolayer- und Sphäroid-Kulturen relativ zur unbehandelten Kontrolle bereits auf etwa 70%. In Monolayerkulturen war das Assaysignal nach einer Behandlung mit 200 μM Mitoxantron durchwegs kleiner als 10% (Abbildung 65). Der berechnete IC_{50} Wert für Monolayerkulturen liegt bei $0,3 \pm 0,3 \mu\text{M}$. HCT-116 Sphäroide zeigten im Bereich bis 1 μM eine vergleichbar ähnliche Sensitivität gegenüber Mitoxantron. Erst in höheren Dosen fiel ein verminderter Wirkstoffeffekt gegenüber Monolayerkulturen auf. Durch Zugabe von 200 μM Wirkstoff konnte die Enzymaktivität auf nur 30% reduziert werden (Abbildung 65). Der berechnete IC_{50} Wert für Sphäroid-Kulturen liegt bei $1,0 \pm 1,1 \mu\text{M}$.

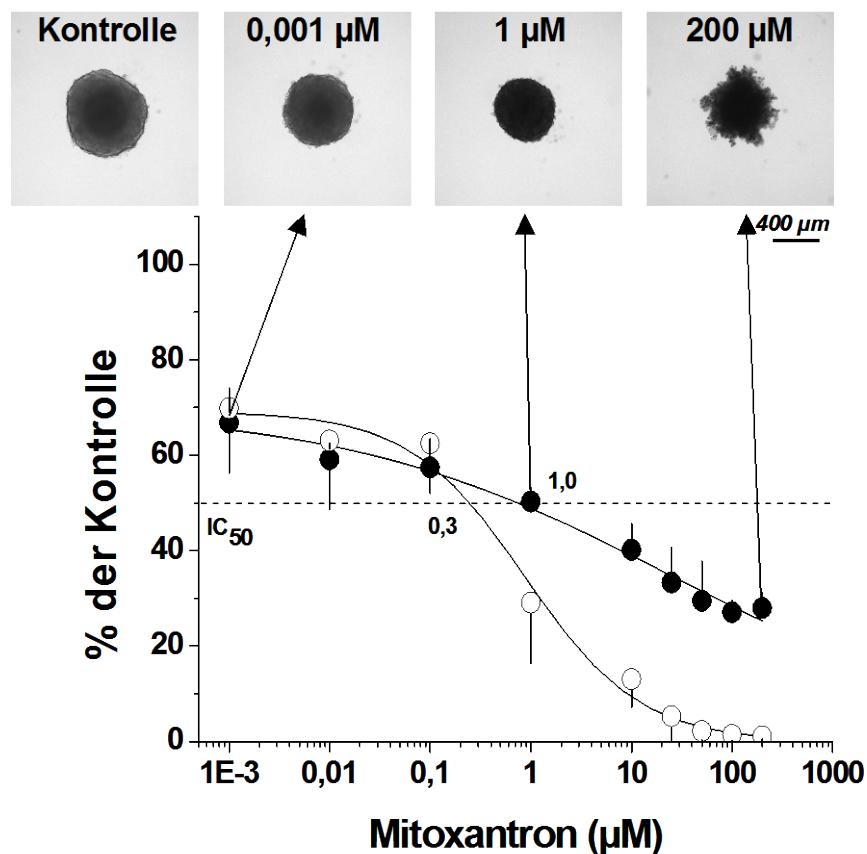


Abbildung 65. APH Aktivität/ Zellvitalität in HCT-116 Monolayer- (○) und Sphäroid-Kulturen (●) nach 72-stündiger Behandlung mit Mitoxantron. Alle Datenpunkte der Dosis-Wirkungskurven sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 3$ individuelle Experimente mit je 8 behandelten und gemessenen Wells bzw. Sphäroiden pro Bedingung. Repräsentative Phasenkontrastbilder zeigen die Sphäroidintegrität nach Behandlung mit 0 µM, 0,001 µM, 1 µM und 200 µM Mitoxantron. Vergrößerung 10x Objektiv. Hill Slope: Monolayer -0,7616; Sphäroid -0,2672.

Auch in HCT-116 Sphäroiden verursachten Konzentrationen von 0,001 bzw. 0,01 µM eine Reduktion des Volumenwachstums. Hier wurde eine Hemmung des Wachstums auf bereits 40% relativ zur unbehandelten Kontrolle gemessen (Abbildung 66). Eine Zellablösung, die diese starke Reduktion rechtfertigen könnte, wurde jedoch nicht beobachtet (Abbildung 65). In Dosen von 25 bzw. 50 µM nahm das Sphäroidvolumen nach 72-stündiger Behandlung im Vergleich zum Ausgangsvolumen - bestimmt beim Beginn der Behandlung - ab (Abbildung 66). Für Konzentrationen \geq 100 µM konnte erneut kein Volumenwachstum der Sphäroide mehr berechnet werden, da mehr als 50% der behandelten Sphäroide zerfielen. Dabei zeigten HCT-116 Zellen auch nach dem Zerfall der Sphäroide eine APH Enzymaktivität von ca. 30% relativ zur unbehandelten Kontrolle. Abbildung 65 zeigt exemplarisch eine Phasenkontrastaufnahme eines zerfallenen Sphäroides nach Behandlung mit der maximalen Wirkstoffkonzentration von 200 µM.

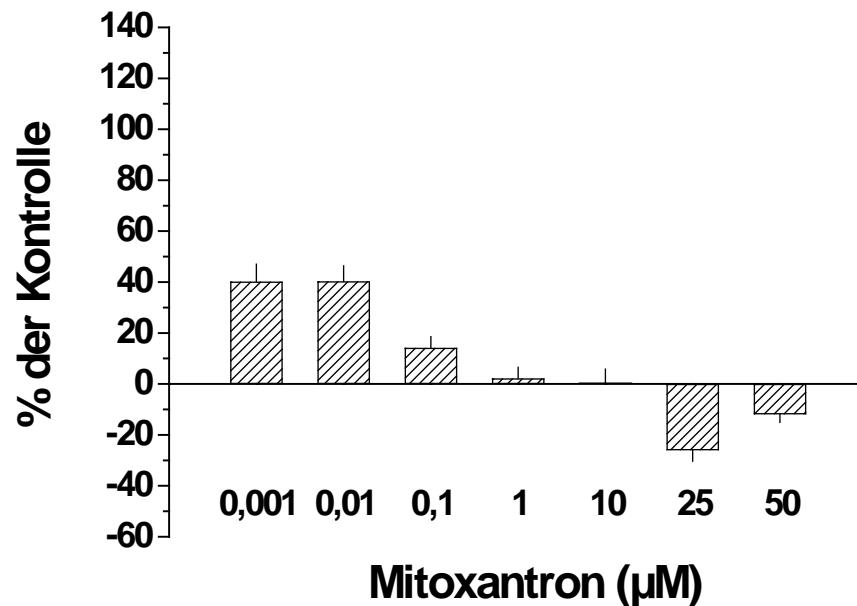


Abbildung 66. Volumenwachstum von HCT-116 Sphäroiden nach 72-stündiger Behandlung mit Mitoxantron. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für 8 behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Berechnet wurde $\Delta V = V_{d7} - V_{d4}$, das Volumenwachstum ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ($\Delta V_{\text{Kontrolle}} = 100\%$) dargestellt.

III.5.5 Topoisomerase-II-Inhibitoren

III.5.5.1 Doxorubicin

Bereits die Behandlung mit 0,1 μM Doxorubicin verringerte die Enzymaktivität in HT29 Monolayerkulturen relativ zur unbehandelten Kontrolle auf etwa 40%. Nach einer Behandlung mit 200 μM Doxorubicin war das Assaysignal reproduzierbar unter 5% der Kontrolle (Abbildung 67). Der IC_{50} Wert für Monolayerkulturen liegt bei 0,1 μM . HT29 Sphäroide zeigten eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber Doxorubicin. Die Behandlung mit 0,1 μM Doxorubicin resultierte hier nicht in einer erheblichen Reduktion des Assaysignals. Erst in höheren Dosen zeigt Doxorubicin eine Wirkung auf Sphäroid-Kulturen. Durch Zugabe von 10 μM Wirkstoff konnte die Enzymaktivität auf etwa 30% reduziert werden (Abbildung 67), diese Werte konnte aber auch bei höheren Dosen bis 200 μM nicht weiter verringert werden. Der berechnete IC_{50} Wert für Sphäroid-Kulturen liegt bei $3,7 \pm 3,0 \mu\text{M}$.

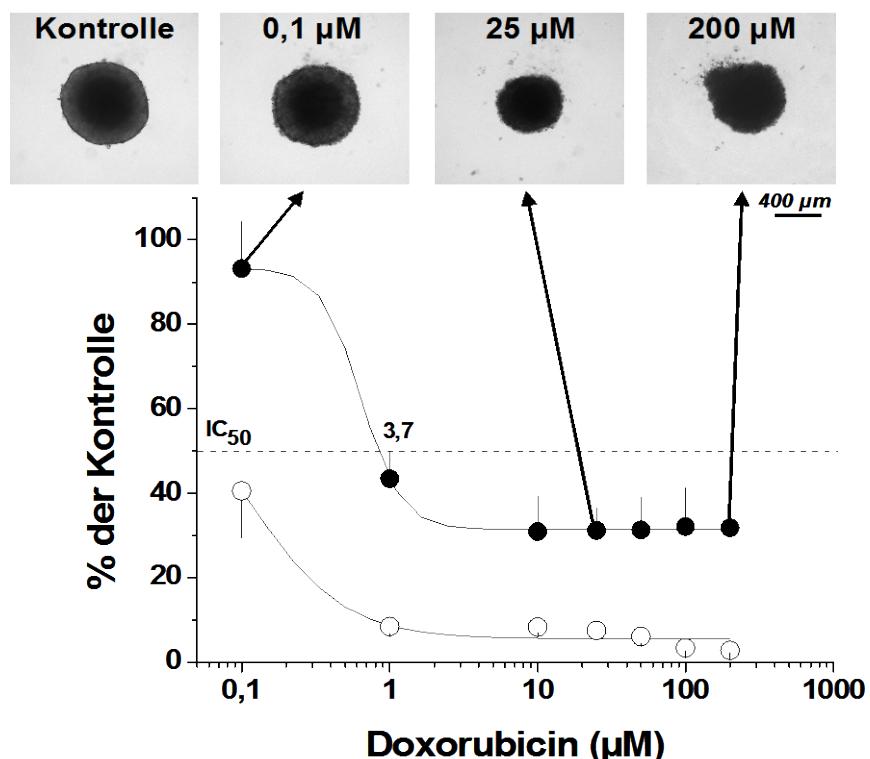


Abbildung 67. APH Aktivität/ Zellvitalität in HT29 Monolayer- (○) und Sphäroid-Kulturen (●) nach 72-stündiger Behandlung mit Doxorubicin. Alle Datenpunkte der Dosis-Wirkungskurven sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 3$ individuelle Experimente mit je 8 behandelten und gemessenen Wells bzw. Sphäroiden pro Bedingung. Repräsentative Phasenkontrastbilder zeigen die Sphäroidintegrität nach Behandlung mit 0 μ M, 0,1 μ M, 25 μ M und 200 μ M Doxorubicin. Vergrößerung 10x Objektiv. Hill Slope: Monolayer -0,5159; Sphäroid -0,3115.

Auch bei der Analyse des Volumenwachstums konnte für eine Behandlung mit 0,1 μ M Doxorubicin kein Effekt festgestellt werden. Eine starke Ablösung von Zellen aus dem Sphäroid (Abbildung 67), und die damit verbundene Reduktion des Volumenwachstums auf ca. 25% relativ zur unbehandelten Kontrolle wurde aber schon bei einer Konzentration von 1 μ M beobachtet (Abbildung 68). Im Vergleich zum Ausgangsvolumen nahm das Sphäroidvolumen nach 72-stündiger Behandlung mit 10 bzw. 25 μ M Doxorubicin sogar ab (Abbildung 68). Eine Berechnung des Sphäroidvolumenwachstums für Konzentrationen ≥ 50 μ M war aufgrund des Zerfalls von mehr als der Hälfte der behandelten Sphäroide nicht mehr möglich. HT29 Zellen zeigten allerdings auch nach dem Zerfall der Sphäroide eine APH Enzymaktivität von ca. 35% relativ zur unbehandelten Kontrolle. Ein Beispiel eines zerfallenen Sphäroides nach Behandlung mit 200 μ M Doxorubicin ist in Abbildung 67 gegeben.

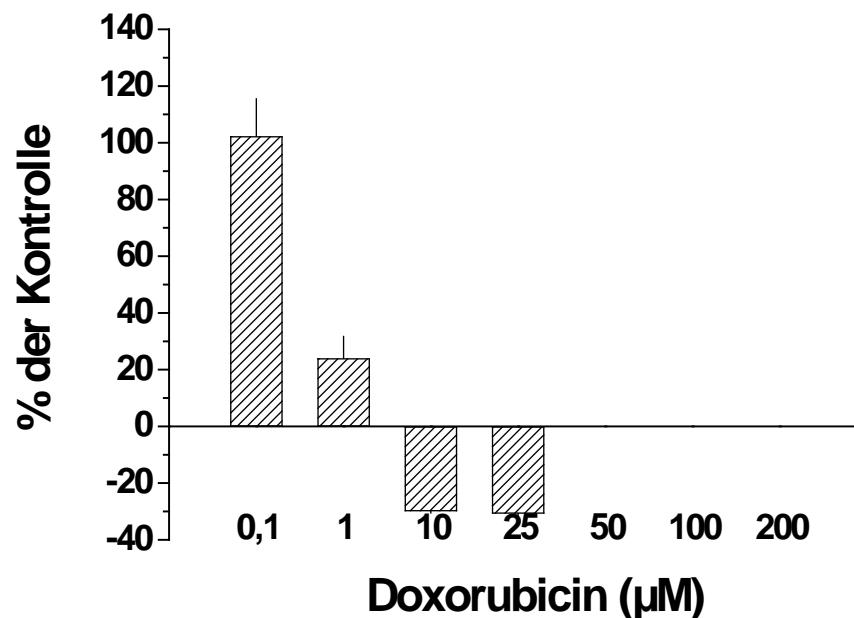


Abbildung 68. Volumenwachstum von HT29 Sphäroiden nach 72-stündiger Behandlung mit Doxorubicin. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für 8 behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Berechnet wurde $\Delta V = V_{d7} - V_{d4}$, das Volumenwachstum ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ($\Delta V_{\text{Kontrolle}} = 100\%$) dargestellt.

Für HCT-116 Zellen konnte sowohl im Monolayer, als auch im Sphäroid keine erhebliche Verringerung der Enzymaktivität relativ zur unbehandelten Kontrolle bei einer Behandlung mit 0,1 μM Doxorubicin beobachtet werden. Nach einer Behandlung mit steigenden Dosen Doxorubicin nahm das Assaysignal in HCT-116 Monolayerkulturen stetig ab. Durch Applikation der höchsten Wirkstoffdosis (= 200 μM) konnte die APH Aktivität durchwegs auf < 10% relativ zur unbehandelten Kontrolle reduziert werden (Abbildung 69). Der berechnete IC_{50} Wert für Monolayerkulturen liegt bei $0,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$. In diesem Bereich zeigten HCT-116 Sphäroide eine deutlich geringere Sensitivität gegenüber Doxorubicin. Zwar konnte die Enzymaktivität bereits durch Zugabe von 10 μM auf etwa 50% reduziert werden (Abbildung 69), dieser Wert wurde aber auch bei höheren Dosen bis 200 μM nicht unterschritten. Der berechnete IC_{50} Wert für Sphäroid-Kulturen liegt bei $11,6 \pm 12,1 \mu\text{M}$. Eine Konzentrationen von 0,1 μM führte in HCT-116 Sphäroiden bereits zu einer Hemmung des Volumenwachstums $\geq 50\%$ relativ zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 70). Anhand der Beobachtungen der Sphäroidintegrität konnte diese starke Reduktion aber nicht auf eine Zellablösung zurückgeführt werden (Abbildung 69). Im Konzentrationsbereich von 1-50 μM wurde sogar ein verringertes Sphäroidvolumen nach 72-stündiger Behandlung im Vergleich zum Ausgangsvolumen beobachtet (Abbildung 70). Für Konzentrationen $\geq 100 \mu\text{M}$ konnte kein Volumenwachstum der Sphäroide berechnet werden, da erneut mehr als 50% der behandelten Sphäroide zerfielen. Obwohl nach einer Behandlung mit 200 μM Doxorubicin alle HCT-116 Sphäroide zerfallen waren (Beispiel s. Abbildung 69), lag das APH Assay Signal in diesen Wells immer noch bei knapp 50% relativ zur unbehandelten Kontrolle.

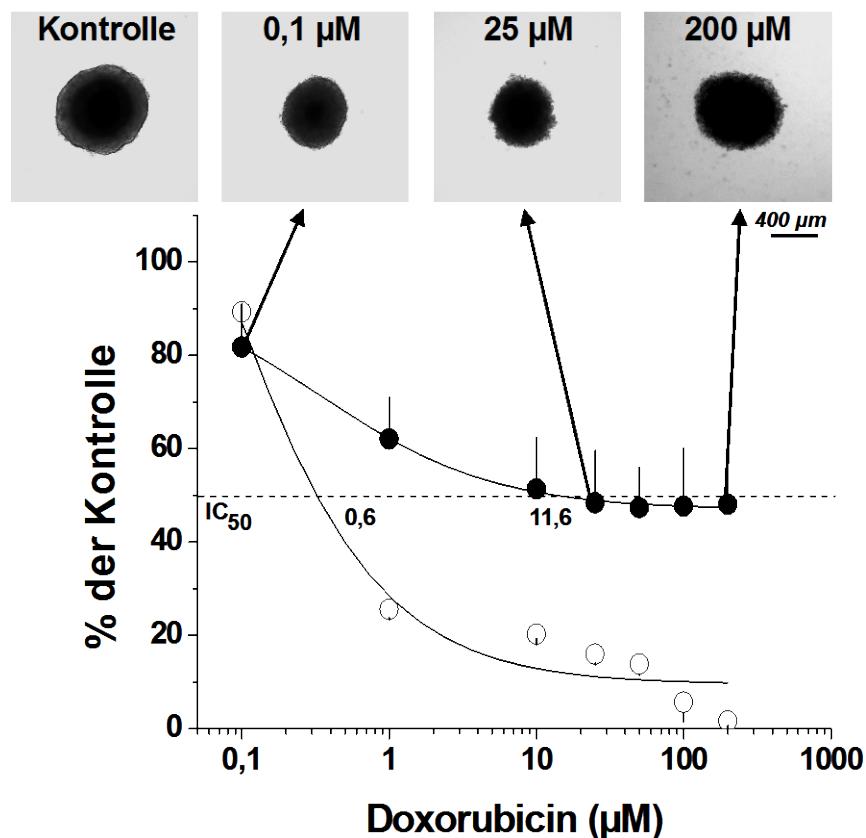


Abbildung 69. APH Aktivität/ Zellvitalität in HCT-116 Monolayer- (○) und Sphäroid-Kulturen (●) nach 72-stündiger Behandlung mit Doxorubicin. Alle Datenpunkte der Dosis-Wirkungskurven sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 3$ individuelle Experimente mit je 8 behandelten und gemessenen Wells bzw. Sphäroiden pro Bedingung. Repräsentative Phasenkontrastbilder zeigen die Sphäroidintegrität nach Behandlung mit 0 μ M, 0,1 μ M, 25 μ M und 200 μ M Doxorubicin. Vergrößerung 10x Objektiv. Hill Slope: Monolayer -0,6367; Sphäroid -0,1833.

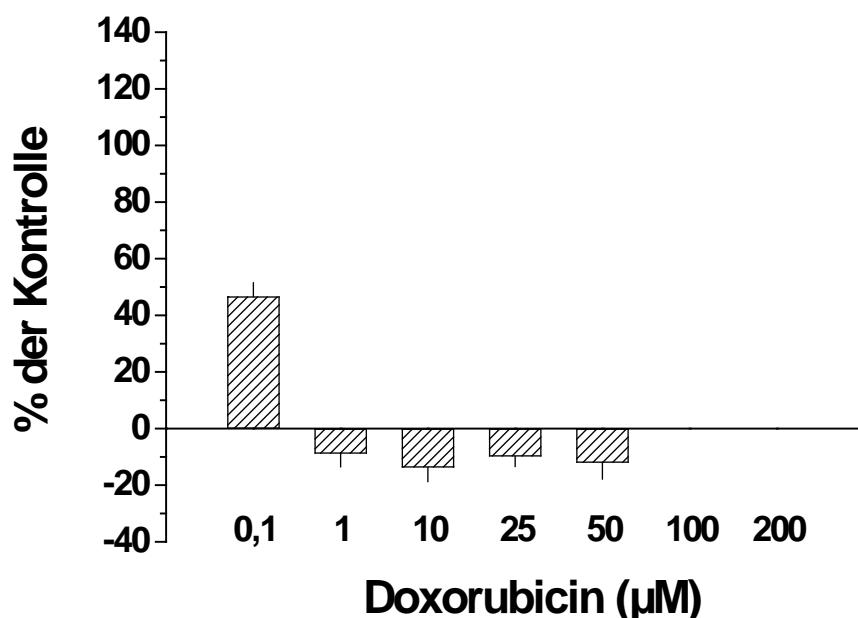


Abbildung 70. Volumenwachstum von HCT-116 Sphäroiden nach 72-stündiger Behandlung mit Doxorubicin. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für 8 behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Berechnet wurde $\Delta V = V_{d7} - V_{d4}$, das Volumenwachstum ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ($\Delta V_{\text{Kontrolle}} = 100\%$) dargestellt.

III.5.5.2 Epidoxorubicin

Im Monolayer (sowohl für die Zelllinie HT29, als auch HCT-116) zeigte bereits die Behandlung mit 0,1 μ M Epidoxorubicin eine Reduktion des APH Assaysignals von etwa 50% relativ zur unbehandelten Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Der routinemäßig eingesetzte Konzentrationsbereich wurde daher in den Bereich von 0,001 μ M - 200 μ M verschoben.

Doch auch die Behandlung mit 0,001 μ M Epidoxorubicin verringerte die Enzymaktivität in HT29 Monolayerkulturen relativ zur unbehandelten Kontrolle auf etwa 65%. Durch Zugabe von 10 μ M Wirkstoff konnte die Enzymaktivität auf < 10% reduziert werden (Abbildung 71), dieser Wert konnte bei höheren Dosen bis 200 μ M nicht weiter verringert werden. Der berechnete IC_{50} Wert für Monolayerkulturen liegt bei $0,2 \pm 0,1 \mu$ M. Bei einer Applikation von Epidoxorubicin in Dosen von 0,001 - 0,1 μ M zeigten HT29 Sphäroide eine deutlich verringerte Sensitivität. Die Behandlung mit Epidoxorubicin resultierte hier in keiner Reduktion des Assaysignals. Erst in höheren Dosen konnte eine Wirkung auf Sphäroid-Kulturen beobachtet werden. So lag das Assaysignal nach einer Behandlung mit 200 μ M Epidoxorubicin relativ zur unbehandelten Kontrolle bei ca. 15-20% (Abbildung 71). Der berechnete IC_{50} Wert für Sphäroid-Kulturen beträgt $1,0 \pm 0,7 \mu$ M. Entsprechend den Ergebnisse des APH Assays wurde bei Behandlung mit 0,001 μ M Epidoxorubicin kein Effekt auf das Volumenwachstums von HT29 Sphäroiden festgestellt. Bei einer Konzentration von 0,1 μ M jedoch konnte bereits eine Reduktion des Wachstums auf ca. 55% relativ zur unbehandelten Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 72). Bei Betrachtung der Sphäroidintegrität fiel auf, dass in diesen Sphäroiden eine starke Ablösung von Zellen auftrat (Abbildung 71). Im Konzentrationsbereich von 1-50 μ M nahm das Sphäroidvolumen nach 72-stündiger Behandlung mit Epidoxorubicin im Vergleich zum Ausgangsvolumen sogar ab (Abbildung 72). Weiterhin verursachten Dosen > 50 μ M einen Zerfall der behandelten Sphäroide (siehe Beispiel Abbildung 71), eine Berechnung des Sphäroidvolumenwachstum war hier daher nicht mehr möglich. Eine Restaktivität der sauren Phosphatase von ca. 20% relativ zur unbehandelten Kontrolle konnte mittels des APH Assays allerdings auch nach einer Behandlung mit 200 μ M Epidoxorubicin und dem Zerfall der Sphäroide nachgewiesen werden.

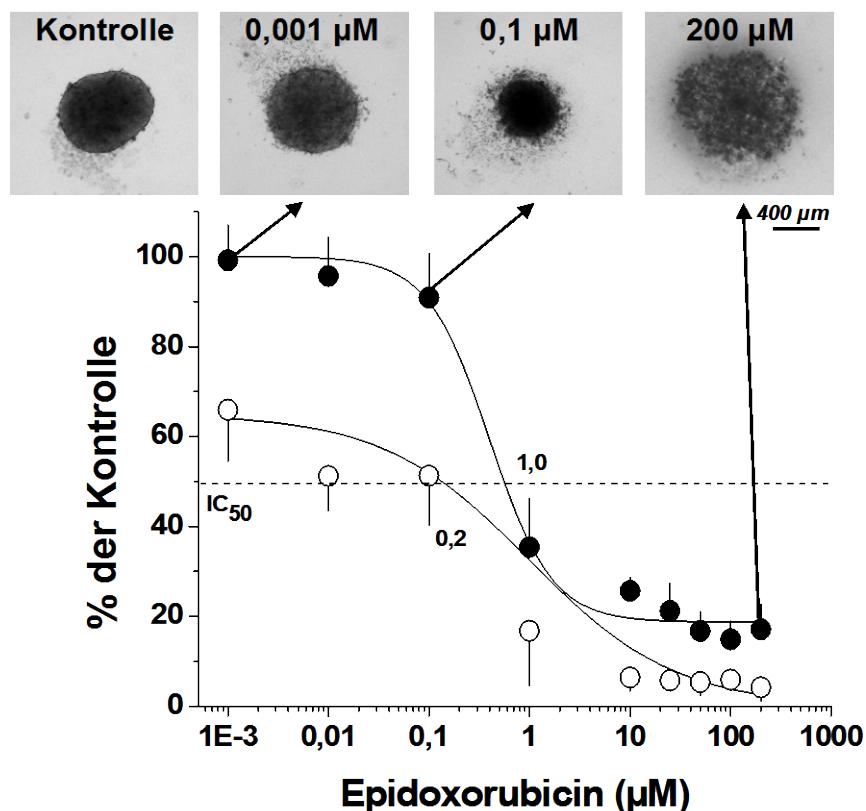


Abbildung 71. APH Aktivität/ Zellvitalität in HT29 Monolayer- (○) und Sphäroid-Kulturen (●) nach 72-stündiger Behandlung mit Epirubicin. Alle Datenpunkte der Dosis-Wirkungskurven sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 3$ individuelle Experimente mit je 8 behandelten und gemessenen Wells bzw. Sphäroiden pro Bedingung. Repräsentative Phasenkontrastbilder zeigen die Sphäroidintegrität nach Behandlung mit 0 μ M, 0,001 μ M, 0,1 μ M und 200 μ M Epirubicin. Vergrößerung 10x Objektiv. Hill Slope: Monolayer -0,3199; Sphäroid -0,4949.

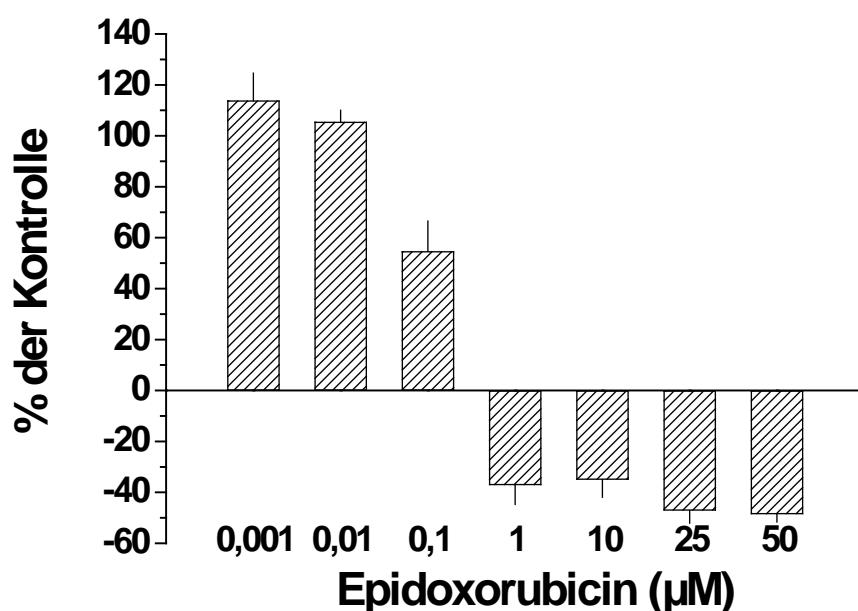


Abbildung 72. Volumenwachstum von HT-29 Sphäroiden nach 72-stündiger Behandlung mit Epirubicin. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für 8 behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Berechnet wurde $\Delta V = V_{d7} - V_{d4}$, das Volumenwachstum ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ($\Delta V_{\text{Kontrolle}} = 100\%$) dargestellt.

In HCT-116 Monolayer- und Sphäroid-Kulturen verringerte die Behandlung mit 0,001 μ M Epidoxorubicin die APH-Enzymaktivität auf etwa 85% relativ zur unbehandelten Kontrolle. In Monolayerkulturen konnte durch Zugabe von 200 μ M Wirkstoff das Enzymsignal reproduzierbar < 5% reduziert werden (Abbildung 73). Der berechnete IC₅₀ Wert für Monolayerkulturen liegt bei $0,2 \pm 0,1 \mu$ M. Bei einer Applikation von Epidoxorubicin in Dosen von 0,001-1 μ M zeigten HCT-116 Sphäroide einen identischen Verlauf der Dosis-Wirkungskurve. Eine maximale Hemmung des Assaysignals wurde hier schon nach Behandlung mit 10 μ M Epidoxorubicin erreicht (Abbildung 73). Auch in größeren Konzentrationen konnte dieser Wert von 35% nicht weiter unterschritten werden. Der berechnete IC₅₀ Wert für Sphäroid-Kulturen beträgt $2,1 \pm 1,8 \mu$ M.

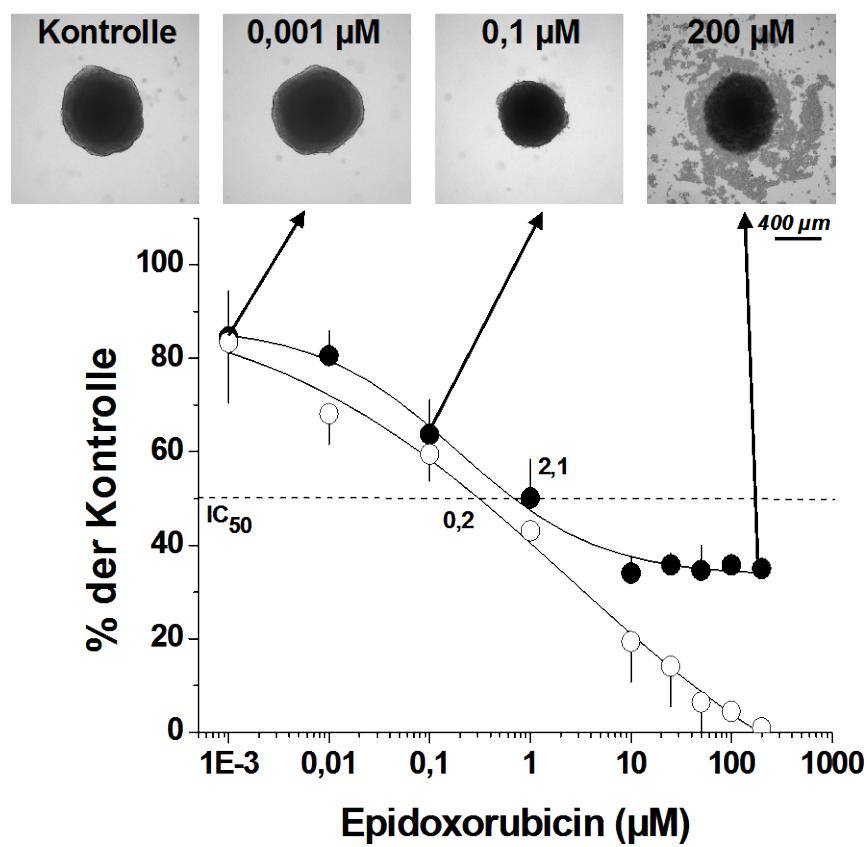


Abbildung 73. APH Aktivität/ Zellvitalität in HCT-116 Monolayer- (○) und Sphäroid-Kulturen (●) nach 72-stündiger Behandlung mit Epidoxorubicin. Alle Datenpunkte der Dosis-Wirkungskurven sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 3$ individuelle Experimente mit je 8 behandelten und gemessenen Wells bzw. Sphäroiden pro Bedingung. Repräsentative Phasenkontrastbilder zeigen die Sphäroidintegrität nach Behandlung mit 0 μ M, 0,001 μ M, 0,1 μ M und 200 μ M Epidoxorubicin. Vergrößerung 10x Objektiv. Hill Slope: Monolayer -0,3644; Sphäroid -0,2045.

Noch keine Auswirkungen auf das Volumenwachstum von HCT-116 Sphäroiden zeigte die Behandlung mit 0,001 μ M Epidoxorubicin. Eine Konzentration von 0,01 μ M jedoch führte bereits zu einer Reduktion des Wachstums um ca. 40%, bei einer Wirkstoffkonzentration von 0,1 μ M wurde keine Zunahme des Sphäroidvolumens gemessen (Abbildung 74). Im Gegen-

satz zur Integrität Epidoxorubicin-behandelter HT29 Sphäroide konnte in HCT-116 Sphäroiden kein Zellverlust beobachtet werden (Abbildung 73). Nach 72-stündiger Behandlung mit 1 μ M bzw. 10 μ M Epidoxorubicin nahm das Sphäroidvolumen im Vergleich zum Ausgangsvolumen sogar ab (Abbildung 74). Für Konzentrationen \geq 25 μ M war eine Berechnung des Volumenwachstums aufgrund des Zerfalls aller behandelten Sphäroide nicht mehr möglich. Allerdings wurde in diesen Wells mit Hilfe des APH Assays eine restliche Zellvitalität von ca. 35% relativ zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen. Abbildung 73 zeigt ein Beispiel eines zerfallenen Sphäroides nach Behandlung mit 200 μ M Epidoxorubicin

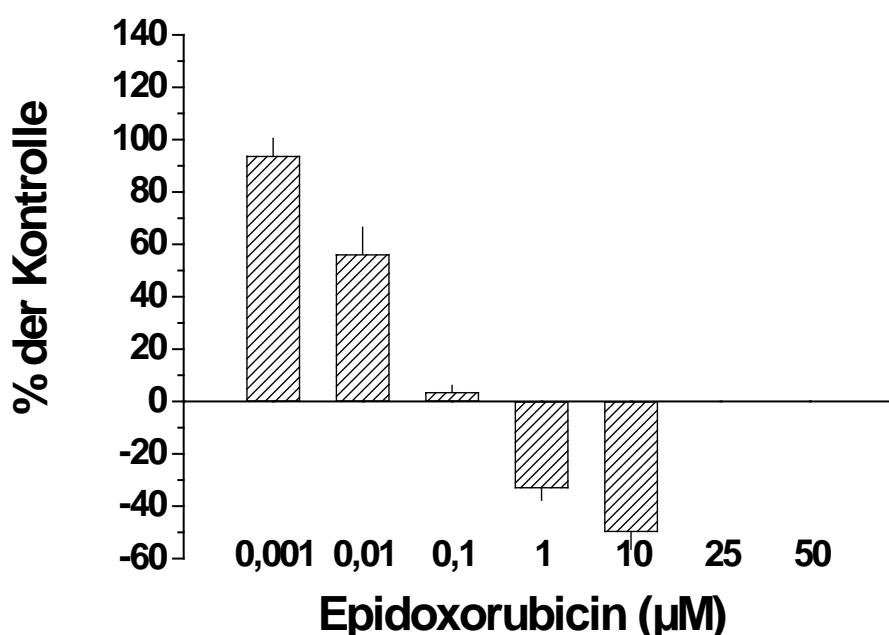


Abbildung 74. Volumenwachstum von HCT-116 Sphäroiden nach 72-stündiger Behandlung mit Epidoxorubicin. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für 8 behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Berechnet wurde $\Delta V = V_{d7} - V_{d4}$, das Volumenwachstum ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ($\Delta V_{\text{Kontrolle}} = 100\%$) dargestellt.

III.5.6 Topoisomerase-I-Inhibitoren

III.5.6.1 Irinotecan

Bei einer Applikation von 0,1 μ M Irinotecan zeigten HT29 Monolayer- und Sphäroid-Kulturen keine signifikante Reduktion des Assaysignals. In Monolayerkulturen resultierte die Behandlung mit 200 μ M Irinotecan jedoch in einem Verlust der Zellvitalität von mehr als 90% (Abbildung 75). Der berechnete IC_{50} Wert für Monolayerkulturen liegt bei $10,2 \pm 2,3 \mu$ M. HT29 Sphäroide zeigten eine deutlich verringerte Sensitivität gegenüber Irinotecan. Bei einer maximalen Wirkstoffkonzentration von 200 μ M kam es in Sphäroiden zu keiner Reduktion des APH Signals um mehr als 50%. Ein IC_{50} Wert kann für den verwendeten Konzentrationsbereich somit nicht angegeben werden (Abbildung 75). Die Bestimmung des Volumenwachstums zeigte sehr unterschiedliche Effekte von Irinotecan auf HT29 Sphäroide. So führte die

Wirkstoffbehandlung im Konzentrationsbereich von 0,1-10 μM sogar zu einer Zunahme des Volumenwachstums um 20-30% relativ zur unbehandelten Kontrolle. Bei einer Behandlung mit 25 μM Irinotecan wurde kein Effekt auf das Volumenwachstums festgestellt. Die Applikation von 100 μM Wirkstoff reduzierte das Wachstums schließlich um ca. 60% (Abbildung 76). Für die maximale Wirkstoffkonzentration von 200 μM konnte aufgrund des Zerfalls der behandelten Sphäroide (Abbildung 75) kein Volumenwachstum mehr ermittelt werden. Trotz des Zerfalls der Sphäroide lag das APH Assay Signal in diesen Wells immer noch bei > 50% relativ zur unbehandelten Kontrolle.

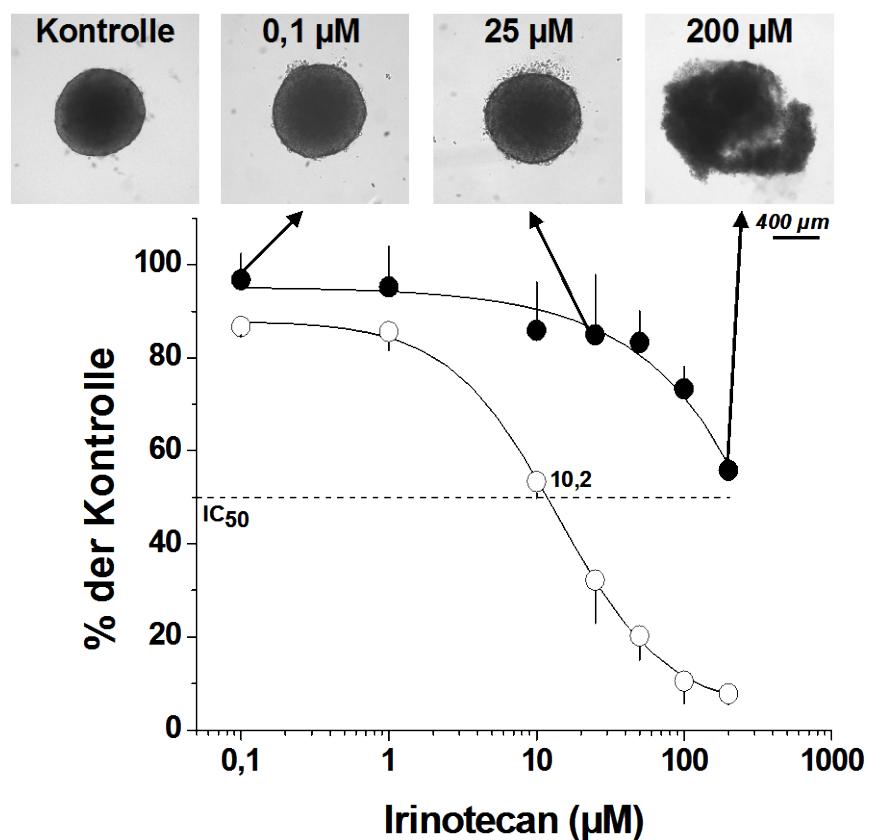


Abbildung 75. APH Aktivität/ Zellvitalität in HT29 Monolayer- (○) und Sphäroid-Kulturen (●) nach 72-stündiger Behandlung mit Irinotecan. Alle Datenpunkte der Dosis-Wirkungskurven sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 3$ individuelle Experimente mit je 8 behandelten und gemessenen Wells bzw. Sphäroiden pro Bedingung. Repräsentative Phasenkontrastbilder zeigen die Sphäroidintegrität nach Behandlung mit 0 μM , 0,1 μM , 25 μM und 200 μM Irinotecan. Vergrößerung 10x Objektiv. Hill Slope: Monolayer -0,7975; Sphäroid -0,5983.

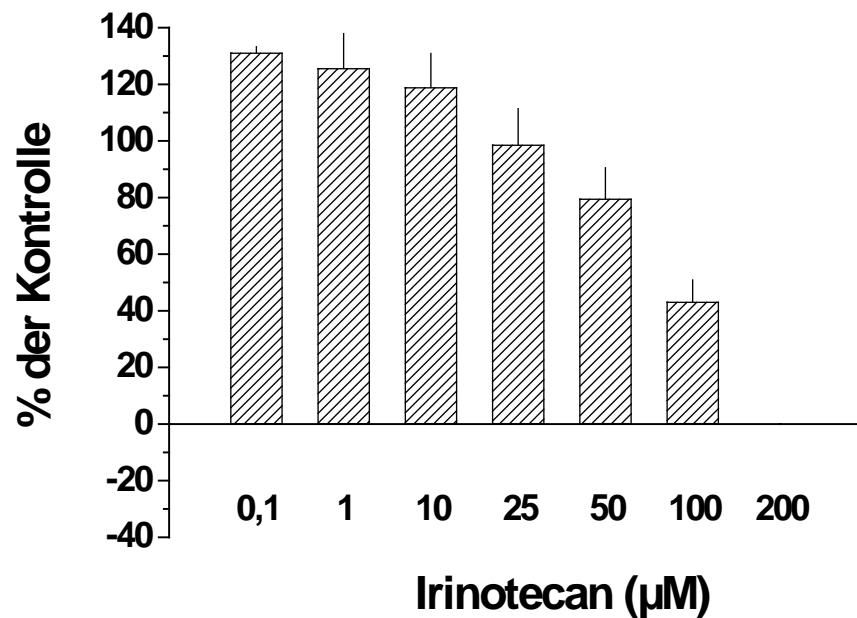


Abbildung 76. Volumenwachstum von HT29 Sphäroiden nach 72-stündiger Behandlung mit Irinotecan. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für 8 behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Berechnet wurde $\Delta V = V_{d7} - V_{d4}$, das Volumenwachstum ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ($\Delta V_{\text{Kontrolle}} = 100\%$) dargestellt.

Auch in HCT-116 Monolayer- und Sphäroid-Kulturen konnte bei einer Behandlung mit 0,1 μM Irinotecan keiner Reduktion des Assaysignals beobachtet werden. Im Konzentrationsbereich von 0,1 - 50 μM zeigten Monolayer- und MCTS-Kulturen einen ähnlichen Verlauf der Dosis-Wirkungskurven, erst in Dosen > 50 μM verringert sich die Sensitivität in Sphäroiden gegenüber Irinotecan. Eine Behandlung von HCT-116 Monolayerkulturen mit 200 μM Irinotecan resultierte in mehr als 95% Verlust der Zellvitalität (Abbildung 77). Der berechnete IC_{50} Wert für Monolayerkulturen liegt bei $20,5 \pm 3,9 \mu\text{M}$. Bei einer maximalen Wirkstoffkonzentration von 200 μM kam es in HCT-116 Sphäroiden dagegen zu einer Reduktion des APH Signals von lediglich 75%. Im Vergleich zum Monolayer weisen Sphäroide somit einen flacheren Verlauf der Dosis-Wirkungskurve auf (Abbildung 77). Der IC_{50} Wert für Sphäroide wurde auf $27,0 \pm 3,7 \mu\text{M}$ bestimmt. Wie schon für den APH Assay beschrieben zeigte auch die Analyse des Volumenwachstums von HCT-116 Sphäroiden keinen Effekt einer Behandlung mit 0,1 μM Irinotecan. Bei einer Konzentration von 0,1 μM allerdings wurde das Wachstums bereits um 35%, bei einer Konzentration von 10 μM sogar um 90% gehemmt (Abbildung 78). Nach 72-stündiger Behandlung mit 25 μM bzw. 50 μM Irinotecan konnte eine Abnahme des Sphäroidvolumens im Vergleich zum Ausgangsvolumen beobachtet werden. Dosen > 100 μM führten zu einem Zerfall der behandelten Sphäroide, was eine Berechnung des Sphäroidvolumenwachstum verhinderte. Jedoch konnte auch nach Behandlung mit 200 μM Irinotecan und dem dadurch bedingten Zerfall der Sphäroide (Abbildung 77) eine Zellvitalität von ca. 30% relativ zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden.

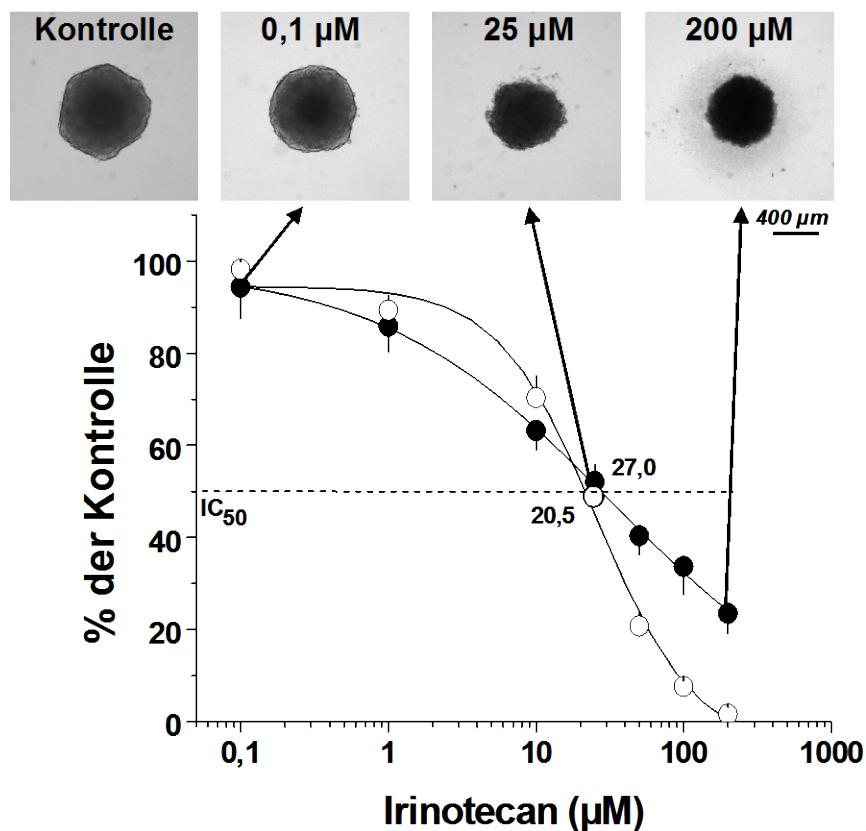


Abbildung 77. APH Aktivität/ Zellvitalität in HCT-116 Monolayer- (○) und Sphäroid-Kulturen (●) nach 72-stündiger Behandlung mit Irinotecan. Alle Datenpunkte der Dosis-Wirkungskurven sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 3$ individuelle Experimente mit je 8 behandelten und gemessenen Wells bzw. Sphäroiden pro Bedingung. Repräsentative Phasenkontrastbilder zeigen die Sphäroidintegrität nach Behandlung mit 0 μ M, 0,1 μ M, 25 μ M und 200 μ M Irinotecan. Vergrößerung 10x Objektiv. Hill Slope: Monolayer -1,349; Sphäroid -0,5403.

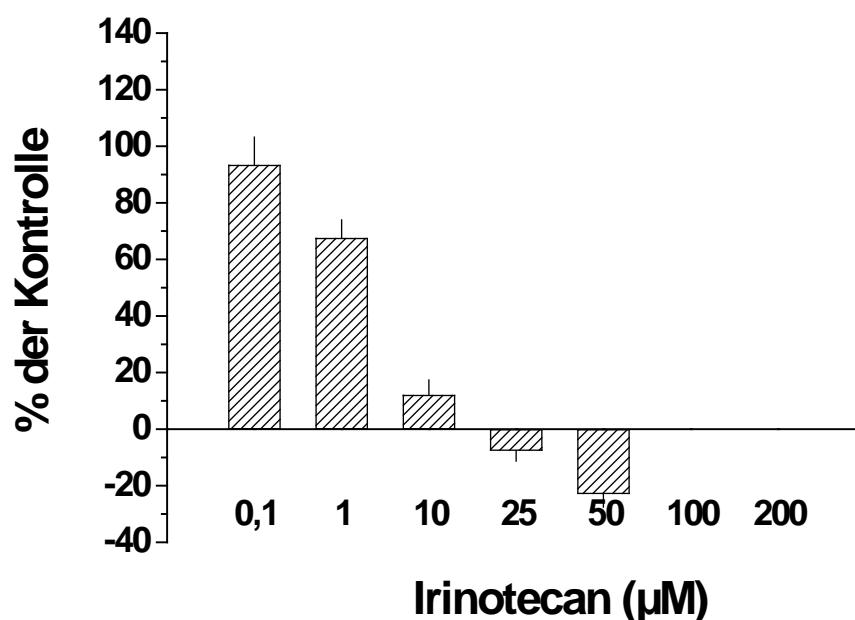


Abbildung 78. Volumenwachstum von HCT-116 Sphäroiden nach 72-stündiger Behandlung mit Irinotecan. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für 8 behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Berechnet wurde $\Delta V = V_{d7} - V_{d4}$, das Volumenwachstum ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ($\Delta V_{\text{Kontrolle}} = 100\%$) dargestellt.

III.5.7 Neue Wirkstoffkandidaten

Zusätzlich zur Bestimmung zytotoxischer Effekte von zehn bereits bekannten Anti-Tumor-Wirkstoffen sollte in der vorliegenden Arbeit die Wirksamkeit zweier neuer Wirkstoffkandidaten in Sphäroiden und Monolayern mit Hilfe des APH Assays untersucht werden. Hierfür wurden der Topoisomerase-I-Inhibitor WMC-79 und FLT3 Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor C-1311 verwendet.

III.5.7.1 Topoisomerase-I-Inhibitor WMC-79

Aufgrund der hohen Sensitivität von Monolayer- und Sphäroid-Kulturen der beiden Zelllinien HT29 und HCT-116 gegenüber WMC-79 wurde die routinemäßig niedrigste eingesetzte Konzentration von 0,1 μ M nach ersten Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) auf 0,01 nM verschoben. Eine Behandlung mit WMC-79 im Konzentrationsbereich von 0,01 nM - 200 μ M zeigte einen großen Unterschied der Wirkstoffeffizienz dieses neuen Anti-Tumor-Wirkstoff-Kandidaten auf Monolayer- und Sphäroid-Kulturen.

In HT29 Monolayerkulturen wurde die Enzymaktivität nach einer Behandlung mit 0,01 nM bereits auf 65% relativ zur unbehandelten Kontrolle verringert. Ab Konzentration \geq 10 μ M lag das Assaysignal reproduzierbar unter 5% relativ zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 79). Der berechnete IC_{50} Wert für Monolayerkulturen liegt bei $0,03 \pm 0,03$ nM. HT29 Sphäroide zeigten eine deutlich verringerte Sensitivität gegenüber WMC-79. Die Behandlung mit 0,01 nM WMC-79 resultierte hier nicht in einer vergleichbaren Reduktion des Assaysignals. Tatsächlich konnte eine Wirkung in Sphäroid-Kulturen erst in höheren Dosen nachgewiesen werden. Allerdings war durch Zugabe der höchsten eingesetzten Konzentration eine Reduktion der Enzymaktivität auf lediglich 35-40% festzustellen (Abbildung 79). Der berechnete IC_{50} Wert für HT29 Sphäroid-Kulturen liegt bei $1,7 \pm 1,5$ μ M. Die Analyse des Volumenwachstums lieferte keinen eindeutigen Trend für die Effektivität von WMC-79 in HT29 Sphäroiden. Im Konzentrationsbereich von 0,01 nM bis 100 μ M konnte zwar eindeutig eine Reduktion des Volumenwachstums bestimmt werden, diese jedoch lief nicht mit steigenden Konzentrationen konform (Abbildung 80). Der Einsatz der maximalen Wirkstoffkonzentration von 200 μ M führte zu einem Zerfall der behandelten Sphäroide (Abbildung 79), ein Bestimmung des Volumenwachstum war somit nicht mehr möglich. Trotz des Zerfalls der Sphäroide lag das APH Assay Signal in diesen Wells immer noch bei ca. 35% relativ zur unbehandelten Kontrolle.

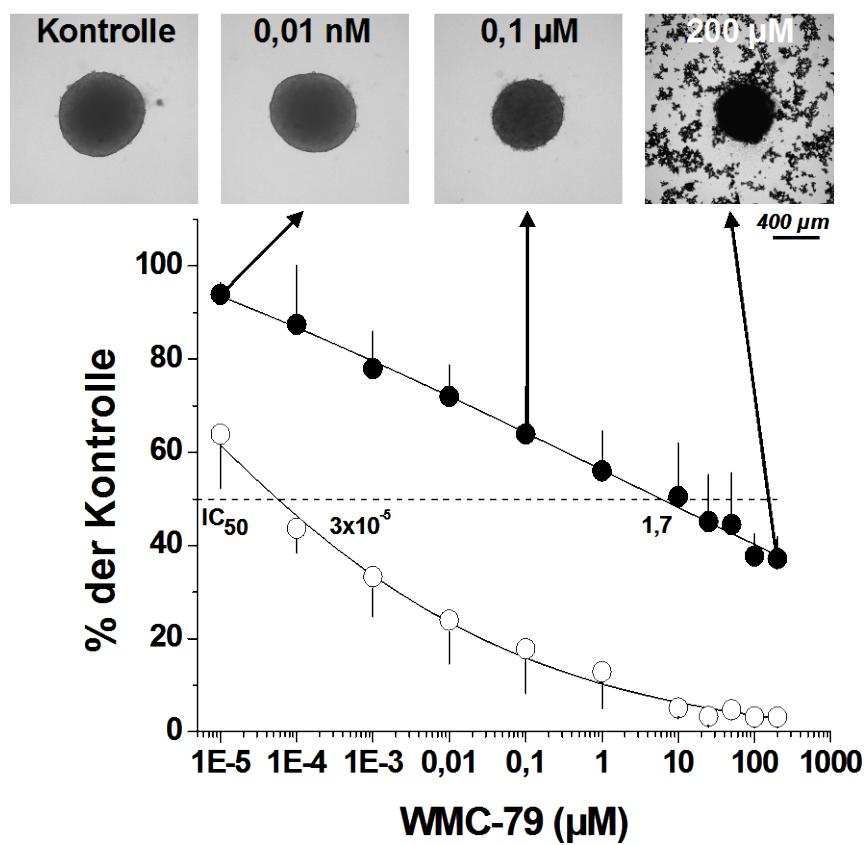


Abbildung 79. APH Aktivität/ Zellvitalität in HT29 Monolayer- (○) und Sphäroid-Kulturen (●) nach 72-stündiger Behandlung mit WMC-79. Alle Datenpunkte der Dosis-Wirkungskurven sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 3$ individuelle Experimente mit je 8 behandelten und gemessenen Wells bzw. Sphäroiden pro Bedingung. Repräsentative Phasenkontrastbilder zeigen die Sphäroidintegrität nach Behandlung mit 0 μ M, 0,01 nM, 0,1 μ M und 200 μ M WMC-79. Vergrößerung 10x Objektiv. Hill Slope: Monolayer -0,2282; Sphäroid -0,1588.

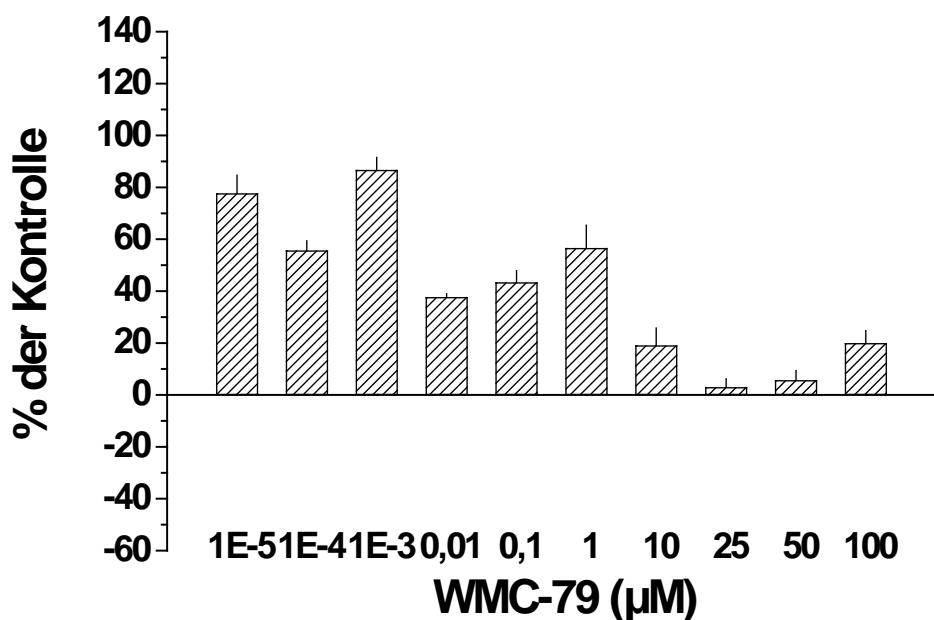


Abbildung 80. Volumenwachstum von HT29 Sphäroiden nach 72-stündiger Behandlung mit WMC-79. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für 8 behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Berechnet wurde $\Delta V = V_{d7} - V_{d4}$, das Volumenwachstum ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ($\Delta V_{\text{Kontrolle}} = 100\%$) dargestellt.

Eine Behandlung mit 0,01 nM WMC-79 konnte die Enzymaktivität im HCT-116 Monolayer bereits auf > 80% relativ zur unbehandelten Kontrolle verringern. Wie bei HT29 Zellen lag das Assaysignal ab Konzentration \geq 10 μ M reproduzierbar unter 5% relativ zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 81). Der berechnete IC_{50} Wert für Monolayerkulturen liegt bei $2,0 \pm 2,0$ nM. Im Vergleich zum Monolayer wiesen auch HCT-116 Sphäroide eine deutlich verringerte Sensitivität gegenüber WMC-79 auf. So konnte bei einer Behandlung mit 0,01 nM keine Reduktion des Assaysignals beobachtet werden. Erst der Einsatz höherer Konzentrationen zeigte eine Wirkung in Sphäroid-Kulturen. Durch Zugabe von 200 μ M Wirkstoff konnte die Enzymaktivität allerdings auf lediglich 20% reduziert werden (Abbildung 81). Der berechnete IC_{50} Wert für Sphäroid-Kulturen liegt bei $5,5 \pm 7,0$ μ M.

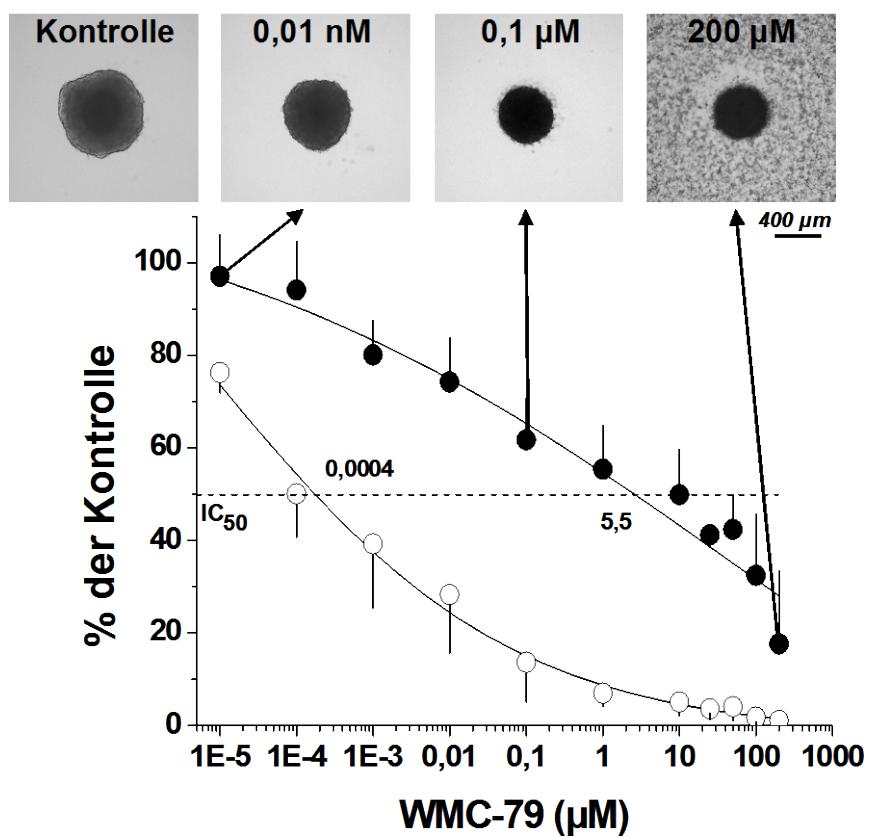


Abbildung 81. APH Aktivität/ Zellvitalität in HCT-116 Monolayer- (○) und Sphäroid-Kulturen (●) nach 72-stündiger Behandlung mit WMC-79. Alle Datenpunkte der Dosis-Wirkungskurven sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 3$ individuelle Experimente mit je 8 behandelten und gemessenen Wells bzw. Sphäroiden pro Bedingung. Repräsentative Phasenkontrastbilder zeigen die Sphäroidintegrität nach Behandlung mit 0 μ M, 0,01 nM, 0,1 μ M und 200 μ M WMC-79. Vergrößerung 10x Objektiv. Hill Slope: Monolayer -0,3365; Sphäroid -0,2080.

Auch bei der Analyse des Volumenwachstums konnte für 0,01 nM WMC-79 kein Effekt auf HCT-116 Sphäroiden beobachtet werden. Die Behandlung mit 0,1 nM WMC-79 allerdings reduzierte das Wachstum schlagartig um > 90% (Abbildung 82). Im Konzentrationsbereich von 0,01-25 μ M wurde sogar ein verringertes Sphäroidvolumen nach 72-stündiger Behandlung im Vergleich zum Ausgangsvolumen beobachtet (Abbildung 82). Für Konzentrationen \geq

50 μM konnte kein Volumenwachstum mehr berechnet werden, da hier alle behandelten Sphäroide zerfielen. Trotz dieses Zerfalls, auch nach einer Behandlung mit 200 μM WMC-79 (Abbildung 81), lag das APH Assay Signal in diesen Wells bei knapp 20% relativ zur unbehandelten Kontrolle.

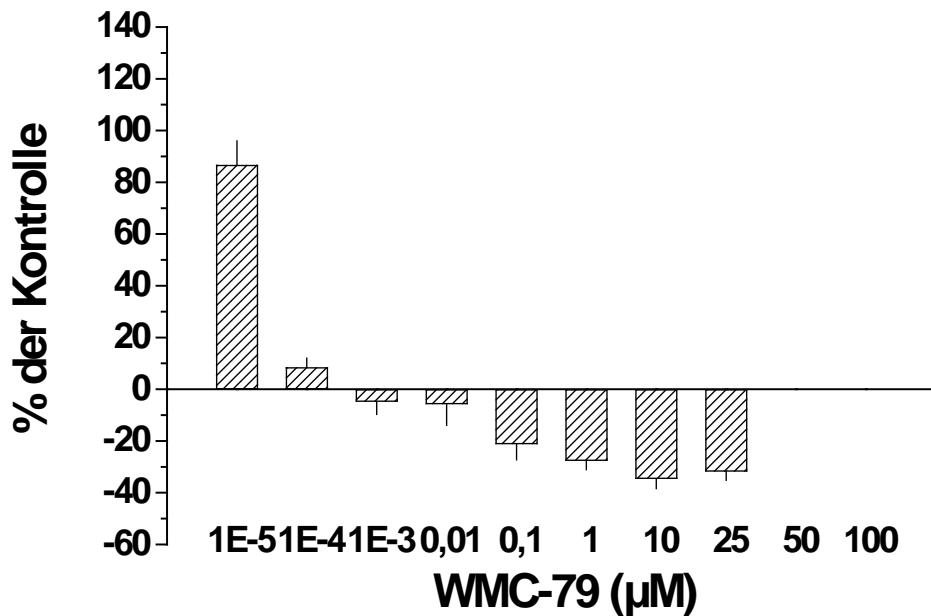


Abbildung 82. Volumenwachstum von HCT-116 Sphäroiden nach 72-stündiger Behandlung mit WMC-79. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für 8 behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Berechnet wurde $\Delta V = V_{d7} - V_{d4}$, das Volumenwachstum ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ($\Delta V_{\text{Kontrolle}} = 100\%$) dargestellt.

III.5.7.2 FLT3 Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor C-1311

Für den neuen Anti-Tumor-Wirkstoff-Kandidaten C-1311 konnte ebenfalls ein hoch signifikanter Unterschied der Wirkstoffeffizienz auf Monolayer- und Sphäroid-Kulturen beobachtet werden.

Das APH Assaysignal wurde in HT29 Monolayerkulturen nach einer Behandlung mit 0,1 μM C-1311 auf 80% relativ zur unbehandelten Kontrolle verringert. Wirkstoffkonzentrationen $\geq 25 \mu\text{M}$ reduzierten die Enzymaktivität reproduzierbar auf $\leq 10\%$ (Abbildung 83). Der berechnete IC_{50} Wert für Monolayerkulturen liegt bei $1,7 \pm 1,2 \mu\text{M}$. HT29 Sphäroide zeigten eine deutlich verringerte Sensitivität gegenüber C-1311. Hier bewirkte die Behandlung mit 0,1 μM C-1311 keine Reduktion des Assaysignals. In höheren Dosen jedoch konnte eine Wirkung auf Sphäroid-Kulturen nachgewiesen werden. Die maximale Hemmung der Enzymaktivität im getesteten Konzentrationsbereich lag hier bei etwa 60% (Abbildung 83). Der berechnete IC_{50} Wert für Sphäroid-Kulturen beträgt bei $56,7 \pm 30,2 \mu\text{M}$.

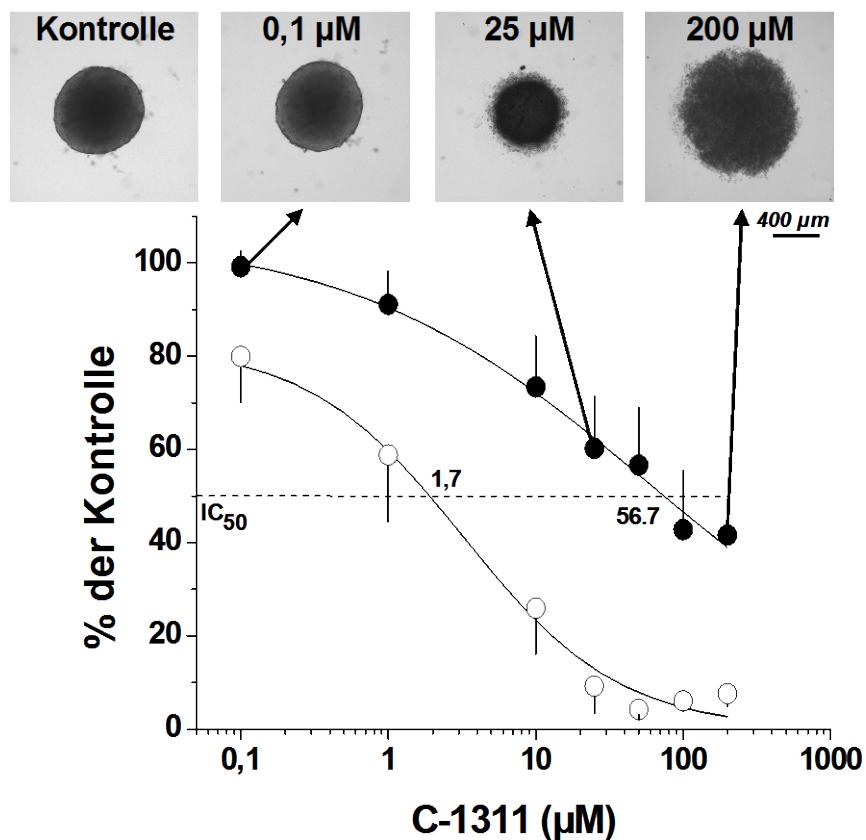


Abbildung 83. APH Aktivität/ Zellvitalität in HT29 Monolayer- (○) und Sphäroid-Kulturen (●) nach 72-stündiger Behandlung mit C-1311. Alle Datenpunkte der Dosis-Wirkungskurven sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 3$ individuelle Experimente mit je 8 behandelten und gemessenen Wells bzw. Sphäroiden pro Bedingung. Repräsentative Phasenkontrastbilder zeigen die Sphäroidintegrität nach Behandlung mit 0 µM, 0,1 µM, 25 µM und 200 µM C-1311. Vergrößerung 10x Objektiv. Hill Slope: Monolayer -0,6463; Sphäroid -0,4906.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen des APH Assays ergab die Analyse des Volumenwachstums, dass bereits eine Behandlung mit 0,1 µM C-1311 das Wachstum von HT29 Sphäroiden auf 30% relativ zur unbehandelten Kontrolle hemmt (Abbildung 84). Bei einer Konzentration von 10 µM wurde eine Reduktion des Sphäroidwachstums um 90% beobachtet. Im Vergleich zum Ausgangsvolumen nahm das Sphäroidvolumen nach 72-stündiger Behandlung mit 25 µM C-1311 sogar ab (Abbildung 84), wobei diese Phänomene hier auf eine starke Ablösung von Zellen aus dem 3-D Aggregat zurückgeführt werden konnten (Abbildung 83). Aufgrund des Zerfalls von mehr als der Hälfte der behandelten Sphäroide war eine Bestimmung des Volumenwachstums für Konzentrationen ≥ 50 µM nicht mehr möglich. HT29 Zellen zeigten allerdings auch nach dem Zerfall der Sphäroide eine APH Enzymaktivität von ca. 40% relativ zur unbehandelten Kontrolle. Ein Beispiel eines zerfallenen Sphäroides nach Behandlung mit 200 µM C-1311 ist in Abbildung 83 gegeben.

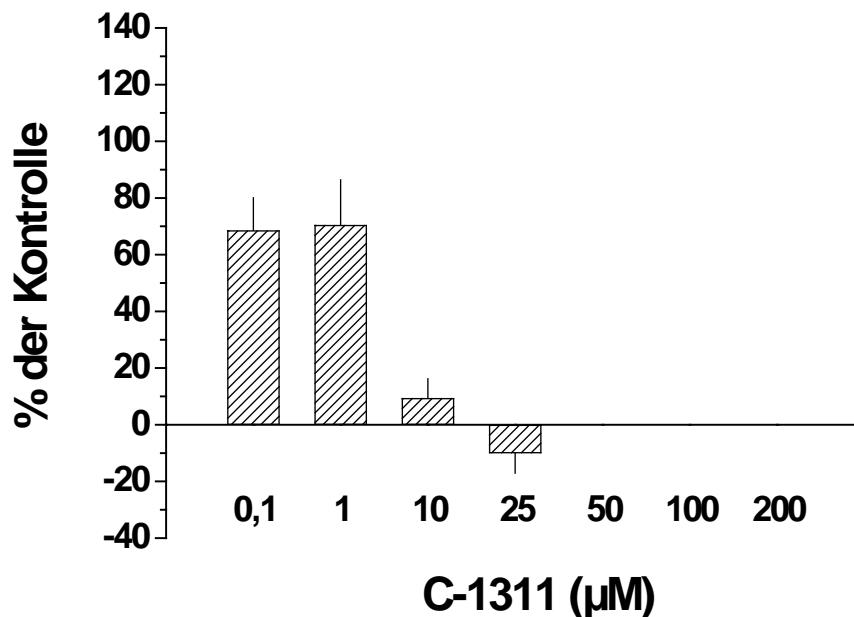


Abbildung 84. Volumenwachstum von HT29 Sphäroiden nach 72-stündiger Behandlung mit C-1311. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für 8 behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Berechnet wurde $\Delta V = V_{d7} - V_{d4}$, das Volumenwachstum ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ($\Delta V_{\text{Kontrolle}} = 100\%$) dargestellt.

Für HCT-116 Zellen resultierte die Behandlung mit 0,1 μM C-1311 in beiden Kultursystemen in keiner Reduktion des Assaysignals. Im Monolayer lag die Enzymaktivität ab Wirkstoffkonzentrationen $\geq 50 \mu\text{M}$ reproduzierbar unter 5% relativ zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 85). Der berechnete IC_{50} Wert für HCT-116 Monolayerkulturen liegt bei $2,7 \pm 1,3 \mu\text{M}$. Ab Konzentrationen von $\geq 10 \mu\text{M}$ zeigten Sphäroidzellen eine deutlich verringerte Sensitivität gegenüber WMC-79 als HCT-116 Monolayerzellen. Die maximale Hemmung der Enzymaktivität im getesteten Konzentrationsbereich lag hier bei etwa 60% (Abbildung 85). Der IC_{50} Wert für Sphäroid-Kulturen beträgt bei $31,7 \pm 19,6 \mu\text{M}$. Konnte mit Hilfe des APH Assays noch kein Effekt nachgewiesen werden, so führten 0,1 μM C-1311 in HCT-116 Sphäroiden bereits zu einer Hemmung des Volumenwachstums $\geq 50\%$ relativ zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 86). Diese starke Reduktion konnte aber nach Analyse der Sphäroidintegrität nicht auf eine Zellablösung zurückgeführt werden (Abbildung 85). Wirkstoffdosen von 1-50 μM zeigten sogar ein verringertes Sphäroidvolumen nach 72-stündiger Behandlung im Vergleich zum Ausgangsvolumen (Abbildung 86). Für Konzentrationen $\geq 100 \mu\text{M}$ konnte kein Volumenwachstum der Sphäroide berechnet werden, da erneut mehr als 50% der behandelten Sphäroide zerfielen. Obwohl eine Behandlung mit 200 μM C-1311 den Zerfall aller HCT-116 Sphäroide zur Folge hatte (Abbildung 69), lag das APH Assay Signal in diesen Wells immer noch bei ungefähr 35-40%.

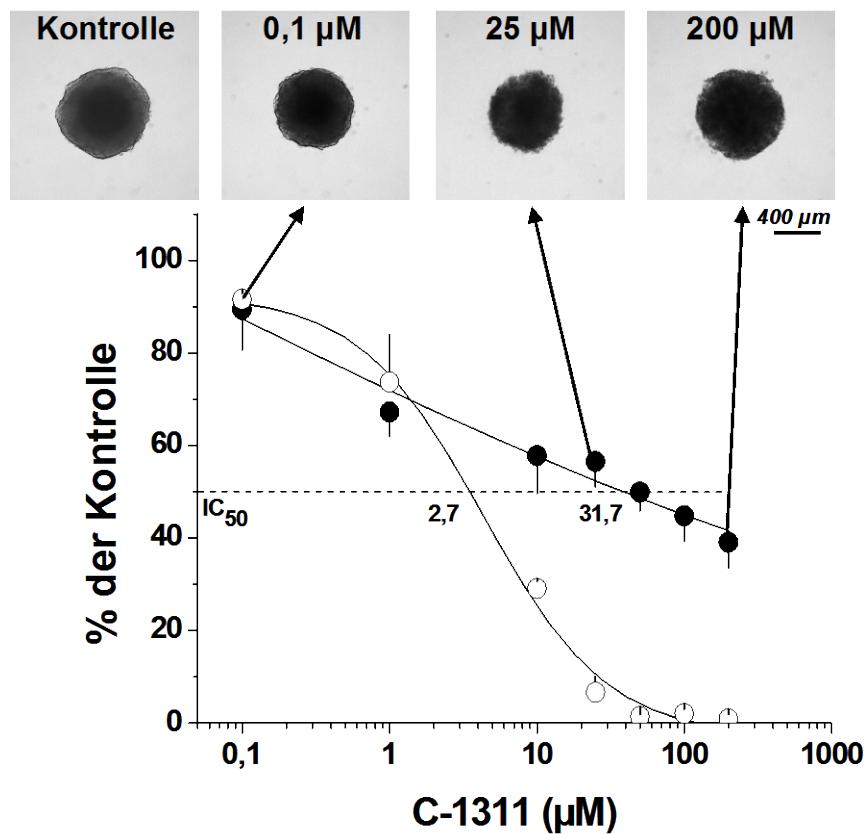


Abbildung 85. APH Aktivität/ Zellvitalität in HCT-116 Monolayer- (○) und Sphäroid-Kulturen (●) nach 72-stündiger Behandlung mit C-1311. Alle Datenpunkte der Dosis-Wirkungskurven sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 3$ individuelle Experimente mit je 8 behandelten und gemessenen Wells bzw. Sphäroiden pro Bedingung. Repräsentative Phasenkontrastbilder zeigen die Sphäroidintegrität nach Behandlung mit 0 μ M, 0,1 μ M, 25 μ M und 200 μ M C-1311. Vergrößerung 10x Objektiv. Hill Slope: Monolayer -0,9692; Sphäroid -0,2698.

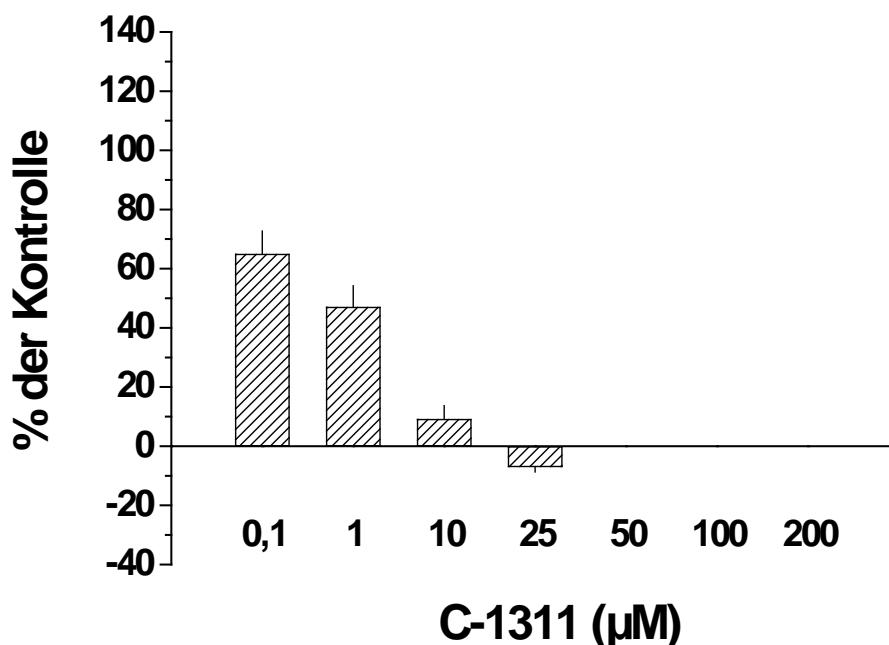


Abbildung 86. Volumenwachstum von HCT-116 Sphäroiden nach 72-stündiger Behandlung mit C-1311. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für 8 behandelte und gemessene Wells bzw. Sphäroide pro Bedingung. Berechnet wurde $\Delta V = V_{d7} - V_{d4}$, das Volumenwachstum ist relativ zur unbehandelten Kontrolle ($\Delta V_{\text{Kontrolle}} = 100\%$) dargestellt.

III.6 Kombination des APH Assays mit komplexem Genexpressionsmonitoring (HITSSM)

Um die Effizienz von potentiellen Wirkstoffen in Monolayer- gegenüber Sphäroid-Kulturen besser beurteilen zu können, wurden diese beiden Kultursysteme zusätzlich zu den Untersuchungen mit dem APH Assay mittels komplexem Expressionsmonitoring (HITSSM) analysiert. Dabei sollte geklärt werden, ob die mit Hilfe des APH Assays ermittelten, im Monolayer und Sphäroid zumeist unterschiedlichen Effekte (siehe Kapitel III.5) nicht allein auf einer erschweren Diffusion der einzelnen Wirkstoffe im Sphäroid beruhen, sondern vielmehr eine differentielle Expression verschiedener Gene in den beiden Kultursystemen für diesen Unterschied verantwortlich ist.

III.6.1 Vergleich der Genexpression in 5-FU bzw. WMC-79 behandelten HT29-Zellen

In einem ersten Versuchsansatz wurden die Wirkstoffe 5-FU und WMC-79 in Monolayer- und Sphäroid-Kulturen der Zelllinie HT29 zur Darstellung eines Effektes auf deren RNA-Expressionsmuster hin getestet. Untersucht wurden hier die Stadien exponentiell wachsender bzw. konfluenter Monolayer und Sphäroide mit einem Durchmesser von 400 µm (ohne sekundäre Nekrose) bzw. 700 µm (mit sekundärer Nekrose). Nach Aussaat der Zellen wurden diese unter Standardbedingungen bis zur gewünschten Größe bzw. bis zum gewünschten Stadium inkubiert. Danach folgte eine 72-stündige Wirkstoffbehandlung (siehe Kapitel II.4.2) mit anschließender Zellyse und RNA-Isolation. Neben den Kontrollen (0 µM) wurden zur Behandlung der unterschiedlichen Kultursysteme Wirkstoffdosen verwendet, die laut APH Assays in etwa im Bereich des IC₅₀ liegen (0,5 µM) bzw. annähernd zur maximalen Hemmung der Zellvitalität (50 µM) führen (Kapitel II.5.1.1 und II.5.7.1). Die Auswertung der Affimetrix Genexpressionsanalyse erfolgte mit Hilfe der IOS GeneLinker Platinum Software. Die Auswahl der Achsen PC1, PC2 und PC3 wurde nach der Clusteranalyse bestimmter Genexpressionsmuster mittels „Principle Component Analysis“ (PCA) festgelegt (Abbildung 87). Hierbei konnte auf die langjährige Erfahrung des Kooperationspartners Avalon Pharmaceuticals bei der Analyse von Genexpressionsmustern zurückgegriffen werden. Bei der in Abbildung 88 gezeigten Auswertung ist ein deutliches Clustering der Sphäroidzellen zu erkennen (gelb-schwarz), das relativ unabhängig von Wirkstoff, Wirkstoffkonzentration und Sphäroidgröße ist. Das Expressionsmuster in Sphäroiden unterscheidet sich systematisch von der Genexpression in Monolayerzellen. Dagegen kann bei Monolayerzellen eine stärkere Auf trennung nach Wirkstoff, Wirkstoffkonzentration und Wachstumsstatus beobachtet werden.

Nach den Arbeiten mit HT29 Zellen wurden auch Studien zur Genexpression der Zelllinien HCT-116, KM12L4A, T47D, BT474, MCF-7, A549 und NCI-H460 in Monolayer- und Sphäroid-Kultur ohne Wirkstoffbehandlung durchgeführt. Erste Analysen der Expressionmuster lassen auf ähnlich Ergebnisse, wie für unbehandelte HT29 Zellen schließen (Daten nicht gezeigt).

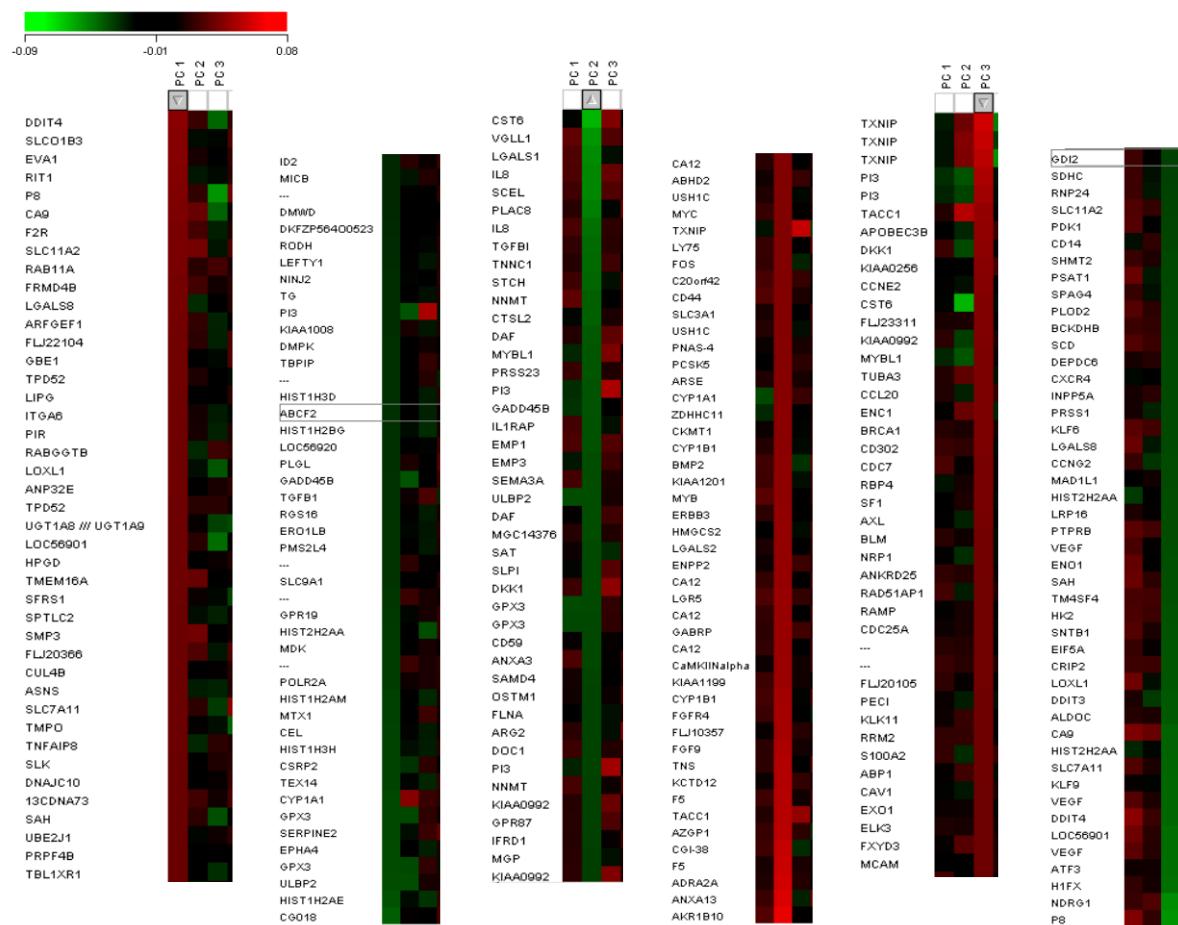


Abbildung 87. Genexpressionsmuster von 5-FU bzw. WMC-79 behandelten HT29 Zellen im Monolayer und als MCTS nach „Principle Component Analysis“ (PCA).

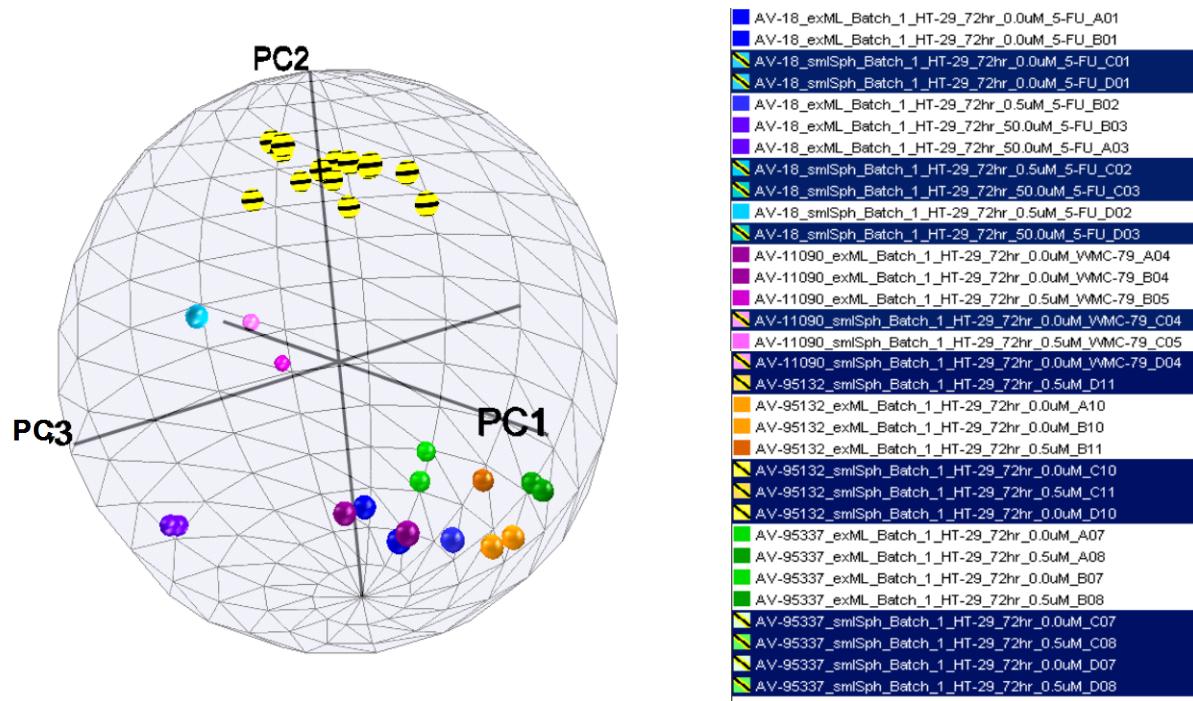


Abbildung 88. Expressionsanalytik von 5-FU bzw. WMC-79 behandelten HT29 Zellen im Monolayer und als MCTS mittels Affymetrix Gene Arrays mit anschließender Clusteranalyse via IOS GeneLinker Platinum Software.

IV. Diskussion

IV.1 Standardisierung und (Teil-)Automatisierung

Erkenntnisse aus mehr als drei Jahrzehnten Forschung lassen darauf schließen, dass der Einsatz von 3-D Zellkulturmodellen wie dem Sphäroidsystem im industriellen Screening einen bedeutenden Beitrag zur effektiven Auswahl von Wirkstoffkandidaten und deren Anwendung leisten wird (Mueller-Klieser 2000). Jedoch wird das Sphäroidmodell momentan im Wesentlichen an akademischen Institutionen und kaum von der Industrie zur Testung von Wirkstoffen eingesetzt. Die wesentlichen Ursachen für den geringen/fehlenden Stellenwert im Routineprozess der sekundären Wirkstofftestung liegen in den komplexen und bisher wenig standardisierten Kultur- und Analysetechnologien (Kunz-Schughart et al. 1998; Kunz-Schughart et al. 2004).

IV.1.1 Sphäroidkultivierung

Grundanforderungen an ein Sphäroid-Kultivierungssystem für einen möglichen Einsatz bei der industriellen Wirkstofftestung sind: reproduzierbare Ergebnisse bei der Sphäroidbildung, die Analyse einzelner Sphäroide vor und nach Behandlung, sowie ein geringer Verbrauch von Testsubstanzen. Diese Voraussetzungen werden zur Zeit am besten von einer stationären Zellkulturtechnologie erfüllt, bei der aggregierende Tumorzellen auf Agarose-beschichtete 96-Well Mikrotiterplatten ausgesät werden (Acker et al. 1992; Kunz-Schughart et al. 1998; Kunz-Schughart et al. 2000b). Die auch in dieser Arbeit verwendete Methode der Beschichtung mit Agarose ist zeitintensiv und nur bedingt standardisierbar. Dies gilt auch für Beschichtung von Rundbodenplatten mit 0,5% poly-HEMA, eine Technik die bereits von anderen Arbeitsgruppen durchgeführt wurde (Tong et al. 1992; Hoevel et al. 2004; Ivascu et al. 2006).

Auf der Suche nach standardisierten und vereinfachten Bedingungen zur Kultivierung von Sphäroiden wurden im Rahmen dieser Arbeit neue, industriell gefertigte, anti-adhäsive Oberflächenbeschichtungen getestet. Mit Platten der Fa. NuncTM konnten erstmals an einem kommerziell erhältlichen Plattensystem sehr gute und reproduzierbare Ergebnisse bei der Sphäroidbildung erzielt werden. Mit dem Plattensystem „Low-Cell-Binding U96“ konnte jedoch ab einer gewissen Produktionscharge keine reproduzierbaren Ergebnisse mehr erbracht werden. Ein Grund hierfür könnten leichte Veränderungen beim Beschichtungsprozess sein, die in Zusammenarbeit mit NuncTM allerdings nicht ausfindig gemacht werden konnten. Ein zweites Plattensystem der Fa. NuncTM konnte erneut eine gleichmäßige, reproduzierbare Generierung von Sphäroiden gewährleisten. Da sich dieses Plattensystem noch in der Testphase befindet, konnte allerdings bislang nur eine Produktionscharge getestet werden. Dennoch besteht Grund zur Hoffnung, dass auch spätere Chargen dieser „HydroCell“-

Platten für die Kultivierung von Tumorsphäroiden geeignet sind und zu einer Arbeitserleichterung durch Vermeidung der manuellen Beschichtung mit Agarose führen. Der Einsatz dieser Mikrotiterplatten ist somit ein weiterer Schritt hin zur standardisierten und vereinfachten Kultivierung von Sphäroiden. Mit der Fa. Nunc™ wurde im Folgenden eine wissenschaftliche Zusammenarbeit initiiert, um eine weiterführende Testung durchzuführen, aus der unter anderem eine methodische Abhandlung resultieren soll.

Ein weiterer Aspekt, der einen Einsatz von Sphäroiden bei der sekundären Wirkstofftestung ermöglichen könnte, ist die in dieser Arbeit etablierte (Teil-)Automatisierung der Sphäroidkultivierung unter Verwendung des *SerialMate® Automated Multichannel Pipetting Systems*. Die Etablierung dieses Systems zur schnellen und reproduzierbaren Aussaat und Wirkstoffbehandlung von MCTSs führt nicht nur zu einem enorm verringerten Zeit- und Arbeitsaufwand, sondern könnte zusätzlich den industriellen Stellenwert von Sphäroiden weiter forcieren.

IV.1.2 Sphäroidanalytik

Wie bereits erwähnt ist auch die teilweise sehr komplexe und eher wenig standardisierte Analyse von Sphäroiden mit dafür verantwortlich, dass Sphäroide in nur geringem Maße eine Anwendung in der industriellen Testung von Wirkstoffen finden. Obwohl schon seit längerem Methoden bekannt sind, um intakte und lebende, eingefrorene oder Paraffin-eingebettete und auch dissozierte Sphäroide zu analysieren (Kunz-Schughart et al. 1998), gibt es hinsichtlich eines Wirkstoff-/Therapie-Screenings zur Zeit keine automatisierten Analysemethoden. Erschwerend kommt hinzu, dass bislang keine definierten und standardisierten Endpunktmeßungen festgelegt werden konnten. Um die Effekte wachstumsfördernder bzw. -hemmender Faktoren und Wirkstoffe in MCTS zu bewerten gibt es drei Parameter, die wohl am ehesten routinemäßig untersucht werden können: das Sphäroid-Wachstum, welches mittels der Gompertz Gleichung (Marusic et al. 1994; Kunz-Schughart et al. 1996) oder anderer mathematischer Modelle (Tabatabai et al. 2005) beschrieben werden kann, die Sphäroidintegrität bzw. eine Wachstumsverzögerung nach Behandlung. Dazu müssen die Sphäroid-Durchmesser jedoch über einen längeren Zeitraum hinweg analysiert werden. In dieser Arbeit konnte die Bildaufnahme von Sphäroiden in einer 96-Well Mikrotiterplatte mit Hilfe eines Axiovert 200 M Inversmikroskops und der AxioVision 4.5 Software (Zeiss) vollständig automatisiert werden. Der generelle Zeitbedarf für die automatische Aufnahme aller 96 Sphäroide einer Platte beträgt nun 10 Minuten, gegenüber 30 Minuten pro Platte bei früherer manueller Bildaufnahme. In die AxioVision 4.5 Software implementierte bildverarbeitenden Algorithmen erlauben nun zudem eine (semi-)automatisierte Analyse von Sphäroiddurchmesser und -volumen. Zusammen ermöglichen diese Weiterentwicklungen daher eine automatisierte, schnelle und einfache Auswertung von Sphäroidvolumenzunahme/-abnahme.

Freyer et al. zeigte, dass auch die Durchflusszytometrie zur Analyse und zum Sortieren intakter Sphäroide genutzt werden kann (Freyer et al. 1987). Aufgrund der hohen technischen Anforderungen an die gängigen Durchflusszytometer bei der Verarbeitung von Partikeln dieser Größe wird diese Technik bis heute eher selten eingesetzt. Der seit Kurzem von Union Biometrica angebotene COPASBiosorter jedoch bietet sowohl die Möglichkeit der Messung von Lichtstreuung, von Fluoreszenzanalysen und des Sortierens von Partikeln bis zu einer Größe von ca. 1500 µm. Damit könnte ein Einsatz der Durchflusszytometrie zur Bestimmung von Sphäroidgröße, zur Sphäroidanalyse und zur Auswahl geeigneter Sphäroide eine neue Grundlage erhalten.

IV.2 Zytotoxizitäts-/Vitalitätsbestimmung in Sphäroid-Kulturen

IV.2.1 Grundlegende methodische Betrachtungen

Beobachtungen des Sphäroid-Wachstums (z.B. verzögertes Wachstum oder erneutes Anwachsen) ermöglichen keine Unterscheidung zwischen den Effekten eines Wirkstoffes auf die Lebensfähigkeit der Zellen und denen auf die Wachstumsrate bzw. Rekrutierung von ruhenden Zellen, die wieder in den Zellzyklus eintreten. Hierfür werden andere analytische Methoden benötigt. Zu den wohl interessantesten Parametern einer Wirkstoffanalyse für eine potentielle automatisierte Analyse gehören die Zellvitalität bzw. -viabilität, das Auswachsverhalten und die Migration von Sphäroidzellen. Viele Wissenschaftler haben versucht, standardmäßig angewandte Zellvitalitätsassays an Sphäroiden zu testen. Bislang wurden zum einen Membranefekte anhand der zellulären Aufnahme Membran-undurchdringlicher Farbstoffe (z.B. EtHD-1) oder die Freisetzung von Substanzen wie Laktatdehydrogenase (LDH) oder Glukose-6-Phosphat (G6PD) untersucht. Weiterhin konnte die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen oder intrazellulärer Esterasen oder der zelluläre Adenosintriphosphat (ATP)-Pegel bzw. das Verhältnis von ATP/Adenosindiphosphat (ADP) bestimmt werden. Alle diese kommerziell erhältlichen Testsysteme wurden erfolgreich an Monolayerkulturen unterschiedlicher Tumorzelllinien, einschließlich Kolonkarzinomzelllinien, eingesetzt. Unerwartet konnten die meisten getesteten Methoden nicht einfach für den Einsatz an 3-D Kulturen adaptiert werden (siehe Anhang 8).

Der Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes) und der ApoGlow™ Adenylat Nucleotide Ratio Assay (Cambrex, East Rutherford, NJ) wurden in Vorarbeiten auf Ihre Durchführbarkeit an Sphäroiden getestet. Sie wurden jedoch von einer weiteren Validierung ausgeschlossen, da eine Dissoziation von Sphäroiden bei diesen Assays vorausgesetzt wird. Die Dissoziation von MCTS kann einen artifiziellen Verlust von Zellen, vor allem nach therapeutischen Eingriffen, verursachen und sollte deshalb unbedingt vermieden werden. Zudem ist dieser experimentelle Aufbau sehr arbeits- und zeitaufwendig, da Protokolle und/oder Ar-

beitsabläufe für die Dissoziation jedes einzelnen Sphäroidtyps optimiert werden müssen (Kunz-Schughart et al. 1997). Einige Beobachtungen, die zum Ausschluss verschiedener Assays geführt haben, sind in Anhang 8 dargestellt.

Bei der Bestimmung des Zelltodes mittels Quantifizierung freigesetzter Moleküle aus Membran-defekten Zellen in den Überstand können Zellen anschließend möglicherweise weiter gehend kultiviert werden. Ein Well bzw. MCTS könnte so über einen längeren Zeitraum hinweg analysiert werden. Obwohl solche Assays wünschenswert wären, konnte keines der bislang untersuchten Testsysteme die Prozesse beim Zelltod in Sphäroiden widerspiegeln. So stellt die Entstehung einer sekundären Nekrose mit zunehmender Kulturzeit und Sphäroidgröße ein großes Problem bei dieser Vorgehensweise dar. Es kann zu einer Verstärkung des Hintergrundsignals kommen, was von den Abständen bei der Fütterung von Sphäroiden abhängig sein kann. Als Voraussetzung für eine verlässliche Quantifikation zytotoxischer Effekte mit diesen Methoden sollte das Hintergrundsignal entweder den tatsächlichen Anteil toter Zellen (einschließlich sekundär-nekrotischer Zellen im Sphäroid) wiedergeben, oder aber komplett vernachlässigbar sein. Die mittels dieser Testsysteme bestimmten Anteile toter Zellen wurden mit dem Anteil Membran-defekter, Propidiumiodid (PI)-gefärbter Zellen im Sphäroid verglichen. Dazu wurden Sphäroide dissoziiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe Anhang 8a). Der Anteil toter Zellen in HT29 Sphäroiden mit einem Durchmesser von 400 µm und 600 µm lag hier bei 6-10% bzw. 18-22%. Berechnet man den Anteil toter Zellen mit Hilfe des Fluoreszenz-basierenden Assays zur Bestimmung der G6PD-Aktivität (Vybrant® Cytotoxicity Assay, Molecular Probes), so stellt man fest, dass dieser ebenfalls mit zunehmender Sphäroidgröße steigt. Im direkten Vergleich zu den PI-Kontrollwerten ist der Wert allerdings stets zu niedrig, dies gilt auch dann wenn die Konzentration des Farbstoffes (Resazurin) verdoppelt wurde (siehe Anhang 8b).

Ein weiterer Membranintegritätsassay wurde zur Analyse der Freisetzung von LDH verwendet (CytoTox-One™ Homogeneous Membrane Integrity Assay, Promega). Obwohl in Vorarbeiten verschiedene Arbeitsprotokolle eingesetzt wurden, lieferte dieser jedoch kein reproduzierbares und konstantes Assaysignal. Gemessen wurde in Überständen intakter und dissoziierter Sphäroide, wobei mehrere Lösungen zur optimalen Zelllyse und einer damit verbundenen maximalen Signalintensität pro Well getestet wurden. Das Assaysignal bzw. der errechnete Anteil toter Zellen änderte sich in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit Resazurin. Durch Zugabe der Stopplösung, die laut Hersteller die fortschreitende Bildung des fluoreszierenden Endproduktes beenden soll, konnte dieser Effekt nicht unterdrückt werden. Die Quantifizierung des rot-fluoreszierenden Endproduktes Resorufin spiegelt demnach nicht zuverlässig und reproduzierbar die Freisetzung von LDH aus membran-defekten Zellen wider. Möglicherweise beeinflussen chemische, bislang nicht verstandene Nebenreaktionen während der erforderlichen Inkubation das Assaysignal stark (siehe Anhang 8c).

Als weiteres Testsystem zur Bestimmung der Membranintegrität von Sphäroiden wurde die Freisetzung von Adenylatkinase bestimmt (ToxiLight® BioAssay Kit, Cambrex), welche vermutlich auf Membrandefekte zurückzuführen ist. Schwankungen des Assaysignals um einen Faktor 20 bereits in Sphäroiden mit einem Durchmesser von 400 µm lassen den Schluss zu, dass diese Methode ebenfalls nicht für die Messung von zytotoxischen Effekten in Sphäroid-Kulturen geeignet ist.

Andere bereits untersuchte Testsysteme werden ausschließlich dafür verwendet, um die Zahl oder den Anteil lebender Zellen relativ zu einer definierten Kontrolle (z.B. unbehandelte Zellen) zu bestimmen. Zu diesen Vitalitätsnachweisen gehört neben dem in dieser Arbeit verwendeten APH Assay auch die Bestimmung metabolisch aktiver Zellen mittels auf Tetrazoliumsalz (MTS)-basierter Systeme (CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) oder die Quantifizierung intrazellulären ATPs (ATP-TCA Assay, DCS Innovative Diagnostic Systems). Sollte die metabolische Aktivität tatsächlich nur die Lebensfähigkeit von Zellen wiedergeben, sollte das Assaysignal unabhängig von Zelldichte und Verteilung im Zellzyklus sein. Jedoch zeigen bisher alle verwendeten Systeme eine verringerte Signalintensität in konfluent wachsenden Monolayer- und Sphäroidzellen im Vergleich mit exponentiell wachsenden Monolayerzellen. Somit spiegeln sie nicht nur die Lebensfähigkeit, sondern auch die Wachstumsphase der Zellen wider. Der Verlust der Signalstärke in Sphäroiden wäre tragbar, wenn das Signal pro Zelle unabhängig vom Sphäroidvolumenwachstum stets konstant bliebe. Diese Bedingung konnte jedoch ausschließlich für den APH Assay gezeigt werden. Beim Nachweis der NADH/NADPH-abhängigen Formazanproduktion oder der ATP-Konzentration in den Zellen ist das Fluoreszenzsignal pro Zelle in Sphäroiden mit einem Durchmesser von 600 µm im Gegensatz zu Sphäroiden mit einem Durchmesser von 400 µm stark verringert.

IV.2.2 Zytotoxizitäts-/Vitalitätsbestimmung mittels APH Assay

Nachdem in Vorarbeiten alle oben genannten Assays zur Bestimmung der Zytotoxizität/Vitalität in Sphäroiden getestet wurden, konzentrierte sich diese Arbeit auf den APH Assay als die viel versprechendste Methode, die einen Einsatz an nicht-dissoziierten Sphäroiden unter „High-Throughput“ Bedingungen ermöglichen könnte. Unter Verwendung eines standardisierten Protokolls für eine schnelle, routinemäßige Analyse einzelner Sphäroide zeigte der APH Assay, der häufig an Monolayerkulturen eingesetzt wird (Connolly et al. 1986; Martin et al. 1991; Martin et al. 1993; Yang et al. 1996; Si et al. 1999), tatsächlich überzeugende Resultate. Im Vergleich zum Einsatz an Monolayerzellen ist für die Verwendung mit Sphäroiden allerdings eine Modifikation des Assay-Standardprotokolls notwendig. Diese betrifft einen zusätzlichen Wasch- und Zentrifugationsschritt beim Arbeiten mit Sphäroid-Kulturen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass der APH Assay an einzelnen HT29 Sphäroiden im 96-Well Format einsetzbar ist, dass dazu eine Dissoziation der Sphäroide nicht notwendig ist, und dass das APH Signal in HT29 Sphäroiden bis zu 40000 Zellen/Sphäroid (~ 650 µm) linear und hoch sensitiv ist. Weiterhin konnte der APH Assay auch an den Kolonkarzinomzelllinien DLD-1, HCT-116, HCT-15, KM12L4A, KM20L2 und WiDr eingesetzt werden. Tabelle 20 (siehe Kapitel III.4.1.8) liefert einen Überblick über die Bereiche des linearen Zusammenhangs zwischen APH Signal und Zellzahl/Sphäroid bzw. Sphäroiddurchmesser für jede Zelllinie.

Von besonderem biologischem Interesse ist die Erhöhung des APH Signals in HT29 Sphäroiden mit einem Durchmesser > 650 µm (Abbildung 30), in HCT-116 Sphäroiden mit einem Durchmesser > 900 µm (Abbildung 31) und in WiDr Sphäroiden mit einem Durchmesser > 760 µm (Abbildung 36). Dieses Phänomen konnte bislang nicht geklärt werden. Eine Erklärung für den Anstieg der Enzymaktivität speziell in diesen Sphäroidtypen der Tumorentität Kolon könnte in pathophysiologischen Prozessen wie z.B. Hypoxie oder verstärkten Zell-Zell-Interaktionen liegen.

Die Beobachtung, dass sich die mit dem APH Assay bestimmte Lebensfähigkeit der Zellen in HT29 Sphäroiden nach einer Behandlung mit unterschiedlichen 5-Fluorouracil Konzentrationen von der Zellzahlanalyse mittels Casy Zellzähler unterscheidet (Abbildung 37), ist ein zusätzlicher Diskussionspunkt. Es wäre möglich, dass das APH Signal im Vergleich zur Zellzahlanalyse eine zu hohe Intensität anzeigt und somit weniger der Realität entspricht. Diese Interpretation wird dadurch gestützt, dass bei einer Verlängerung der Regressionsgeraden in Richtung der y-Achse ($n = 0$) das APH Signal als Funktion von Zellzahl/Sphäroid bei der Zellline HT29 für 0 Zellen nicht einer Absorption von 0% entspricht (Abbildung 30). Dieser scheinbar zu hohe Wert bei $n = 0$ konnte auch schon bei Monolayerzellen beobachtet werden, gibt jedoch weiterhin einige Rätsel auf (Connolly et al. 1986; Yang et al. 1996; Si et al. 1999). Da die Wirkstoffeffektivität jedoch sowohl bei der Zellzahl-, als auch bei der APH Signalanalyse immer relativ zu einer entsprechenden, unbehandelten Kontrolle bestimmt wurde, sollte dieser Effekt keinen Einfluss auf die Interpretation der Testergebnisse haben. Eine alternative Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse bei der Messung von Zellzahl und Enzymaktivität könnte der Verlust einiger Zellen bei der Sphäroiddissoziation sein. So könnten 5-FU-behandelte Sphäroidzellen sensitiver gegenüber Trypsin/EDTA oder anderen Dissoziationsenzymen/-substanzen sein, was in einer artifiziellen Schädigung der Zellen und somit verringerten Zellzahlen nach der Sphäroiddissoziation resultieren könnte. Wäre dies der Fall könnte der APH Assay sogar zuverlässiger die zelluläre Integrität in MCTS wider spiegeln. In jedem Fall konnte gezeigt werden, dass der APH Assay an Sphäroiden einfach und schnell durchführbar ist und weiterhin das Potential für einen Einsatz im High-Throughput-Format besitzt.

IV.2.3 Detektion anti-tumoraler Effekte mittels APH Assay

In dieser Arbeit wurde versucht ein Kolonkarzinom-spezifisches, Sphäroid-basiertes Screening mit Hilfe des APH Assays zu evaluieren und zu etablieren. Dazu wurden HT29 und HCT-116 Sphäroide mit Wirkstoffen, die gemeinhin bei einer klinisch-adjuvanten Chemotherapie zum Einsatz kommen, behandelt. Anschließend wurde die Wirksamkeit dieser Wirkstoffe - Doxorubicin, Paclitaxel, Carboplatin, Cisplatin, 5-FU, Mitoxantron, CCNU/Lomustin, Irinotecan und Epodoxorubicin - in Monolayer- und Sphäroid-Kulturen verglichen. Wie schon früher mit Hilfe der Analyse von Wachstumsverzögerungen oder anderer zeitaufwendiger bzw. komplexer Analysemethoden gezeigt, erwartet man in Sphäroidzellen im Vergleich zu Monolayerkulturen eine verringerte Sensitivität gegenüber diesen Substanzen. Dieses Phänomen wurde an MCF-7 Brustkrebszellen (Nicholson et al. 1997; Zhang et al. 2005), DLD-1 Kolonkarzinomzellen (Nicholson et al. 1997; Mellor et al. 2005) und HT29 Sphäroide bzw. Multi-layer (Sutton et al. 1982; Pizao et al. 1992)) nachgewiesen. In dieser Arbeit sollten die Effekte der Wirkstoffe nicht nur anhand der Sphäroidintegrität und -größe (Barone et al. 1981), sondern auch im APH Signal unter Bestimmung der APH-abhängigen IC_{50} -Werte untersucht werden. In dem hier verwendeten experimentellen Ablauf zeigten die Monolayer-Kontrollversuche mit Doxorubicin (Serpe et al. 2004), Paclitaxel (Serpe et al. 2004; Zhang et al. 2006), 5-FU (Harstrick et al. 1998; Ciccolini et al. 2000; Lowthers et al. 2003; Poindessous et al. 2003), Cyclophosphamid (Leon et al. 2006), Mitoxantron (Parker et al. 2003), Irinotecan (Guichard et al. 2001; Hofmann et al. 2005) und Epi(doxo)rubicin (Bergstrom et al. 1991; Ozkan et al. 2004) vergleichbare Ergebnisse mit den in der Literatur beschriebenen Dosis-Wirkungskurven und IC_{50} Werten. Tabelle 21 gibt weiterhin einen Auflistung der IC_{50} Werte, die innerhalb des NCI-DTP Tumor (60) Cell Line Screens (<http://dtp.nci.nih.gov/branches/btb/ivclsp.html>) für Monolayer-Kulturen der beiden Zelllinien HT29 und HCT-116 ermittelt wurden.

Tabelle 21. Übersicht der innerhalb des NCI-DTP Tumor (60) Cell Line Screens ermittelten IC_{50} Werte für HT29 und HCT-116 Monolayer-Kulturen.

Wirkstoff	HT29	HCT-116
5-Fluorouracil	25,0 μ M	6,3 μ M
Cyclophosphamid	251,2 μ M	251,2 μ M
Carboplatin	200, μ M	158,5 μ M
Cisplatin	7,9 μ M	10,0 μ M
CCNU/Lomustine	50,1 μ M	39,8 μ M

Paclitaxel	0,005 µM	0,003 µM
Mitoxantron	0,126 µM	0,040 µM
Doxorubicin	0,200 µM	0,063 µM
Epidoxorubicin	0,316 µM	0,063 µM
Irinotecan	12,6 µM	6,3 µM

Abweichungen der in dieser Arbeit ermittelten IC_{50} Werte zu den Literaturdaten beruhen wahrscheinlich auf unterschiedlichen experimentellen Ansätzen. So scheinen sich unterschiedliche Behandlungszeiten, Kultivierungsmethoden (z.B. Medien) und Analysemethoden stark auf die Bestimmung der IC_{50} Werte auszuwirken (Serpe et al. 2004; Yu et al. 2006; Kitada et al. 2007; Serova et al. 2007). In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal die Wirkstoffeffekte dieser zehn Substanzen unter gleichen Bedingungen und Voraussetzungen an Monolayern und Sphäroiden von zwei verschiedenen Zelllinien durchgeführt. So ist es zum einen möglich, die Effektivität der Wirkstoffe auf HT29 und HCT-116 Monolayer direkt miteinander zu vergleichen. Zum anderen können die unterschiedlichen Effekte auf Monolayer und Sphäroide verglichen werden (Tabelle 22). Mit Ausnahme der Wirkstoffe Carboplatin und Cyclophosphamid zeigte sich bei HT29 Zellen durch einen Vergleich der IC_{50} Werte, dass Sphäroide weniger sensitiv gegenüber Wirkstoffen sind als Monolayerkulturen. Jedoch konnte im festgelegten Konzentrationsbereich bei einer Behandlung mit Carboplatin, Cyclophosphamid oder CCNU/Lomustin keine IC_{50} Werte für Monolayer- und Sphäroid-Kulturen, bei einer Behandlung mit 5-FU oder Irinotecan keine IC_{50} Werte für Sphäroid-Kulturen bestimmt werden. Auch bei der Zelllinie HCT-116 konnte eine verringerte Wirksamkeit in Sphäroiden gegenüber Monolayerkulturen beobachtet werden, wiederum mit Ausnahme der Substanzen Carboplatin und Cyclophosphamid. Einzig bei einer Behandlung mit Cyclophosphamid scheinen MCTS im gesamten Versuchsaufbau sensitiver gegenüber einem Wirkstoff als Monolayerzellen zu sein, für die im vorgegebenen Konzentrationsbereich kein IC_{50} bestimmt werden konnte. Keine IC_{50} Werte sowohl für Monolayer- als auch für Sphäroid-Kulturen konnten bei einer Behandlung mit Carboplatin oder CCNU/Lomustine bestimmt werden.

Abweichungen der IC_{50} Werte zwischen Monolayer- und Sphäroid-Kulturen variierten stark. Nur geringe Unterschiede lassen sich bei HT29 Zellen nach einer Behandlung mit Cisplatin (Faktor 1,5), Paclitaxel (Faktor 4) oder Epidoxorubicin (Faktor 5), sowie bei HCT-116 Zellen nach einer Behandlung mit Cisplatin (Faktor 1), Irinotecan (Faktor 1,3), 5-FU (Faktor 3) oder Mitoxantron (Faktor 3) beobachten. Die Behandlung von HT29 Zellen mit Doxorubicin (Faktor 50) oder Mitoxantron (Faktor 550), und die Behandlung von HCT-116 Zellen mit Epidoxorubicin (Faktor 10), Paclitaxel (Faktor 13), oder Doxorubicin (Faktor 19) dagegen zeigt größere-

re Unterschiede zwischen den IC₅₀ Werten von Monolayern und MCTS auf. Weiterhin wurde beobachtet, dass sich die Wirkstoffeffektivität einer Substanz in den beiden Zelllinien unterscheiden kann. Im Allgemeinen scheinen die Mikrosatelliten-instabilen (MSI) HCT-116 Zellen im Vergleich zu den aneuploiden, Chromosomen-instabilen (CIN) HT29 Zellen im Sphäroidmodell sensitiver gegenüber den zehn getesteten Wirkstoffen zu sein. Dieser Effekt kann bei einer Kultivierung im Monolayer nicht beobachtet werden.

Tabelle 22. Übersicht der IC₅₀ Werte) in HT29 und HCT-116 Monolayern und Sphäroiden. Zur Verdeutlichung der Unterschiede der Wirkstoffwirksamkeit in 2-D und 3-D Kulturen und in den beiden Kolonkarzinomzelllinien wurden die IC₅₀ Werte für jedes individuelle Experiment mittels Prism 4 Software (GraphPad Software Inc.) berechnet. Angegeben sind Mittelwerte ± SD.

Wirkstoff	HT29		HCT-116	
	Monolayer	Sphäroid	Monolayer	Sphäroid
5-Fluorouracil	5,6 ±3,3 µM	nicht erreicht	7,4 ±2,9 µM	23,6 ±19,7 µM
Cyclophosphamid	nicht erreicht	nicht erreicht	nicht erreicht	≥ 200 µM
Carboplatin	nicht erreicht	nicht erreicht	nicht erreicht	nicht erreicht
Cisplatin	100,8 ±37,1 µM	149,8 ±65,7 µM	57,3 ±16,1 µM	61,8 ±41,6 µM
CCNU/Lomustin	nicht erreicht	nicht erreicht	nicht erreicht	nicht erreicht
Paclitaxel	2,0 ±0,009 nM	7,0 ±6,0 nM	4,0 ±1,0 nM	50,0 ± 30,0 nM
Mitoxantron	0,003 ±0,003 µM	16,4 ±8,3 µM	0,3 ±0,3 µM	1,0 ±1,1 µM
Doxorubicin	≤ 0,1 µM	3,7 ±3,0 µM	0,6 ±0,1 µM	11,6 ±12,1 µM
Epidoxorubicin	0,2 ±0,1 µM	1,0 ±0,7 µM	0,2 ±0,2 µM	2,1 ± 1,8 µM
Irinotecan	10,2 ±2,3 µM	nicht erreicht	20,5 ±3,9 µM	27,0 ±3,7 µM
WMC-79	0,03 ±0,0 nM	1,7 ±1,6 µM	2,0 ±2,0 nM	5,5 ±7,0 µM
C-1311	1,7 ±1,2 µM	56,7 ±30,2 µM	2,7 ±1,3 µM	31,7 ±19,6 µM

Der APH Assay wurde weiterhin zur Untersuchung der Wirksamkeit zweier neuer Wirkstoffkandidaten, C-1311 und WMC-79, in MCTS gegenüber Monolayerzellen verwendet. C-1311 (Symadex) gehört zur Gruppe der C-13xx Imidazoacridinone und wurde erst kürzlich in eine klinische Studie der Phase II an Patienten mit metastasierenden Brust- und Kolontumoren aufgenommen (http://www.xanthus.com/products_symadex.htm). In verschiedenen Tumormodellen, einschließlich HT29 Kolonkarzinomzellen, zeigt diese Stoffgruppe sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine überzeugende Aktivität gegenüber Tumoren (Kusnierszyk et al. 1994; Burger et al. 1996; Hyzy et al. 2005). Die *in vitro* Studien wurden hauptsächlich an Mono-

layerkulturen durchgeführt und weisen auf verschiedene Wirkmechanismen des C-1311 hin. So können Störungen im Zellzyklus und ein Zellarrest in der G₂M Phase auf eine Einlagerung des Wirkstoffes in die DNA und eine Inhibition der DNA Topoisomerasse II zurückgeführt werden (Augustin et al. 1996; Skladanowski et al. 1996; Burger et al. 1999; Zaffaroni et al. 2001; Mazerska et al. 2001; Dziegielewski et al. 2002). Vor kurzem konnte unter anderem auch die Wirkung von C-1311 als selektiver Inhibitor der FLT3 Rezeptortyrosinkinase identifiziert werden (Chau et al. 2006). Die in dieser Arbeit berechneten IC₅₀ Werte für HT29 und HCT-116 Monolayerkulturen nach einer 72-stündigen Behandlung betragen 1,7 µM bzw. 2,7 µM und stimmen mit den Literaturdaten überein. Anders als bei früheren Studien, bei denen ähnliche Dosis-Wirkungskurven für Sphäroid- und Monolayerkulturen nachgewiesen wurden, zeigen die hier durchgeführten Studien eine deutlich reduzierte Wirksamkeit von C-1311 auf HT29 und HCT-116 Sphäroide (IC₅₀ = 56,7 µM bzw. 31,7 µM). Diese Diskrepanz kann dadurch erklärt werden, dass in vorherigen Untersuchungen andere Zelltypen eingesetzt wurden. So lag der Fokus in der Arbeit von Skladanowski und Kollegen (Skladanowski et al. 1996) auf Fibrosarkomzellen aus der Lunge des chinesischen Hamsters (DC-3F) und nicht auf humanen Karzinomzellen. Allerdings liegt der Schluss nahe, dass das in dieser Arbeit verwendete Kolonkarzinom-Sphäroid-Modell aus humanen Zellen besser dazu geeignet ist, die Wirksamkeit neuer Anti-Tumor-Wirkstoffkandidaten auf epitheliale Tumore beim Menschen zu untersuchen.

Der zweite neue Wirkstoffkandidat, WMC-79, dessen Wirksamkeit mittels APH Assay untersucht werden sollte, gehört zur Gruppe der Bisimidazoacridinone (BIAs). Bei einigen Substanzen dieser Wirkstoffklasse konnte neben einer selektiven anti-tumoralen Wirkung auch eine anti-virale Wirkung beobachtet werden (Cholody et al. 1992; Hernandez et al. 1995; Turpin et al. 1998). Die Wirkung von WMC-79 beruht, wie für alle BIAs, auf der Bindung des Wirkstoffes an die DNA (Tarasov et al. 2003). Dabei kommt es zur Einlagerung des einen aromatischen Ringes in die DNA, während der zweite Ring zusammen mit dem Linker in der kleinen Furche der DNA-Helix liegt. Weiterhin konnten die Arbeiten von Cholody und Kollegen zeigen, dass die zytostatische Wirkung der BIAs auf einen Arrest des Zellwachstums an den Kontrollpunkten der G₁ Phase und der G₂M Phase zurückgeführt werden kann (Cholody et al. 2001). *In vitro* Studien mit WMC-79 wurden bereits an HT29 und HCT-116 Monolayerkulturen durchgeführt (Cholody et al. 2005; Kosakowska-Cholody et al. 2005). Unter Verwendung des MTT Assays und des LIVE/DEAD Zytotoxizitätsassays wurde hier beobachtet, dass WMC-79 eine verstärkte toxische Wirkung auf Zellen hat, die das Tumorsuppressorgen p53 exprimieren (z.B. HCT-116 p53^{+/+}). Das Protein p53 ist ein streng regulierter Transkriptionsfaktor, der als Reaktion auf eine Schädigung der DNA vermehrt gebildet wird. Ein p53-gesteuerter Arrest des Zellzyklus hindert Zellen mit DNA Schäden an der Proliferation, eine p53-kontrollierte Apoptose tötet sogar selektiv Zellen mit schweren DNA-Schäden ab.

WMC-79 zeigt aber auch in Zelllinien, die kein oder ein mutiertes *p53* in sich tragen (z.B. HT29 *p53* ^{−/−}) in höheren Konzentrationen einen anti-tumoralen Effekt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weichen von diesen früheren Beobachtungen ab. So betragen die mittels des APH Assays ermittelten IC_{50} Werte für HT29 und HCT-116 Monolayerkulturen nach einer 72-stündigen Inkubation 0,03 nM bzw. 2,0 nM. Hier scheinen also HT29 Zellen, die ein mutiertes *p53* besitzen, sensitiver gegenüber WMC-79 zu sein als *p53*-Wildtyp tragende HCT-116 Zellen. Dieses Phänomen kann auch in Sphäroid-Kulturen beobachtet werden, wobei die Ergebnisse des APH Assays eine extrem reduzierte Wirksamkeit von WMC-79 auf HT29 und HCT-116 Sphäroide (IC_{50} = 1,7 μ M bzw. 5,5 μ M) im Vergleich zu Monolayerkulturen zeigen. Möglicherweise kann die starke Reduktion bei HT29 Sphäroiden (um einen Faktor 50000) und HCT-116 Sphäroiden (um einen Faktor 3000) auf eine beschränkte Diffusion bzw. Penetration des Wirkstoffes in 3-D Zellgewebe zurückgeführt werden. Die mittels APH Assay gemessene erhöhte Sensitivität von HT29 Zellen gegenüber WMC-79 im Vergleich zu HCT-116 Zellen konnte bislang nicht geklärt werden, weitere Arbeiten zur Klärung dieses Phänomens stehen aus.

Die unterschiedlichen Effekte von Wirkstoffen auf Sphäroide und Monolayer, die mit dem APH Assay aufgezeigt wurden, wurden im Rahmen dieser Arbeit auch über Genexpressionsanalysen bestätigt. Nach Behandlung mit 5-FU und WMC-79 zeigten Monolayer- und Sphäroid-Kulturen ein stark unterschiedliches Expressionsmuster, wobei alle behandelten Sphäroide, unabhängig von Wirkstoff und Sphäroiddurchmesser eine sehr ähnliche Genexpression zeigten.

Es ist bereits bekannt, dass der kombinatorische Einsatz von klassischen Wirkstoffen wie 5-FU und Irinotecan eine verstärkte Wirksamkeit, verlängerte Tumorprogressionszeit und ein erhöhtes Überleben der Patienten hervorrufen kann (Douillard et al. 2000). Mit Hilfe des APH Assays könnten erfolgreiche Kombinationstherapien in Sphäroiden wesentlich leichter aufgezeichnet, und die gewonnenen Daten mit denen aus Monolayerkulturen verglichen werden (Mans et al. 1999; Hofmann et al. 2005; Grivicich et al. 2005a; Grivicich et al. 2005b). Ein besonderes Potential der Sphäroid/APH Assay Plattform liegt also im möglichen Einsatz bei der Testung einzelner und kombinierter Therapiestrategien mit neuen Ziel- und/oder Signalweg-spezifischen Behandlungsmodalitäten.

IV.3 Möglichkeiten für einen Einsatz von MCTS im High-Throughput-Screening

Wie bereits erwähnt, könnte der Einsatz des MCTS Modells im industriellen High-Throughput-Screening einen bedeutenden Beitrag zur besseren Auswahl möglicher Wirkstoffkandidaten und deren Anwendung leisten. Bislang scheiterte dies jedoch an den komplexen und wenig standardisierten Kultur- und Analysetechnologien von Sphäroiden. Die einzige systematische Studie von unterschiedlichen Methoden zur Detektion zytotoxischer Effekte in Sphäroiden gilt heutzutage als veraltet, da darin nur kleine Sphäroide ohne Nekrose untersucht wurden (Kosaka et al. 1996a; Kosaka et al. 1996b). Wirkstoffeffekte auf hypoxische und Zellzyklus-arretierte Tumorzellen innerhalb eines Sphäroids wurden somit nicht berücksichtigt.

Bislang galt die Kultivierung von Sphäroiden im „Liquid-Overlay“-Verfahren als die wohl viel versprechendste Methode zur Adaption der MCTS-Technologie für einen Einsatz im HTS (Kunz-Schughart et al. 2004). So konnte mit dieser Methode eine Technik auf Sphäroide übertragen werden, die ursprünglich für eine Applikation an Monolayerkulturen entwickelt wurde. Mit Hilfe des APH Assays ist es nun möglich, Wirkstoffeffekte durch Bestimmung der Zytotoxizität/Vitalität in Sphäroiden zu erkennen. Weiterhin bietet die automatisierte Bildaufnahme mittels eines AxioVert 200M Mikroskops und die (semi)automatisierte Bildanalyse mittels AxioVision 4.5 Software nun eine schnelle Methode, um Wirkstoffe auf ihre wachstumsmodulierenden Effekte in Sphäroiden zu untersuchen. Die Standardisierung und Automatisierung der Sphäroidkultivierung im Liquid-Overlay als Voraussetzung für einen Einsatz im HTS konnte durch die Verwendung eines automatischen Pipettiersystems vorangetrieben werden. Zudem könnte in Zukunft die zeit- und arbeitsintensive Beschichtung von Mikrotiterplatten mit Agarose möglicherweise vermieden werden, da mit der Produktreihe HydroCell der Fa. Nunc™ höchstwahrscheinlich ein kommerziell erhältliches Plattensystem zur Generierung und Kultivierung von Sphäroiden im 96-Well Format gefunden wurde. Der Nachteil dieser potentiellen HTS Analysemethoden an Sphäroiden ist, dass der Effekt von Wirkstoffen immer als Gesamtreaktion aller im Sphäroid vorhandenen Zellen wiedergegeben wird. Ein Testsystem nach diesen Vorgaben weist zwar alle Vorteile eines 3-D *in vitro* Modells auf, die Information über den Effekt von Wirkstoffen auf einzelne Zellen an unterschiedlichen Orten im Sphäroid geht so jedoch verloren.

Eine Testmethode, die die morphologischen und physiologischen Verhältnisse im Sphäroid besser berücksichtigt, könnte die Konfokalmikroskopie sein. Der Einsatz von Fluoreszenzmarkierten Zellen bei der Generierung von Sphäroid könnte die Eindringtiefe bei der Konfokalmikroskopie in Sphäroide weiter erhöhen und somit in Zukunft eine automatisierte Analyse der Penetration von Wirkstoffen in einzelne Sphäroide ermöglichen. Für eine optimale Wirkung müssten Substanzen in einem MCTS Kultursystem in Tumor-ähnliches Gewebe

eindringen können. Das Potential von 3-D Modelsystemen zur Untersuchung von Effekten bei der Wirkstoffpenetration wurde bereits an MCTS und in Multilayern untersucht (Durand 1990; Wenning et al. 1999; Desoize et al. 2000; Padron et al. 2000; Hicks et al. 2003; Martin et al. 2003).

Entsprechend zu zellulären Assays gibt es Testsysteme, die eine einfache Untersuchung von Wirkstoffen mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften in die einzelnen Tumorsphäroide in einem Multiwellformat ermöglichen. Durch Beobachtung der Wirkstoffaufnahme in die einzelnen Sphäroide als Funktion der Zeit können somit kinetische Berechnungen und eventuell sogar geltende Diffusionskoeffizienten erstellt werden (Freyer et al. 1983; Casciari et al. 1988; Groebe et al. 1994). Um Wirkstoffeffekte auf die Viabilität von Zellen im Inneren eines Sphäroids zu erfassen, könnte man einfache Färbemethoden zur Bestimmung des Ausmaßes der Nekrose in einzelnen Sphäroiden entwickeln. So gibt es bereits andere Färbemethoden zur Detektion von Apoptose, Proliferation und diversen metabolischen Markern, die für ein Bild-gestütztes Screening an MCTS verwendet werden könnten. Die Weiterentwicklung solcher Techniken, die dann im HTS Format eingesetzt werden könnten und die Reaktion spezifischer Subpopulationen in Sphäroiden zeigen, würde den Stellenwert von Sphäroiden als Hilfsmittel im Wirkstoff-Screening deutlich steigern.

Ein weiteres Forschungsgebiet, das in naher Zukunft ein Sphäroid-basiertes HTS stützen könnte, ist die allgemeine Miniaturisierung der Zellkultivierung. Dazu zählen unter anderem auch so genannte „microfluidic devices“. In diesem System können mehrere einzelnen Sphäroide in abgetrennten Kulturkammern kultiviert werden, die im Durchflussverfahren ständig mit neuen Nährstoffen versorgt werden. In Kombination mit einem Computer-gesteuerten Aufnahmeverfahren könnte man so das Wachstum von Sphäroiden, die Penetration verschiedener Wirkstoffe, oder aber auch die Kinetik einer möglichen Reaktion von Sphäroiden auf neue Wirkstoffe bestimmen (Thielecke et al. 2001a; Thielecke et al. 2001b).

Der Einsatz von Sphäroiden im HTS wird unter anderem dadurch limitiert, dass das Wachstum von Zellaggregaten im Vergleich zu Monolayerkulturen relativ viel Zeit in Anspruch nimmt. Dies tritt besonders dann zu Tage, wenn man Sphäroide verwenden will, die einen Proliferationgradienten und einen zentralen nekrotischen Kern ausbilden, und dazu über einen kritischen Durchmesser hinaus wachsen müssen. Bis aus einem einfachen Zellaggregat, bestehend aus nur wenigen Zellen, ein typisches Tumorsphäroid mit gradueller Verteilung von Proliferation und Zellviabilität entsteht, können je nach Zelllinie zwei bis vier Wochen vergehen. Diesen Prozess könnte man beschleunigen, indem man die Zellzahlen bei der Aussaat zur Generierung einzelner Sphäroide erhöht, und so eine Zellaggregation forciert. Bis zur Entstehung eines pathophysiologischen Gradienten werden jedoch immer einige Tage vergehen. Für viele Anwendungen im HTS würde dies bedeuten, dass sich lediglich die Zeit, die zur Vorbereitung eines Assays benötigt wird, verlängert. Sind MCTS erst einmal

etabliert, so kann das eigentliche Screening genauso schnell wie mit Monolayerkulturen durchgeführt werden. Die vielen Vorteile eines potentiellen Einsatzes von Sphäroiden im HTS wiegen dabei die Nachteile, die durch einen höheren Zeitaufwand entstehen, bei Weitem auf.

Vorwegnehmend seien an dieser Stelle auch Sphäroid-Co-Kulturen aus „normalen“ und aus Tumorzellen für ein mögliches erweitertes Wirkstoffscreening erwähnt (Details siehe Kapitel IV.5). Hierzu müssten jedoch Techniken entwickelt werden, mit denen es möglich, ist große Mengen an Sphäroiden derselben Größe und mit der gleichen zellulären Zusammensetzung zu erhalten. So könnte der Einsatz von Zelllinien, die fluoreszierende Marker (z.B. GFP) exprimieren, die Analyse von Sphäroid-Co-Kulturen verbessern. Mittels eines modifizierten Durchflusszytometers könnten Sphäroid-Co-Kulturen dann anhand von Größe und Intensität des Fluoreszenzsignals ausgesucht werden (Freyer et al. 1987). Weitere Entwicklungen auf diesem Gebiet sollten es ermöglichen, eine Auswahl standardmäßig verwendeter, sehr gut charakterisierter Sphäroid-Co-Kulturen aufzustellen, welche die Zell-Zell-Interaktionen zwischen „normalen“ und Tumorzellen in ein HTS einbinden könnten. Zusätzlich/Alternativ dazu könnte die konfokale Fluoreszenzmikroskopie zur Analyse von solchen Co-Kulturen verwendet werden (Chatterjee et al. 2000; Yoshida et al. 2002; Yoshida et al. 2003).

Obwohl zukünftig noch weitere technologische Entwicklungen und eine erweiterte Standardisierung für ein High-Throughput-Wirkstoff-Screening auf Basis von MCTS notwendig sind, sprechen viele Argumente eindeutig für einen Einsatz von Sphäroiden. Die stete Weiterentwicklung der Sphäroidtechnologie in den letzten Jahren hat jedoch das Potential von MCTS für einen Einsatz im Wirkstoff-Screening bereits merklich erhöht. Zu diesen Neuerungen zählen unter anderem die in dieser Arbeit entwickelten Methoden zur Standardisierung und Automatisierung der Sphäroidkultivierung und -analyse. In naher Zukunft sollte es möglich sein, weitere Techniken für einen schnellen und einfachen Nachweis einer zytotoxischen Wirkung oder eines Wachstumsarrests von Zellen in Sphäroiden im HTS Format zu entwickeln.

IV.4 MCTS und experimentelle Therapeutik

Wachstum und Histomorphologie bei Sphäroiden können sich abhängig vom Tumorzelltyp unterscheiden. Wie bereits erwähnt sind aufgrund der sphärischen Geometrie trotzdem diverse physiologische Eigenschaften bei allen MCTS gleich. Sphäroide sind daher bestens geeignet, um therapeutische Fragestellungen, die sich mit metabolischen und proliferativen Gradienten befassen, zu untersuchen. Dazu zählen unter anderem die Effekte in chronisch hypoxischen Tumorzellen, aber auch 3-D Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen bei der Radio- und Chemotherapie. In den ersten zwanzig Jahren konzentrierte sich die Arbeit mit Sphäroiden in der experimentellen Therapeutik hauptsächlich auf verschiedene Studien im

Bereich der Radiotherapie. Diese Arbeiten wurden in mehreren zwar älteren, aber immer noch sehr aufschlussreichen Artikeln und Büchern zusammengefasst und diskutiert, die zudem das Phänomen der Hypoxie und der Zell-Zell-Kontakt-vermittelten Radioresistenz behandeln (Carlsson et al. 1989; Freyer 1992; Buchsbaum et al. 1993; Olive et al. 1994; Mueller-Klieser 1997; Santini et al. 1999). Obwohl verschiedene Arbeitsgruppen auf diesem Gebiet weiterhin aktiv forschten, ging die Zahl der wissenschaftlichen Artikel, die sich mit diesem Thema beschäftigten, in den 1990ern stetig zurück. Gleichzeitig wurde die Sphäroid-Technologie verstärkt in anderen Gebieten der experimentellen Therapeutik, wie z.B. der Chemotherapie, der Zell- und Antikörper-basierenden Immuntherapie, der Hyperthermie, der Gentherapie oder zur Untersuchung fotodynamischer Behandlungen eingesetzt (Mueller-Klieser 1987; Olive et al. 1994; Mueller-Klieser 1997; Desoize et al. 1998; Mueller-Klieser 2000; Desoize et al. 2000). Olive und Mitarbeiter befassten sich dabei vor allem mit dem Aspekt der Wirkstoffresistenz, indem sie regelmäßig den Comet Assay zum Nachweis von Zellen mit DNA-Schädigung verwendeten (Durand et al. 1992; Olive et al. 1994).

Bis heute wurde eine Vielzahl klassischer Therapeutika an Sphäroid-Kulturen getestet. Aufgrund der verschiedenen verwendeten Sphäroid-Typen, der unterschiedlichen Kulturbedingungen und der wenig standardisierten analytischen Methoden und Endpunkte ist ein Vergleich der individuellen, unabhängigen Studien allerdings nur schwer möglich. Als analytische Endpunkte bei der Testung neuer Therapieansätze an Sphäroiden kann neben der bereits erwähnten Sphäroidenintegrität und dem erneuten Wachstum von Sphäroiden auch die Zellvitalität in Sphäroiden nach einer Behandlung dienen. Großes Interesse gilt hier vor allem dem Volumenwachstum von Sphäroiden als Funktion der Zeit in Kultur. Durch Bestimmung definierter Endpunkte des Volumenwachstums entlang der Wachstumskurve wäre es möglich Therapiebedingte Wachstumsverzögerungen von Sphäroiden nach Behandlung zu ermitteln.

Vor Kurzem untersuchte Mellor et al. die Effekte von 5-Fluorouracil (5-FU), Vinblastine, Doxorubicin und Cisplatin in proliferierenden und ruhenden Sphäroiden aus DLD-1 Kolon-Adenokarzinom-Zellen (Mellor et al. 2005). Die Wirksamkeit der verschiedenen Reagenzien wurde durch Analyse des Sphäroidvolumenwachstums und des Überlebens von Zellen, hier mittels Methylenblau Färbung, bestimmt. Dabei konnten große Unterschiede in der Reaktion der Zellen auf die verschiedenen Wirkstoffe festgestellt werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass ein und derselbe Wirkstoff unterschiedlich stark auf Zellen verschiedener Proliferationsstadien wirkt.

Weiterhin untersuchte Orlandi et al. die Effekte von Idarubicin und Idarubicinol in MCF-7 Brusttumorzellen, sowohl in Monolayer- als auch in Sphäroid-Kultur. Hier zeigte sich in beiden Kultursystemen eine signifikante Wirkstoffaktivität, wobei die Werte für die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50} -Werte) nach 24 h Behandlung bei Sphäroiden leicht erhöht

waren (Orlandi et al. 2005). Es scheint, dass die Wirkstoffresistenz in dieser Studie stark von der Behandlungszeit abhängig ist. Es darf deshalb darüber spekulieren, ob diese Ergebnis nicht auf einer Wirkstoffresistenz auf zellulärer Ebene, sondern auf einer ungleichmäßigen Wirkstoffverteilung im Sphäroid beruht. Im Gegensatz dazu konnte Muir et al. in Sphäroiden der humanen Brustkarzinom-Zelllinie MDA-MB 231 im Vergleich mit Monolayern sogar eine verringerte Resistenz gegenüber Doxorubicin nachweisen (Muir et al. 2006).

Von großem Interesse ist natürlich auch die Kombinationstherapie verschiedener Wirkstoffe und/oder Radiosensitizern mit Einzel- und fraktionierter Bestrahlung. 2004 konnte die Arbeitsgruppe um Lambert die supra-additiven Effekte von Cisplatin, Gemcitabin oder 5-FU mit einer Bestrahlungstherapie in HepG2 Sphäroiden beschreiben (Lambert et al. 2004). Dieselben Kombinationen wurden auch in Gliom- und Glioblastom-Zelllinien (GaMg, U87, Gli-6) und/oder sphäroidähnlichen Zellverbänden aus Primärgeweben untersucht und mit den Daten aus Monolayer-Kulturen verglichen (Genc et al. 2004; Fehlauer et al. 2005; Fehlauer et al. 2006). Nach Behandlung mit dem selektiven mTOR (mammalian target of rapamycin) Inhibitor Rapamycin und dem zyklin-abhängigen Kinaseinhibitor Roscovitin konnte im U87-Gliom-Sphäroid-Modell die erhöhte Wirkung einer fraktionierten Bestrahlung nachgewiesen werden. Interessanterweise trat der additive Effekt des Rapamycins in zweidimensionalen Kulturen nicht zu Tage (Eshleman et al. 2002). Radiosensitivierung und additive/supra-additive Effekte wurde auch für das Xanthin-Derivat Pentoxyfyllin in T98G-Gliom-Sphäroiden nachgewiesen. Hierbei wurde der größte Effekt bei einer intermittierenden Strahlendosis beschrieben (Eley et al. 2002). Der Hsp-90 (heat shock protein)-Inhibitor 17-N-Allyl-amino-17-Demethoxy-Geldanamicin (17-AAG) wurde in LNCaP und CWR22Rv1 Prostata-Karzinom-Sphäroiden untersucht und zeigte ebenfalls Potential zur Radiosensitivierung (Enmon et al. 2003). Ein weiteres Beispiel ist die Arbeit von Khaitan et al. zum Vergleich von Radiomodifikationen durch 2-Desoxyglukose (2-DG) in Monolayer- und Sphäroid-Kulturen der humanen Gliom-Zelllinie BMG-1 (Khaitan et al. 2006). 2-DG, das auch den Ausgangsstoff für den am häufigsten zur Positronen-Emissionstomographie (PET) verwendeten Radiotracer [18 F]FDG bildet, verstärkt hier den Strahlungsbedingten Zelltod in Sphäroiden erheblich mehr als in Monolayer-Zellen.

IV.5 Von homologen zu heterologen MCTS

Wie schon erwähnt, haben die neuesten Entwicklungen den Weg für die Verwendung von MCTS als ein Modell für Tumorpathophysiologie in der Anti-Tumor-Wirkstoff-Testung geebnet. Allerdings wurde auch klar, dass Sphäroid-Monokulturen das Tumormilieu nicht in allen Aspekten widerspiegeln. Darum hat man versucht, verschiedenste komplexe, auf Sphäroiden basierende Kulturen, die die Heterogenität in Tumoren nachahmen sollen, zu entwickeln (Abbildung 89). Diese Systeme bieten beachtliche Möglichkeiten, um heterologe Zellinteraktionen in Tumoren *in vitro* unter definierten Bedingungen zu untersuchen. Obwohl sie noch nicht für ein Wirkstoff-Screening genutzt werden können, betrachtet man sie dennoch als Meilenstein, um spezielle Problemstellungen in Bezug auf Wirkstoff und Behandlung zu klären. Eine besondere Herausforderung bei der Sphäroid-Co-Kultivierung ist, mehrere Sphäroidgenerationen mit gleichen Anteilen der unterschiedlichen Zelltypen zu generieren. Prinzipiell ist eine solche Uniformität die Voraussetzung für eine Wirkstoff-Screening-Plattform.

Eine Strategie von Interesse ist die Co-Kultivierung Therapie-anfälliger Tumorzellen (siehe Abbildungen 89 und 90). Man konnte bereits solche gemischten „Mosaik- oder Hybrid- Sphäroide“ generieren. Dabei wurden vor allem Zelllinien oder Zellklone aus Blasen- oder Brustkarzinomen, die durch ihre unterschiedliche Sensitivität gegenüber Wirkstoffen wie Cisplatin oder BCNU (Bis-chlorethylNitrosourea), oder durch ihr unterschiedliches Differenzierungsmuster definiert sind, verwendet (Tofilon et al. 1987; Bradley et al. 1994; Frenzel et al. 1995; Song et al. 2004; Persaud et al. 2005). Kürzlich sorgte ein gemischtes Sphäroidsystem, das im NASA Bioreaktor kultiviert wurde, und aus den drei sehr gut bekannten Brusttumorzelllinien MCF-7, ZR-54-1 und MDA-MB-231 bestehend, die mit verschiedenen fluoreszierenden CellTracker Sonden markiert waren, für Aufsehen (Vamvakidou et al. 2007). Bei der Verwendung solcher Systeme sollte man nicht vergessen, dass sich Zellen im 3-D Verband in Bezug auf Zellhaftung, -überleben, die Proliferation und Migration möglicherweise anders verhalten können. Auch wenn identische Zellzahlen jeder Zelllinie ausgesät wurden, können diese Eigenschaften die Histomorphologie und die Zellverteilung in gemischten Sphäroiden maßgeblich beeinflussen. Das Verhältnis der Zellen nicht nur zum Zeitpunkt der Aussaat, sondern auch bei der Behandlung, und ihre Verteilung im Sphäroid sind nur einige Parameter, die die Reaktion von Sphäroiden auf eine Wirkstoffbehandlung beeinflussen können. Betrachtet man die historische Entwicklung innerhalb der Wirkstoffentwicklung, von allgemein zytotoxischen hin zu zielspezifischen Wirkstoffkandidaten, so könnte es zu einem speziellen Einsatz von 3-D Co-Kulturen kommen, die aus Zellklonen, die sich nur in bestimmten Genen unterscheiden, bestehen. Ein solches Mosaik-Sphäroid, bestehend aus zwei Populationen einer Zelllinie, die sich in nur einem Gen unterscheiden, konnte bereits von Boyd et al. genutzt werden, um zielspezifische Behandlungsmodalitäten zu untersuchen (Boyd et al. 2002; Boyd et al. 2004)

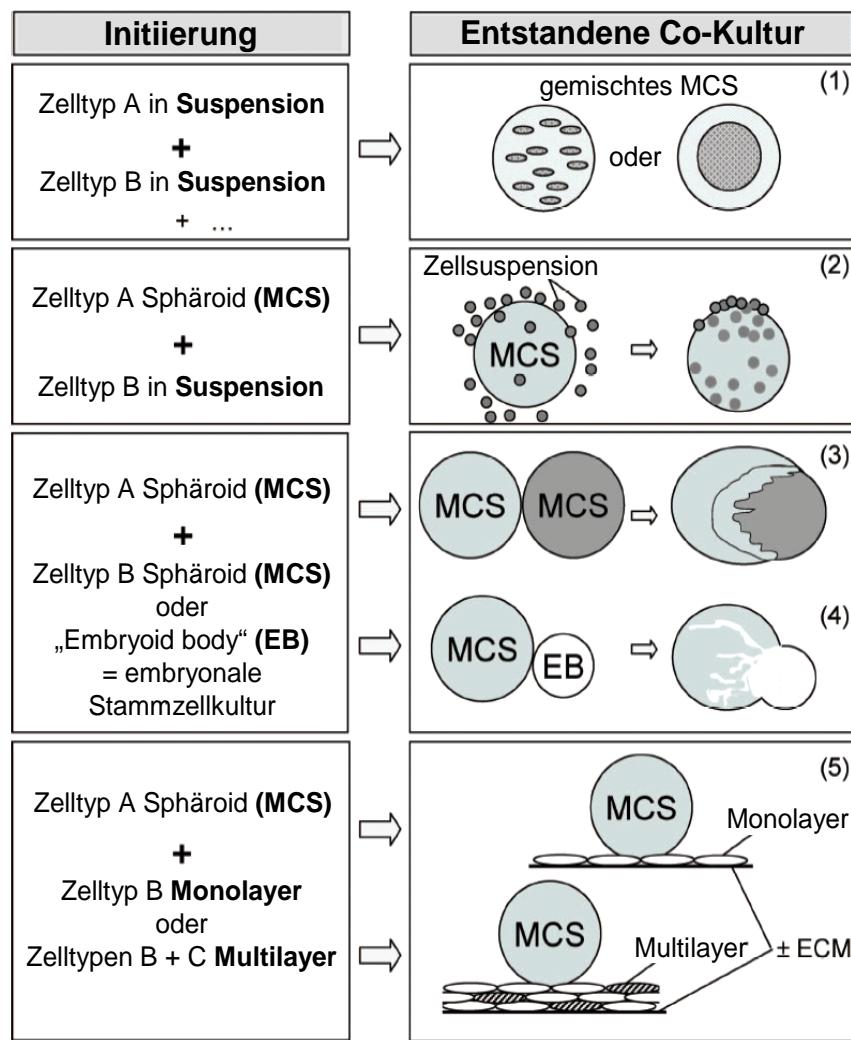


Abbildung 89. Übersicht über mögliche Strategien zur Sphäroid-Co-Kultivierung von Tumor- und Stromazellen, um heterologe Interaktionen im Tumorgewebe zu untersuchen (a). Die am häufigsten zur Co-Kultivierung verwendeten Zellen sind Tumorzellen (T), Immunzellen (I), Fibroblasten (F) und Endothelzellen (EC). Für Ansätze, die nicht zur Tumorforschung dienen können auch andere Zelltypen eingesetzt werden. Im Gegensatz zu Immunzellen, die vor allem als Zellsuspension verwendet werden, kommen Fibroblasten und EC sowohl als Suspensionen, als auch in vorkultivierten adhärenten Systemen (Sphärioden, Monolayer) zur Co-Kultivierung von Tumorzellen und Tumorzell-Sphäroiden zum Einsatz. Eine Co-Kultivierung von Sphäroiden und Multilayer-Kulturen (z.B. EC + F Multilayer) wurde zwar in Betracht gezogen, jedoch noch nicht umgesetzt. Repräsentative Literaturstellen zur Co-Kultivierung von MCTS sind: (1) (Tofilon et al. 1987; Thomsen et al. 1992; Frenzel et al. 1995; Nakamura et al. 1999; Boyd et al. 2001; Boyd et al. 2002; Djordjevic et al. 2006; Spoettl et al. 2006); (2) (Hauptmann et al. 1993; Konur et al. 1998; Siegert et al. 1999; Heimdal et al. 2001; Olsnes et al. 2002; Furber-Harris et al. 2003; Silzle et al. 2003; Gottfried et al. 2006); (3) (Schuster et al. 1994; Kunz-Schughart et al. 1998; Kunz-Schughart et al. 2001); (4) (Wartenberg et al. 2001; Wartenberg et al. 2003; Wartenberg et al. 2006; Gunther et al. 2007); (5) (Brouty-Boye et al. 1994; Offner et al. 1996). Die Histomorphologie von Sphäroid-Co-Kulturen wird zumeist an Mittelschnitten untersucht. Diese erhält man nach einer Kryo-Konservierung oder Paraffin-Einbettung und anschließender Histologie.

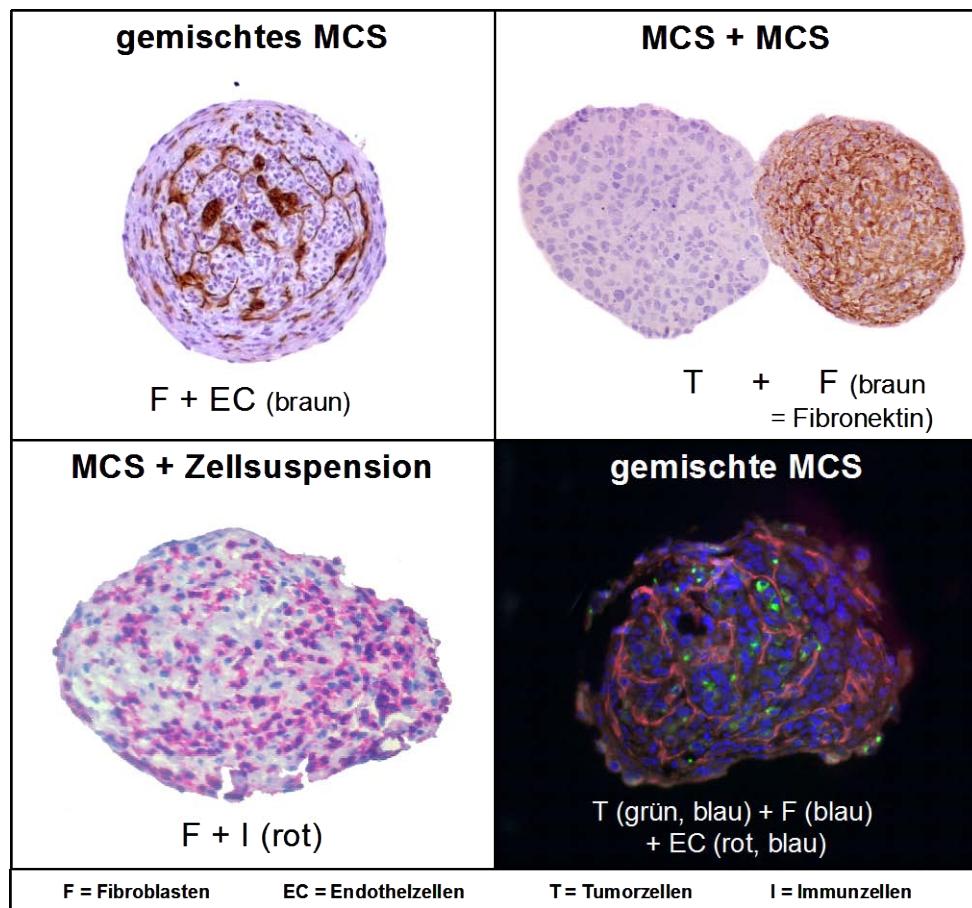


Abbildung 90. Beispiele für Immunhistochemisch bzw. -fluoreszent gefärbte Mittelschnitte von Sphäroid-Co-Kulturen bestehend aus zwei oder drei Zelltypen sind in (b) dargestellt. Zelltypen und die Kulturtechnik wird in der Abbildung näher beschrieben. (Friedrich et al. 2007)

Andere Anwendungen mit Sphäroid-Co-Kulturen befassen sich mit verschiedenen Typen stromaler Zellen. Dabei werden Immunzellen, wie z.B. Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (DC), T-Lymphozyten oder auch natürliche Killerzellen (NK) untersucht. Diese Zelllinien werden vor allem als Zellsuspensionen Tumor- oder Fibroblastensphäroiden zugegeben. So kann man ihre Migration und Reifung oder Aktivierung beobachten. Mit einem dieser Systeme konnte Spoettl et al. die intestinale Differenzierung von Monozyten untersuchen. Dabei wurde ein Sphäroidmodell aus HT29 Kolonkarzinomzellen verwendet, die spezifisch eines der zwei zu untersuchenden Chemokine überexprimierten (Spoettl et al. 2006; Spoettl et al. 2007). Es wird vermutet, dass eines dieser beiden Chemokine auch an der Migration von Monozyten in Stroma-fibroblasten-Sphäroide aus Brusttumorgewebe beteiligt ist (Silzle et al. 2003).

Weitere Techniken der Sphäroid-Co-Kultivierung wurden dazu verwendet, um die Interaktionen zwischen Tumorzellen und stromalen Fibroblasten zu untersuchen. Die experimentellen Ansätze reichen dabei von (a) gemischten Sphäroiden, (b) MCTS, die auf Fibroblasten-Monolayern kultiviert wurden (Brouty-Boye et al. 1994), über (c) MCTS, die mit vorgezüchteten Fibroblasten-Sphäroiden co-kultiviert wurden (so genannte „Konfrontationskulturen“)

(Schuster et al. 1994; Kunz-Schughart et al. 1998), und (d) Fibroblastensuspensionen, die MCTS zugegeben werden, bis hin zur (e) Inkubation von Fibroblasten-Sphäroiden mit Tumorzellsuspensionen (Brabletz et al. 2004). Die letztgenannte Technik diente dazu, einige wichtige pathologische Phänomene wie z.B. die Migration von nicht-aggregierenden Tumorzellen an der Invasionsfront ins Stroma zu untersuchen. Vermutlich schütten Fibroblasten, die bekanntermaßen eine Vielzahl von Molekülen der ECM bilden, im Tumorgewebe und in Sphäroid-Co-Kulturen Zytokine und Wachstumsfaktoren aus und/oder interagieren direkt mit den Tumorzellen (Kunz-Schughart et al. 2002a; Kunz-Schughart et al. 2002b), was die therapeutische Wirkung beeinflussen kann. Darum können diese Co-Kultur-Modelle eindeutig dabei helfen, den Einfluss der stromalen Umgebung auf die Wirkstoffeffizienz zu verstehen. Im Gegensatz zur Radiotherapie ist ein Einsatz dieser Systeme im Wirkstoffscreening zur Zeit noch vernachlässigt worden. Die Idee, die Auswirkungen einer Bestrahlung und anderer Behandlungen auf das Überleben und die Klonogenität von Tumorzellen mittels Einsatz von Hybrid-Sphäroiden aus Fibroblasten und Tumorzellen aufzuzeigen, ist allerdings nicht neu, sie wurde aber eher nur selten umgesetzt (Djordjevic et al. 1990; Lange et al. 1992; Djordjevic et al. 1998). Supralethal-bestrahlte Fibroblasten dienten hier als „Futterzellen“.

Da das Tumorstroma zusätzlich zu Immunzellen und Fibroblasten unterschiedliche Mengen endothelialer Zellen (EC) enthält, ist die Co-Kultivierung von Sphäroiden mit EC ein weiteres, interessantes Forschungsgebiet. Aufgrund der Entwicklung von kombinatorischen Therapien mit antiangiogenetischen Substanzen, wird diese Methode in naher Zukunft immer mehr an Bedeutung gewinnen. Die Technik zur Kultivierung von MCTS auf konfluent-wachsenden EC mit darunter liegender ECM wurde in der Vergangenheit zur Beobachtung der Tumorzellevasion verwendet (Vermeulen et al. 1996). Mit nur geringem Erfolg konnten gemischte Sphäroide aus Tumor- und Endothelzellen zur Beobachtung der Angiogenese kultiviert werden. Gleiches gilt für die Aussaat von EC-Suspensionen und MCTS zur Erforschung der Migration von EC. Indessen konnten Timmins et al. unter Verwendung der Methode des „hängenden Tropfens“ ein Netzwerk aus EC in HCT116 Kolonkarzinom-, und wesentlich deutlicher in HepG2 Leberzellkarzinom-Sphäroiden beobachten (Timmins et al. 2004). Bislang ist nicht bekannt, ob die EC-Netzwerke auch in anderen Tumor-Sphäroid-Typen ausgebildet werden können. Beobachtungen in Fibroblasten-Sphäroiden, die mit EC co-kultiviert wurden lassen darauf schließen, dass zumindest einige Tumorzelltypen das fibroblastische Stroma zur Ausbildung von netzwerk-artigen, tubulären Strukturen in Sphäroiden benötigen (Kunz-Schughart et al. 2006). Im Gegensatz zu Tumorzellen - oder Fibroblasten-Sphäroiden, die nach Co-Kultivierung mit EC netzwerk-artige Strukturen ausbilden, resultiert die Co-Kultivierung von EC und glatten Muskelzellen im Sphäroid in einer völlig unterschiedlichen Morphologie. Dabei bilden die glatten Muskelzellen einen inneren Kern, der von einer Schicht aus EC umgeben ist (Korff et al. 2001). Bereits seit 1998 wurde ein Vorläufer dieser

Methode mit homologen Sphäroiden aus EC verwendet, die abhängig von Zugabe von Methocylzellulose (Methocel) und einer ermöglichten Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten in Kultur gehalten werden konnten (Korff et al. 1998). Um die Wanderungsprozesse von EC zu verfolgen oder um Modulatoren der Angiogenese zu identifizieren können die EC-Sphäroide dann gesammelt und in dreidimensionale ECM-Gele eingebettet werden. Weiterhin wurden diese EC-Sphäroide mit organotypischen oder fragmentierten Sphäroiden zur Beobachtung und Manipulation der Angiogenese in Gliomen und in Hirntumoren co-kultiviert (Goldbrunner et al. 2000; Goldbrunner et al. 2004). Schließlich sollte auch erwähnt werden, dass eine Tumor-induzierte Angiogenese bereits in einem weiteren interessanten Testsystem, nämlich in Konfrontationskulturen von Sphäroiden mit Embryoidkörperchen, beobachtet werden konnte (Wartenberg et al. 2001; Gunther et al. 2007). Der Nachteil dieses Systems liegt jedoch in der benötigen Zugabe von nicht-humanen, pluripotenten Stammzellen der Maus. Beispiele für immunhistochemisch bzw. -fluoreszent gefärbte Mittelschnitte von Sphäroid-Co-Kulturen, die unterschiedlich histologisch behandelt wurden, sind in Abbildung 4 (b) dargestellt.

Zusätzlich zu den Co-Kulturen aus Zelllinien, Zellklonen und Primärzellen wächst das Interesse an der Verwendung von so genannten fragmentierten Sphäroiden, die aus Tumoriopsien/-geweben angezüchtet wurden (De et al. 2000; Heimdal et al. 2001; Kross et al. 2005; Olsnes et al. 2005). Diese Methode scheint für eine individualisierte, Patienten-spezifische Therapietestung besonderer vielversprechend zu sein, mag sich dafür aber weniger für einen Einsatz im Wirkstoff-Screening in größeren Maßstäben eignen. Will man dieses System zur Wirkstofftestung verwenden, so muss man beispielsweise darüber nachdenken, dass es zu interindividuellen Variationen in fragmentierten Sphäroiden aus verschiedenen Sektionen eines einzelnen Tumors kommen kann. Trotzdem wird auch dieser neue, faszinierende Aspekt in einigen zukünftigen Wirkstoff-Screening-Ansätzen wachsende Beachtung finden.

Trotz der vielen möglichen Weiterentwicklungen bei der Analyse und der Kultivierung von Sphäroid-Co-Kulturen kann das Sphäroid *in vitro* Modell jedoch auch in Zukunft Tierversuche im Wirkstoff-Screening Prozess niemals vollständig ersetzen, es kann jedoch zu einer starken Reduktion von Tierversuchen beitragen.

V. Zusammenfassung

Durch Optimierung, Standardisierung und Adaption von Kulturbedingungen und Analytik sollte in dieser Arbeit das dreidimensionale MCTS-Modell an industrielle Anforderungen beim Wirkstoff-Screening angepasst werden. So wurde die (Teil-)Automatisierung und Standardisierung der Sphäroidkultivierung weiter vorangetrieben. Bisher war die Kultivierung von Sphäroiden im „Liquid-Overlay“-Verfahren sehr zeit- und arbeitsintensiv, und daher nur bedingt für einen Einsatz bei der routinemäßigen Wirkstofftestung geeignet. Mit Hilfe des *SerialMate*® Automated Multichannel Pipetting Systems (Thermo Fisher Scientific) konnte die Aussaat und die Behandlung mit Wirkstoffen sowohl von Sphäroiden im „Liquid-Overlay“ als auch von Monolayerkulturen im 96-Well Format teilautomatisiert werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass mit Plattensystemen der Firma Nunc™ erstmals sehr gute und reproduzierbare Ergebnisse bei der Sphäroidbildung auf kommerziell erhältlichen Platten erzielt werden können. Eine zukünftige wissenschaftliche Zusammenarbeit mit Nunc™ soll belegen, dass das viel versprechende „HydroCell“ Plattensystem den Einsatz von Sphäroiden im HTS ermöglichen kann.

Bislang gab es hinsichtlich eines Wirkstoff-/Therapie-Screenings keine automatisierten Methoden zur Analyse des Sphäroidvolumens bzw. -durchmessers. In dieser Arbeit wurde die Bildaufnahme von Sphäroiden einer 96-Well Mikrotiterplatte mit Hilfe eines Axiovert 200 M Inversmikroskops und der AxioVision 4.5 Software (Zeiss) vollständig automatisiert, wodurch es nun problemlos möglich ist, den Sphäroiddurchmesser im HTS über einen längeren Zeitraum hinweg zu bestimmen. Anstelle von 30 Minuten pro Platte bei früherer manueller Bildaufnahme beträgt die Aufnahmezeit mit dem Axiovert 200 M Inversmikroskop nur mehr 10 Minuten. Dazu erlauben in die AxioVision 4.5 Software implementierte bildverarbeitenden Algorithmen eine (semi-)automatisierte Analyse des Sphäroid-Wachstums bzw. einer Wachstumsverzögerung nach einer Behandlung mit wachstumsfördernden bzw. -hemmenden Faktoren und Wirkstoffen.

Neben der Analyse des Sphäroid-Wachstums sollte die Bestimmung der Zellvitalität/Zytotoxizität in Sphäroiden als weiterer Parameter zur automatisierten Analyse von Sphäroiden dienen. Viele bereits kommerziell erhältliche Zellvitalitätsassays, wie der Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit, der ApoGlow™ Adenylat Nucleotide Ratio Assay, der Vybrant® Cytotoxicity Assay, CytoTox-One™ Homogeneous Membrane Integrity Assay, der ToxiLight® BioAssay Kit, CellTiter 96® AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay, oder der ATP-TCA Assay konnten noch nicht für einen Einsatz an 3-D Kulturen adaptiert werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass nach einer Modifikation des Standardprotokolls der ursprünglich für Monolayerkulturen entwickelte Acid Phosphatase (APH) Assay an sieben Kolonkarzinomzell-Sphäroiden (DLD-1, HCT-116, HCT-15, HT29, KM12L4A, KM20L2 und WiDr) einfach und

schnell durchführbar ist. Eine Dissoziation der Sphäroide ist dabei nicht notwendig, das APH Signal ist abhängig von der Zelllinie bis zu einem maximalen Sphäroiddurchmesser von 530-900 µm linear und hoch sensitiv. Mit Hilfe des APH Assays war es nun möglich, die Effekte zehn bereits bekannter Wirkstoffe (Doxorubicin, Paclitaxel, Carboplatin, Cisplatin, 5-FU, Mitoxantron, CCNU/Lomustine, Irinotecan und Epidoxorubicin) und zweier neuer Anti-Tumor-Wirkstoffkandidaten (C-1311 und WMC-79) auf HT29 und HCT-116 Monolayer- und Sphäroid-Kulturen zu untersuchen. Die Berechnung der IC_{50} Werte erlaubte es, die erhaltenen Ergebnisse miteinander bzw. mit Literaturdaten zu vergleichen. Ergänzend zum APH Assay wurde ein komplexes Genexpressionsmonitoring an 5-FU- bzw. WMC-79-behandelten HT29 Monolayer- und Sphäroid-Kulturen durchgeführt, was ein deutliches Clustering der Sphäroidzellen gegenüber Monolayerzellen unabhängig von Wirkstoff, Wirkstoffkonzentration und Wachstumsstatus erkennen lässt.

Ein weiterer interessanter Aspekt für eine potentielle automatisierte Analyse von Sphäroiden ist das Auswachsverhalten bzw. die Migration von Sphäroidzellen auf Kollagen Typ I-beschichteten Mikrotiterplatten. Versuche mit HT29 Sphäroiden zeigten, dass (a) selbst beschichtete 96-Well Rundbodenplatten am besten zur Analyse des Auswachsverhaltens geeignet sind, (b) ohne Anfärbung der Zellen die Auswertung der Auswachsfläche mit der AxioVision Software aufgrund des geringen Kontrastunterschiedes zwischen Hintergrund und auswachsenden Zellen sehr schwierig ist, und (c) die Behandlung mit einem Proliferationshemmer (Mitomycin C) das Auswachsen von HT29 Zellen verringert, jedoch nicht gänzlich unterdrücken kann, was auf eine Kombination aus Migration und Proliferation beim Auswachsen schließen lässt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass mit der Standardisierung und (Teil-) Automatisierung von Sphäroidkultivierung und -analytik, und mit der Validierung des APH Assays zur schnellen und reproduzierbaren Ermittlung der Zellvitalität in Sphäroid-Kulturen wichtige Voraussetzungen für einen (semi)automatisierten Einsatz des MCTS Modells beim Wirkstoff-Screening erfüllt werden. Diese Aspekte können wesentlich dazu beitragen, die Lücke zwischen Monolayerkulturen und Tiermodellen im Prozess der Anti-Tumor-Wirkstoff-Entwicklung und -Testung zu schließen.

IV. Literaturverzeichnis

- Acker H, Carlsson J, Mueller-Klieser W, Sutherland RM. 1987. Comparative pO₂ measurements in cell spheroids cultured with different techniques. *British Journal of Cancer* 56: 325-327.
- Acker H, Carlsson J. 1992. The microenvironment in multicellular spheroids, in *Spheroid Culture in Cancer Research* R Bjerkvig (ed). Boca Raton, USA: CRC Press. pp 135-157.
- Audran R, Dazord L, Toujas L. 1994. Interactions between human macrophages and tumor cells in three-dimensional cultures. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 39: 299-304.
- Augustin E, Wheatley DN, Lamb J, Konopa J. 1996. Imidazoacridinones arrest cell-cycle progression in the G₂ phase of L1210 cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 38: 39-44.
- Bajzer Z, Vuk-Pavlovic S. 1987. Quantitation of autocrine regulation of tumor growth: a general phenomenological model. *Cancer Research* 47: 5330-5333.
- Balis FM. 2002. Evolution of anticancer drug discovery and the role of cell-based screening. *Journal of the National Cancer Institute* 94: 78-79.
- Ballangrud AM, Yang WH, Charlton DE, McDevitt MR, Hamacher KA, Panageas KS, Ma D, Bander NH, Scheinberg DA, Sgouros G. 2001. Response of LNCaP spheroids after treatment with an alpha-particle emitter (213Bi)-labeled anti-prostate-specific membrane antigen antibody (J591). *Cancer Research* 61: 2008-2014.
- Ballangrud AM, Yang WH, Dnistrian A, Lampen NM, Sgouros G. 1999. Growth and characterization of LNCaP prostate cancer cell spheroids. *Clinical Cancer Research* 5: 3171-3176.
- Banks SD, Waters KA, Barrett LL, Dickerson S, Pendergast W, Smith GK. 1994. Destruction of WiDr multicellular tumor spheroids with the novel thymidylate synthase inhibitor 1843U89 at physiological thymidine concentrations. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 33: 455-459.
- Bardies M, Thedrez P, Gestin JF, Marcille BM, Guerreau D, Faivre-Chauvet A, Mahe M, Sai-Maurel C, Chatal JF. 1992. Use of multi-cell spheroids of ovarian carcinoma as an intraperitoneal radio-immunotherapy model: uptake, retention kinetics and dosimetric evaluation. *International Journal of Cancer* 50: 984-991.
- Barone RM, Calabro-Jones P, Thomas TN, Sharp TR, Byfield JE. 1981. Surgical adjuvant therapy in colon carcinoma: a human tumor spheroid model for evaluating radiation sensitizing agents. *Cancer* 47: 2349-2357.
- Bartholoma P, Impidjati, Reininger-Mack A, Zhang Z, Thielecke H, Robitzki A. 2005. A more aggressive breast cancer spheroid model coupled to an electronic capillary sensor system for a high-content screening of cytotoxic agents in cancer therapy: 3-dimensional in vitro tumor spheroids as a screening model. *Journal of Biomolecular Screening* 10: 705-714.
- Berglund A, Glimelius B, Bergh J, Brodin O, Fjallskog ML, Hagberg H, von HA, Larsson R, Tholander B, de la TM, Astrom G, Oberg K, Paro G, Nygren P. 2002. Selection of chemotherapy by ex vivo assessment of tumor sensitivity to cytotoxic drugs: results of a clinical trial. *Medical Oncology* 19: 151-159.

- Bergstrom P, Grankvist K, Holm S, Henriksson R. 1991. Effects of antimicrobial drugs on the cytotoxicity of epirubicin, bleomycin, estramustine and cisplatin. *Anticancer Research* 11: 1039-1043.
- Boyd M, Mairs RJ, Cunningham SH, Mairs SC, McCluskey A, Livingstone A, Stevenson K, Brown MM, Wilson L, Carlin S, Wheldon TE. 2001. A gene therapy/targeted radiotherapy strategy for radiation cell kill by. *Journal of Gene Medicine* 3: 165-172.
- Boyd M, Mairs RJ, Keith WN, Ross SC, Welsh P, Akabani G, Owens J, Vaidyanathan G, Carruthers R, Dorrens J, Zalutsky MR. 2004. An efficient targeted radiotherapy/gene therapy strategy utilising human telomerase promoters and radioastatine and harnessing radiation-mediated bystander effects. *J Gene Med* 6: 937-947.
- Boyd M, Mairs SC, Stevenson K, Livingstone A, Clark AM, Ross SC, Mairs RJ. 2002. Transfectant mosaic spheroids: a new model for evaluation of tumour cell killing in targeted radiotherapy and experimental gene therapy. *Journal of Gene Medicine* 4: 567-576.
- Brabletz T, Spaderna S, Kolb J, Hlubek F, Faller G, Bruns CJ, Jung A, Nentwich J, Duluc I, Domon-Dell C, Kirchner T, Freund JN. 2004. Down-regulation of the homeodomain factor Cdx2 in colorectal cancer by collagen type I: an active role for the tumor environment in malignant tumor progression. *Cancer Research* 64: 6973-6977.
- Bradley C, Pitts J. 1994. The use of genetic marking to assess the interaction of sensitive and multidrug-resistant cells in mixed culture. *British Journal of Cancer* 70: 795-798.
- Braun RD, Gradianu M, Vistisen KS, Roberts RL, Berkowitz BA. 2007. Manganese-enhanced MRI of human choroidal melanoma xenografts. *Investigative ophthalmology & visual science* 48: 963-967.
- Bredel-Geissler A, Karbach U, Walenta S, Vollrath L, Mueller-Klieser W. 1992. Proliferation-associated oxygen consumption and morphology of tumor cells in monolayer and spheroid culture. *Journal of Cellular Physiology* 153: 44-52.
- Brockhoff G. 2007. DNA- und Proliferationsmessungen in der Durchflusszytometrie, in Zelluläre Diagnostik 1st (ed). Freiburg, Germany: S. Karger Verlag. pp 604-646.
- Brouty-Boye D, Mainguene C, Magnien V, Israel L, Beaupain R. 1994. Fibroblast-mediated differentiation in human breast carcinoma cells (MCF-7) grown as nodules in vitro. *International Journal of Cancer* 56: 731-735.
- Buchsbaum DJ, Langmuir VK, Wessels BW. 1993. Experimental radioimmunotherapy. *Medical Physics* 20: 551-567.
- Buffa FM, Davidson SE, Hunter RD, Nahum AE, West CM. 2001. Incorporating biologic measurements (SF(2), CFE) into a tumor control probability model increases their prognostic significance: a study in cervical carcinoma treated with radiation therapy. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 50: 1113-1122.
- Burger AM, Jenkins TC, Double JA, Bibby MC. 1999. Cellular uptake, cytotoxicity and DNA-binding studies of the novel imidazoacridinone antineoplastic agent C1311. *British Journal of Cancer* 81: 367-375.
- Carlsson J, Acker H. 1988. Relations between pH, oxygen partial pressure and growth in cultured cell spheroids. *International Journal of Cancer* 42: 715-720.
- Carlsson J, Nederman T. 1989. Tumour spheroid technology in cancer therapy research. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 25: 1127-1133.

- Carlsson J, Yuhas JM. 1984. Liquid-overlay culture of cellular spheroids. *Recent Results in Cancer Research* 95: 1-23.
- Casciari JJ, Hollingshead MG, Alley MC, Mayo JG, Malspeis L, Miyauchi S, Grever MR, Weinstein JN. 1994. Growth and chemotherapeutic response of cells in a hollow-fiber in vitro solid tumor model. *Journal of the National Cancer Institute* 86: 1846-1852.
- Casciari JJ, Sotirchos SV, Sutherland RM. 1988. Glucose diffusivity in multicellular tumor spheroids. *Cancer Research* 48: 3905-3909.
- Casey RC, Burleson KM, Skubitz KM, Pambuccian SE, Oegema TR, Jr., Ruff LE, Skubitz AP. 2001. Beta 1-integrins regulate the formation and adhesion of ovarian carcinoma multicellular spheroids. *American Journal of Pathology* 159: 2071-2080.
- Chan WS, West CM, Moore JV, Hart IR. 1991. Photocytotoxic efficacy of sulphonated species of aluminium phthalocyanine against cell monolayers, multicellular spheroids and in vivo tumours. *British Journal of Cancer* 64: 827-832.
- Chatterjee S, Matsumura A, Schradermeier J, Gillespie GY. 2000. Human malignant glioma therapy using anti-alpha(v)beta3 integrin agents. *Journal of Neuro Oncology* 46: 135-144.
- Chen TR, Drabkowsky D, Hay RJ, Macy M, Peterson W, Jr. 1987. WiDr is a derivative of another colon adenocarcinoma cell line, HT-29. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 27: 125-134.
- Cheng FM, Hansen EB, Taylor CR, Epstein AL. 1991. Diffusion and binding of monoclonal antibody TNT-1 in multicellular tumor spheroids. *Journal of the National Cancer Institute* 83: 200-204.
- Cholody WM, Kosakowska-Cholody T, Hollingshead MG, Hariprakasha HK, Michejda CJ. 2005. A new synthetic agent with potent but selective cytotoxic activity against cancer. *Journal of Medicinal Chemistry* 48: 4474-4481.
- Cholody WM, Kosakowska-Cholody T, Michejda CJ. 2001. Bisimidazoacridones induce a potent cytostatic effect in colon tumor cells that sensitizes them to killing by UCN-01. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 47: 241-249.
- Cholody WM, Martelli S, Konopa J. 1992. Chromophore-modified antineoplastic imidazoacridinones. Synthesis and activity against murine leukemias. *Journal of Medicinal Chemistry* 35: 378-382.
- Ciccolini J, Peillard L, Evrard A, Cuq P, Aubert C, Pelegrin A, Formento P, Milano G, Catalin J. 2000. Enhanced antitumor activity of 5-fluorouracil in combination with 2'-deoxyinosine in human colorectal cell lines and human colon tumor xenografts. *Clinical Cancer Research* 6: 1529-1535.
- Clejan S, O'Connor K, Rosensweig N. 2001. Tri-dimensional prostate cell cultures in simulated microgravity and induced changes in lipid second messengers and signal transduction. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 5: 60-73.
- Connolly DT, Knight MB, Harakas NK, Wittwer AJ, Feder J. 1986. Determination of the number of endothelial cells in culture using an acid phosphatase assay. *Analytical Biochemistry* 152: 136-140.
- De Witt Hamer PC, Jonker A, Leenstra S, Ruijter JM, Van Noorden CJ. 2005. Quantification of viability in organotypic multicellular spheroids of human malignant glioma using lactate

- dehydrogenase activity: a rapid and reliable automated assay. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 53: 23-34.
- De RL, Cornelissen M, de RD. 2000. Autologous spheroid culture: a screening tool for human brain tumour invasion. *Critical Reviews in Oncology / Hematology* 36: 107-122.
- Debnath J , Brugge JS. 2005. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nature Reviews Cancer* 5: 675-688.
- Del DD, Werbowetski T, Del Maestro RF. 2004. Spheroid preparation from hanging drops: characterization of a model of brain tumor invasion. *Journal of Neuro Oncology* 67: 295-303.
- Demicheli R, Foroni R, Ingrosso A, Pratesi G, Soranzo C, Tortoreto M. 1989. An exponential-Gompertzian description of LoVo cell tumor growth from in vivo and in vitro data. *Cancer Research* 49: 6543-6546.
- Desoize B, Gimonet D, Jardiller JC. 1998. Cell culture as spheroids: an approach to multicellular resistance. *Anticancer Research* 18: 4147-4158.
- Desoize B , Jardillier J. 2000. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Critical Reviews in Oncology / Hematology* 36: 193-207.
- Djordjevic B , Lange CS. 2006. Cell-cell interactions in spheroids maintained in suspension. *Acta Oncologica* 45: 412-420.
- Djordjevic B , Lange CS. 1990. Clonogenicity of mammalian cells in hybrid spheroids: a new assay method. *Radiation and Environmental Biophysics* 29: 31-46.
- Djordjevic B, Lange CS, Schwartz MS, Rotman M. 1998. Clonogenic inactivation of colon cancer-derived cells treated with 5-fluorouracil and indomethacin in hybrid spheroids. *Acta Oncologica* 37: 735-739.
- Dolfini E, Elli L, Roncoroni L, Costa B, Colleoni MP, Lorusso V, Ramponi S, Braidotti P, Ferriero S, Falini ML, Bardella MT. 2005. Damaging effects of gliadin on three-dimensional cell culture model. *World Journal of Gastroenterology* 11: 5973-5977.
- Donaldson JT, Tucker JA, Keane TE, Walther PJ, Webb KS. 1990. Characterization of a new model of human prostatic cancer: the multicellular tumor spheroid. *International Journal of Cancer* 46: 238-244.
- Doß M. 2008. Evaluierung kommerzieller Zytotoxizitätsassays für den Einsatz an 3-D Zellkulturen. Universität Regensburg. Universitätsbibliothek Signatur XH 7204 D724.
- Double EB, Cate CC, Curphey TJ, Pettengill OS, Sorenson GD, Maurer LH. 1985. Evaluation of drug efficacy in vitro using human small cell carcinoma of the lung spheroids. *Cancer* 56: 1918-1925.
- Dulong JL, Legallais C, Darquy S, Reach G. 2002. A novel model of solute transport in a hollow-fiber bioartificial pancreas based on a finite element method. *Biotechnology and Bioengineering* 78: 576-582.
- Duong HS, Le AD, Zhang Q, Messadi DV. 2005. A novel 3-dimensional culture system as an in vitro model for studying oral cancer cell invasion. *International Journal of Experimental Pathology* 86: 365-374.
- Durand RE. 1990. Slow penetration of anthracyclines into spheroids and tumors: a therapeutic advantage? *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 26: 198-204.

Durand RE, Olive PL. 1992. Evaluation of bioreductive drugs in multicell spheroids. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics 22: 689-692.

Durand RE, Sham E. 1998. The lifetime of hypoxic human tumor cells. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics 42: 711-715.

Dziegielewski J, Slusarski B, Konitz A, Skladanowski A, Konopa J. 2002. Intercalation of imidazoacridinones to DNA and its relevance to cytotoxic and antitumor activity. Biochemical Pharmacology 63: 1653-1662.

Eley KW, Benedict SH, Chung TD, Kavanagh BD, Broaddus WC, Schmidt-Ullrich RK, Lin PS. 2002. The effects of pentoxifylline on the survival of human glioma cells with continuous and intermittent stereotactic radiosurgery irradiation. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics 54: 542-550.

Ellison G, Klinowska T, Westwood RF, Docter E, French T, Fox JC. 2002. Further evidence to support the melanocytic origin of MDA-MB-435. Molecular Pathology 55: 294-299.

Enmon R, Yang WH, Ballangrud AM, Solit DB, Heller G, Rosen N, Scher HI, Sgouros G. 2003. Combination treatment with 17-N-allylamino-17-demethoxy geldanamycin and acute irradiation produces supra-additive growth suppression in human prostate carcinoma spheroids. Cancer Research 63: 8393-8399.

Enmon RM, Jr., O'Connor KC, Song H, Lacks DJ, Schwartz DK. 2002. Aggregation kinetics of well and poorly differentiated human prostate cancer cells. Biotechnology and Bioengineering 80: 580-588.

Erlichman C, Wu A. 1992. Resistance of MGH-U1 bladder cancer spheroids to vincristine. Anticancer Research 12: 1233-1236.

Eshleman JS, Carlson BL, Mladek AC, Kastner BD, Shide KL, Sarkaria JN. 2002. Inhibition of the mammalian target of rapamycin sensitizes U87 xenografts to fractionated radiation therapy. Cancer Research 62: 7291-7297.

Essand M, Nilsson S, Carlsson J. 1993. Growth of prostatic cancer cells, DU 145, as multicellular spheroids and effects of estramustine. Anticancer Research 13: 1261-1268.

Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle PA, Xu X, Elder DE, Herlyn M. 2005. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. Cancer Research 65: 9328-9337.

Feder-Mengus C, Ghosh S, Weber WP, Wyler S, Zajac P, Terracciano L, Oertli D, Heberer M, Martin I, Spagnoli GC, Reschner A. 2007. Multiple mechanisms underlie defective recognition of melanoma cells cultured in three-dimensional architectures by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. British Journal of Cancer 96: 1072-1082.

Fehlauer F, Muench M, Rades D, Stalpers LJ, Leenstra S, van d, V, Slotman B, Smid EJ, Sminia P. 2005. Effects of irradiation and cisplatin on human glioma spheroids: inhibition of cell proliferation and cell migration. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 131: 723-732.

Fehlauer F, Muench M, Smid EJ, Slotman B, Richter E, van d, V, Sminia P. 2006. Combined modality therapy of gemcitabine and irradiation on human glioma spheroids derived from cell lines and biopsy tissue. Oncology Reports 15: 97-105.

- Filippovich IV, Sorokina N, Robillard N, Faivre-Chauvet A, Bardies M, Chatal JF. 1996. Cell death induced by a 131I-labeled monoclonal antibody in ovarian cancer multicell spheroids. *Nuclear Medicine and Biology* 23: 623-626.
- Francia G, Green SK, Bocci G, Man S, Emmenegger U, Ebos JM, Weinerman A, Shaked Y, Kerbel RS. 2005. Down-regulation of DNA mismatch repair proteins in human and murine tumor spheroids: implications for multicellular resistance to alkylating agents. *Molecular Cancer Therapeutics* 4: 1484-1494.
- Frankel A, Man S, Elliott P, Adams J, Kerbel RS. 2000. Lack of multicellular drug resistance observed in human ovarian and prostate carcinoma treated with the proteasome inhibitor PS-341. *Clinical Cancer Research* 6: 3719-3728.
- Frenzel KR, Saller RM, Kummermehr J, Schultz-Hector S. 1995. Quantitative distinction of cisplatin-sensitive and -resistant mouse fibrosarcoma cells grown in multicell tumor spheroids. *Cancer Research* 55: 386-391.
- Freyer DR. 1992. Tumor spheroids in radiobiology research, in *Spheroid Culture in Cancer Research*. Bjerkvig R (ed). Boca Raton, USA: CRC Press. pp 217-275.
- Freyer JP. 1988. Role of necrosis in regulating the growth saturation of multicellular spheroids. *Cancer Research* 48: 2432-2439.
- Freyer JP, Fink NH, Schor PL, Coulter JR, Neeman M, Sillerud LO. 1990. A system for viably maintaining a stirred suspension of multicellular spheroids during NMR spectroscopy. *NMR in Biomedicine* 3: 195-205.
- Freyer JP, Schor PL. 1989. Regrowth kinetics of cells from different regions of multicellular spheroids of four cell lines. *Journal of Cellular Physiology* 138: 384-392.
- Freyer JP, Schor PL, Jarrett KA, Neeman M, Sillerud LO. 1991. Cellular energetics measured by phosphorous nuclear magnetic resonance spectroscopy are not correlated with chronic nutrient deficiency in multicellular tumor spheroids. *Cancer Research* 51: 3831-3837.
- Freyer JP, Wilder ME, Jett JH. 1987. Viable sorting of intact multicellular spheroids by flow cytometry. *Cytometry* 8: 427-436.
- Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart LA. 2007a. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids - old hat or new challenge? *International Journal of Radiation Biology* 83: 849-871.
- Friedrich J, Eder W, Castaneda J, Doss M, Huber E, Ebner R, Kunz-Schughart LA. 2007b. A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the Acid phosphatase assay. *Journal of Biomolecular Screening* 12: 925-937.
- Furber-Harris PM, Laniyan I, Harris D, Dunston GM, Vaughn T, Abdelnaby A, Parish-Gause D, Oredipe OA. 2003. Activated eosinophils infiltrate MCF-7 breast multicellular tumor spheroids. *Anticancer Research* 23: 71-78.
- Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, Beroukhim R, Milner DA, Granter SR, Du J, Lee C, Wagner SN, Li C, Golub TR, Rimm DL, Meyerson ML, Fisher DE, Sellers WR. 2005. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 436: 117-122.
- Genc M, Castro KN, Barten-van RA, Stalpers LJ, Haveman J. 2004. Enhancement of effects of irradiation by gemcitabine in a glioblastoma cell line and cell line spheroids. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 130: 45-51.

Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD. 1991. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *American Journal of Pathology* 138: 867-873.

Ghosh S, Spagnoli GC, Martin I, Ploegert S, Demougin P, Heberer M, Reschner A. 2005. Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: a high density oligonucleotide array study. *Journal of Cellular Physiology* 204: 522-531.

Gill S, Gill R, Wicks D, Liang D. 2007. A cell-based Rb(+) -flux assay of the Kv1.3 potassium channel. *Assay and Drug Development Technologies* 5: 373-380.

Gillies RJ, Galons JP, McGovern KA, Scherer PG, Lien YH, Job C, Ratcliff R, Chapa F, Cerdan S, Dale BE. 1993. Design and application of NMR-compatible bioreactor circuits for extended perfusion of high-density mammalian cell cultures. *NMR in Biomedicine* 6: 95-104.

Goldbrunner RH, Bendszus M, Tonn JC. 2004. Models for angiogenesis in gliomas. *Cancer Treatment and Research* 117: 115-135.

Goldbrunner RH, Wagner S, Roosen K, Tonn JC. 2000. Models for assessment of angiogenesis in gliomas. *Journal of Neuro Oncology* 50: 53-62.

Goodman TT, Olive PL, Pun SH. 2007. Increased nanoparticle penetration in collagenase-treated multicellular spheroids. *International Journal of Nanomedicine* 2: 265-274.

Gorlach A, Fandrey J, Holtermann G, Acker H. 1994. Effects of cobalt on haem proteins of erythropoietin-producing HepG2 cells in multicellular spheroid culture. *FEBS Letters* 348: 216-218.

Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, Kreutz M. 2006a. Brave little world: spheroids as an in vitro model to study tumor-immune-cell interactions. *Cell Cycle* 5: 691-695.

Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Ebner S, Mueller-Klieser W, Hoves S, Andreesen R, Mackensen A, Kreutz M. 2006b. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood* 107: 2013-2021.

Grivicich I, Regner A, da Rocha AB, Grass LB, Alves PA, Kayser GB, Schwartsmann G, Henriques JA. 2005a. Irinotecan/5-fluorouracil combination induces alterations in mitochondrial membrane potential and caspases on colon cancer cell lines. *Oncology Research* 15: 385-392.

Grivicich I, Regner A, da Rocha AB, Kayser GB, Schunemann DP, Grass LB, Alves PA, Henriques JA, Schwartsmann G. 2005b. The irinotecan/5-fluorouracil combination induces apoptosis and enhances manganese superoxide dismutase activity in HT-29 human colon carcinoma cells. *Chemotherapy* 51: 93-102.

Guichard S, Arnould S, Hennebelle I, Bugat R, Canal P. 2001. Combination of oxaliplatin and irinotecan on human colon cancer cell lines: activity in vitro and in vivo. *Anticancer Drugs* 12: 741-751.

Gunther S, Ruhe C, Derikito MG, Bose G, Sauer H, Wartenberg M. 2007. Polyphenols prevent cell shedding from mouse mammary cancer spheroids and inhibit cancer cell invasion in confrontation cultures derived from embryonic stem cells. *Cancer Letters* 250: 25-35.

Harstrick A, Gonzales A, Schleucher N, Vanhoefer U, Lu K, Formento JL, Milano G, Wilke H, Seeber S, Rustum Y. 1998. Comparison between short or long exposure to 5-fluorouracil in

human gastric and colon cancer cell lines: biochemical mechanism of resistance. *Anticancer Drugs* 9: 625-634.

Hauptmann S, Zwadlo-Klarwasser G, Jansen M, Klosterhalfen B, Kirkpatrick CJ. 1993. Macrophages and multicellular tumor spheroids in co-culture: a three-dimensional model to study tumor-host interactions. Evidence for macrophage-mediated tumor cell proliferation and migration. *American Journal of Pathology* 143: 1406-1415.

Hedlund TE, Duke RC, Miller GJ. 1999. Three-dimensional spheroid cultures of human prostate cancer cell lines. *Prostate* 41: 154-165.

Heimdal JH, Olsnes C, Olofsson J, Aarstad HJ. 2001. Monocyte and monocyte-derived macrophage secretion of MCP-1 in co-culture with autologous malignant and benign control fragment spheroids. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 50: 300-306.

Hernandez L, Cholody WM, Hudson EA, Resau JH, Pauly G, Michejda CJ. 1995. Mechanism of action of bisimidazoacridones, new drugs with potent, selective activity against colon cancer. *Cancer Research* 55: 2338-2345.

Heuser M, Ringert RH, Zoeller G, Hemmerlein B. 2003. Dynamic assessment of angiogenesis in renal cell carcinoma spheroids by intravital microscopy. *Journal of Urology* 169: 1267-1270.

Hicks KO, Ohms SJ, van Zijl PL, Denny WA, Hunter PJ, Wilson WR. 1997. An experimental and mathematical model for the extravascular transport of a DNA intercalator in tumours. *British Journal of Cancer* 76: 894-903.

Hicks KO, Pruijn FB, Sturman JR, Denny WA, Wilson WR. 2003. Multicellular resistance to tirapazamine is due to restricted extravascular transport: a pharmacokinetic/pharmacodynamic study in HT29 multicellular layer cultures. *Cancer Research* 63: 5970-5977.

Hoevel T, Macek R, Swisshelm K, Kubbies M. 2004. Reexpression of the TJ protein CLDN1 induces apoptosis in breast tumor spheroids. *International Journal of Cancer* 108: 374-383.

Hofmann C, Buttenschoen K, Straeter J, Henne-Bruns D, Kornmann M. 2005. Pre-clinical evaluation of the activity of irinotecan as a basis for regional chemotherapy. *Anticancer Research* 25: 795-804.

Horan HP, Colcher D, Salomon D, Ridge J, Noguchi P, Schlom J. 1985. Influence of spatial configuration of carcinoma cell populations on the expression of a tumor-associated glycoprotein. *Cancer Research* 45: 833-840.

Huygens A, Huyghe D, Bormans G, Verbruggen A, Kamuhabwa AR, Roskams T, De Witte PA. 2003. Accumulation and photocytotoxicity of hypericin and analogs in two- and three-dimensional cultures of transitional cell carcinoma cells. *Photochemistry and Photobiology* 78: 607-614.

Hystad ME, Rofstad EK. 1994. Oxygen consumption rate and mitochondrial density in human melanoma monolayer cultures and multicellular spheroids. *International Journal of Cancer* 57: 532-537.

Ingram M, Techy GB, Saroufeem R, Yazan O, Narayan KS, Goodwin TJ, Spaulding GF. 1997. Three-dimensional growth patterns of various human tumor cell lines in simulated microgravity of a NASA bioreactor. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 33: 459-466.

- Ivascu A, Kubbies M. 2006. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *Journal of Biomolecular Screening* 11: 922-932.
- Jansen M, Dykstra M, Lee JI, Stables J, Topley P, Knick VC, Mullin RJ, Duch DS, Smith GK. 1994. Effect of purine synthesis inhibition on WiDr spheroids in vitro or on WiDr or colon 38 tumors in vivo. Complete growth inhibition but not regression. *Biochemical Pharmacology* 47: 1067-1078.
- Johnson JI, Decker S, Zaharevitz D, Rubinstein LV, Venditti JM, Schepartz S, Kalyanrug S, Christian M, Arbuck S, Hollingshead M, Sausville EA. 2001. Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *British Journal of Cancer* 84: 1424-1431.
- Jorgensen K, Skrede M, Cruciani V, Mikalsen SO, Slipicevic A, Florenes VA. 2005. Phorbol ester phorbol-12-myristate-13-acetate promotes anchorage-independent growth and survival of melanomas through MEK-independent activation of ERK1/2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 329: 266-274.
- Kamuhabwa AA, Huygens A, De Witte PA. 2003. Photodynamic therapy of transitional cell carcinoma multicellular tumor spheroids with hypericin. *International Journal of Oncology* 23: 1445-1450.
- Kan O, Griffiths L, Baban D, Iqball S, Uden M, Spearman H, Slingsby J, Price T, Esapa M, Kingsman S, Kingsman A, Slade A, Naylor S. 2001. Direct retroviral delivery of human cytochrome P450 2B6 for gene-directed enzyme prodrug therapy of cancer. *Cancer Gene Therapy* 8: 473-482.
- Kawai K, Hayashi H, Ozaki Y, Saijo K, Liu SQ, Akaza H, Ohno T. 2001. Assessment of the number of local cytotoxic T lymphocytes required for degradation of micrometer-size tumor spheroids. *Cytotechnology* 37: 31-40.
- Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. 2003. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biootechnology and Bioengineering* 83: 173-180.
- Kerr DJ, Smart HE. 1991. The relationship between cytotoxic drug exposure and tumour cell kill, in vitro and in vivo. *In Vivo* 5: 385-388.
- Khaitan D, Chandna S, Arya MB, Dwarakanath BS. 2006. Differential mechanisms of radiosensitization by 2-deoxy-D-glucose in the monolayers and multicellular spheroids of a human glioma cell line. *Cancer Biology & Therapy* 5: 1142-1151.
- Kilani RT, Tamimi Y, Hanel EG, Wong KK, Karmali S, Lee PW, Moore RB. 2003. Selective reovirus killing of bladder cancer in a co-culture spheroid model. *Virus Research* 93: 1-12.
- Kitada N, Takara K, Minegaki T, Itoh C, Tsujimoto M, Sakaeda T, Yokoyama T. 2007. Factors affecting sensitivity to antitumor platinum derivatives of human colorectal tumor cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*.
- Kohno N, Ohnuma T, Biller HF, Holland JF. 1988. Effects of cisplatin plus fluorouracil vs cisplatin plus cytarabine on head and neck squamous multicellular tumor spheroids. *Archives of Otolaryngology - Head & Neck Surgery* 114: 157-161.
- Konduri SD, Tasiou A, Chandrasekar N, Rao JS. 2001. Overexpression of tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI-2), decreases the invasiveness of prostate cancer cells in vitro. *International Journal of Cancer* 18: 127-131.

- Konur A, Kreutz M, Knuchel R, Krause SW, Andreesen R. 1998. Cytokine repertoire during maturation of monocytes to macrophages within spheroids of malignant and non-malignant urothelial cell lines. *International Journal of Cancer* 78: 648-653.
- Korff T, Augustin HG. 1998. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *Journal of Cell Biology* 143: 1341-1352.
- Korff T, Kimmina S, Martiny-Baron G, Augustin HG. 2001. Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *FASEB Journal* 15: 447-457.
- Kosaka T, Fukaya K, Tsuboi S, Pu H, Ohno T, Tsuji T, Namba M. 1996a. Comparison of various methods of assaying the cytotoxic effects of ethanol on human hepatoblastoma cells (HuH-6 line). *Acta Medica Okayama* 50: 151-156.
- Kosaka T, Tsuboi S, Fukaya K, Pu H, Ohno T, Tsuji T, Miyazaki M, Namba M. 1996b. Spheroid cultures of human hepatoblastoma cells (HuH-6 line) and their application for cytotoxicity assay of alcohols. *Acta Medica Okayama* 50: 61-66.
- Kosakowska-Cholody T, Cholody WM, Monks A, Woynarowska BA, Michejda CJ. 2005. WMC-79, a potent agent against colon cancers, induces apoptosis through a p53-dependent pathway. *Molecular Cancer Therapeutics* 4: 1617-1627.
- Kostarelos K, Emfietzoglou D, Papakostas A, Yang WH, Ballangrud A, Sgouros G. 2004. Binding and interstitial penetration of liposomes within avascular tumor spheroids. *Int J Cancer* 112: 713-721.
- Kross KW, Heimdal JH, Olsnes C, Olofsson J, Aarstad HJ. 2005. Head and neck squamous cell carcinoma spheroid- and monocyte spheroid-stimulated IL-6 and monocyte chemotactic protein-1 secretion are related to TNM stage, inflammatory state and tumor macrophage density. *Acta oto-laryngologica* 125: 1097-1104.
- Kubota N, Matsui K, Sato S, Inada T. 1984. Radiation responses of HMV-I human malignant melanoma cells grown in vitro as multicellular spheroids. *Journal of Radiation Research* 25: 215-224.
- Kunz-Schughart LA, Doetsch J, Mueller-Klieser W, Groebe K. 2000a. Proliferative activity and tumorigenic conversion: impact on cellular metabolism in 3-D culture. *Am J Physiol Cell Physiol* JID - 100901225 278: C765-C780.
- Kunz-Schughart LA, Freyer JP. 1997. Adaptation of an automated selective dissociation procedure to two novel spheroid types. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 33: 73-76.
- Kunz-Schughart LA, Freyer JP. 2002a. Phosphorous metabolites and steady-state energetics of transformed fibroblasts during three-dimensional growth. *American Journal of Physiology: Cell Physiology* 283: C1287-C1297.
- Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R. 2004. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *Journal of Biomolecular Screening* 9: 273-285.
- Kunz-Schughart LA, Groebe K, Mueller-Klieser W. 1996. Three-dimensional cell culture induces novel proliferative and metabolic alterations associated with oncogenic transformation. *International Journal of Cancer* 66: 578-586.

- Kunz-Schughart LA, Heyder P, Schroeder J, Knuechel R. 2001. A heterologous 3-D coculture model of breast tumor cells and fibroblasts to study tumor-associated fibroblast differentiation. *Experimental Cell Research* 266: 74-86.
- Kunz-Schughart LA, Knuechel R. 2002b. Tumor-associated fibroblasts (part I): active stromal participants in tumor development and progression? *Histology Histopathology* 17: 599-621.
- Kunz-Schughart LA, Kreutz M, Knuechel R. 1998. Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology. *International Journal of Experimental Pathology* 79: 1-23.
- Kunz-Schughart LA, Mueller-Klieser W. 2000b. Three-dimensional culture, in *Animal Cell Culture 3*. Oxford: Oxford University Press. pp 123-148.
- Kunz-Schughart LA, Schroeder JA, Wondrak M, van RF, Lehle K, Hofstaedter F, Wheatley DN. 2006. Potential of fibroblasts to regulate the formation of three-dimensional vessel-like structures from endothelial cells in vitro. *American Journal of Physiology: Cell Physiology* 290: C1385-C1398.
- Kuwashima Y, Majima H, Okada S. 1988. Cure, cell killing, growth delay and fragmentation of X-irradiated human melanoma HMV-I multicellular spheroids. *International Journal of Radiation Biology* 54: 91-104.
- Kuwashima Y, Yamada T, Saio M, Takami T. 1993. Formation and growth of multicellular spheroids in media containing low concentrations of agarose. *Cancer Letters* 71: 31-33.
- Kwok CS, Cole SE, Liao SK. 1988. Uptake kinetics of monoclonal antibodies by human malignant melanoma multicell spheroids. *Cancer Research* 48: 1856-1863.
- Kwok CS, Crivici A, MacGregor WD, Unger MW. 1989. Optimization of radioimmunotherapy using human malignant melanoma multicell spheroids as a model. *Cancer Research* 49: 3276-3281.
- Kwok TT, Sutherland RM. 1991. The influence of cell-cell contact on radiosensitivity of human squamous carcinoma cells. *Radiation Research* 126: 52-57.
- LAIRD AK. 1964. Dynamics in tumor growth. *British Journal of Cancer* 13: 490-502.
- Lambert B, De RL, De VF, Slegers G, De G, V, Van de WC, Thierens H. 2006. Assessment of supra-additive effects of cytotoxic drugs and low dose rate irradiation in an in vitro model for hepatocellular carcinoma. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 84: 1021-1028.
- Lambert B, De RL, Slegers G, De G, V, Dierckx RA, Thierens H. 2004. Screening for supra-additive effects of cytotoxic drugs and gamma irradiation in an in vitro model for hepatocellular carcinoma. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 82: 146-152.
- Lange CS, Djordjevic B, Brock WA. 1992. The hybrid spheroid clonogenic assay for the intrinsic radio- and chemo-sensitivities of human tumors. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 24: 511-517.
- Langmuir VK, McGann JK, Buchegger F, Sutherland RM. 1989. ¹³¹I-anticarcinoembryonic antigen therapy of LS174T human colon adenocarcinoma spheroids. *Cancer Research* 49: 3401-3406.

- LaRue H, Parent-Vaugeois C, Bergeron A, Champetier S, Fradet Y. 1997. Influence of spatial configuration on the expression of carcinoembryonic antigen and mucin antigens in human bladder cancer. *International Journal of Cancer* 71: 986-992.
- LaRue KE, Khalil M, Freyer JP. 2004. Microenvironmental regulation of proliferation in multicellular spheroids is mediated through differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Cancer Research* 64: 1621-1631.
- Lee GY, Kenny PA, Lee EH, Bissell MJ. 2007. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nature Methods* 4: 359-365.
- Lees RK, Sordat B, MacDonald HR. 1981. Multicellular tumor spheroids of human colon carcinoma origin. Kinetic analysis of infiltration and *in situ* destruction in a xenogeneic (murine) host. *Experimental Cell Biology* 49: 207-219.
- Legallais C, David B, Dore E. 2001. Bioartificial livers (BAL): current technological aspects and future developments. *Journal of Membrane Science* 81: 95.
- Leon CJ, Gomez SM, Morantes SJ, Cordero CP, Aristizabal FA. 2006. [Sensitivity profile of a panel of cell lines designed for the evaluation of *in vitro* cytotoxicity]. *Biomedica* 26: 161-168.
- Lieubeau-Teillet B, Rak J, Jothy S, Iliopoulos O, Kaelin W, Kerbel RS. 1998. von Hippel-Lindau gene-mediated growth suppression and induction of differentiation in renal cell carcinoma cells grown as multicellular tumor spheroids. *Cancer Research* 58: 4957-4962.
- Lin RZ, Chou LF, Chien CC, Chang HY. 2006. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and beta1-integrin. *Cell and Tissue Research* 324: 411-422.
- Lohr F, Wenz F, Haas S, Flentje M. 1995. Comparison of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) staining and BrdUrd-labelling index under different proliferative conditions *in vitro* by flow cytometry. *Cell Proliferation* 28: 93-104.
- Lottner C, Knuechel R, Bernhardt G, Brunner H. 2004. Distribution and subcellular localization of a water-soluble hematoporphyrin-platinum(II) complex in human bladder cancer cells. *Cancer Letters* 215: 167-177.
- Lowthers EL, Richard CL, Blay J. 2003. Differential sensitivity to short-chain ceramide analogues of human intestinal carcinoma cells grown in tumor spheroids versus monolayer culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 39: 340-342.
- Lund-Johansen M, Bjerkvig R, Rucklidge GJ. 1992. Tumor spheroids from monolayer culture, in *Spheroid Culture in Cancer Research* R Bjerkvig (ed). Boca Raton, USA: CRC Press. pp 4-18.
- Makhija S, Taylor DD, Gibb RK, Gercel-Taylor C. 1999. Taxol-induced bcl-2 phosphorylation in ovarian cancer cell monolayer and spheroids. *International Journal of Oncology* 14: 515-521.
- Mans DR, Grivicich I, Peters GJ, Schwartsmann G. 1999. Sequence-dependent growth inhibition and DNA damage formation by the irinotecan-5-fluorouracil combination in human colon carcinoma cell lines. *European Journal of Cancer* 35: 1851-1861.
- Martin A, Clynes M. 1993. Comparison of 5 microplate colorimetric assays for *in vitro* cytotoxicity testing and cell proliferation assays. *Cytotechnology* 11: 49-58.
- Martin A, Clynes M. 1991. Acid phosphatase: endpoint for *in vitro* toxicity tests. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 27A: 183-184.

- Martin C, Walker J, Rothnie A, Callaghan R. 2003. The expression of P-glycoprotein does influence the distribution of novel fluorescent compounds in solid tumour models. *British Journal of Cancer* 89: 1581-1589.
- Martiny-Baron G, Korff T, Schaffner F, Esser N, Eggstein S, Marme D, Augustin HG. 2004. Inhibition of tumor growth and angiogenesis by soluble EphB4. *Neoplasia* 6: 248-257.
- Marusic M, Bajzer Z, Vuk-Pavlovic S, Freyer JP. 1994. Tumor growth in vivo and as multicellular spheroids compared by mathematical models. *Bulletin of Mathematical Biology* 56: 617-631.
- Matsuura T. 2006. Bioreactors for 3-dimensional high-density culture of human cells. *Human Cell* 19: 11-16.
- Mazerska Z, Dziegielewski J, Konopa J. 2001. Enzymatic activation of a new antitumour drug, 5-diethylaminoethylamino-8-hydroxyimidazoacridinone, C-1311, observed after its intercalation into DNA. *Biochemical Pharmacology* 61: 685-694.
- McFadden R, Kwok CS. 1988. Mathematical model of simultaneous diffusion and binding of antitumor antibodies in multicellular human tumor spheroids. *Cancer Research* 48: 4032-4037.
- McLeod EJ, Beischer AD, Hill JS, Kaye AH. 1997. Multicellular tumor spheroids grown from pancreatic carcinoma cell lines: use as an orthotopic xenograft in athymic nude mice. *Pancreas* 14: 237-248.
- Mellor HR, Ferguson DJ, Callaghan R. 2005. A model of quiescent tumour microregions for evaluating multicellular resistance to chemotherapeutic drugs. *British Journal of Cancer* 93: 302-309.
- Mills L, Tellez C, Huang S, Baker C, McCarty M, Green L, Gudas JM, Feng X, Bar-Eli M. 2002. Fully human antibodies to MCAM/MUC18 inhibit tumor growth and metastasis of human melanoma. *Cancer Research* 62: 5106-5114.
- Monga M, Sausville EA. 2002. Developmental therapeutics program at the NCI: molecular target and drug discovery process. *Leukemia* 16: 520-526.
- Monzani E, Facchetti F, Galmozzi E, Corsini E, Benetti A, Cavazzin C, Gritti A, Piccinini A, Porro D, Santinami M, Invernici G, Parati E, Alessandri G, La Porta CA. 2007. Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential. *European Journal of Cancer* 43: 935-946.
- Morikawa K, Walker SM, Jessup JM, Fidler IJ. 1988. In vivo selection of highly metastatic cells from surgical specimens of different primary human colon carcinomas implanted into nude mice. *Cancer Research* 48: 1943-1948.
- Mueller-Klieser W. 2000. Tumor biology and experimental therapeutics. *Critical Reviews in Oncology / Hematology* 36: 123-139.
- Mueller-Klieser W. 1987. Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 113: 101-122.
- Mueller-Klieser W. 1997. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *American Journal of Physiology* 273: C1109-C1123.

- Muir CP, Adams MA, Graham CH. 2006. Nitric oxide attenuates resistance to doxorubicin in three-dimensional aggregates of human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 96: 169-176.
- Muller-Holzner E, Marth C, Zeimet AG, Hofstadter F, Daxenbichler G. 1996. Effects of sex- and glucocorticoid steroids on breast cancer cells grown as either multicellular tumor spheroids or monolayers. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 58: 13-19.
- Muralidhar RV, Jayachandran G, Singh P. 2001. Development of high-density cultivation systems by bioencapsulation. *Current Science* 81: 263-269.
- Nakamura K, Hanibuchi M, Yano S, Tanaka Y, Fujino I, Inoue M, Takezawa T, Shitara K, Sone S, Hanai N. 1999. Apoptosis induction of human lung cancer cell line in multicellular heterospheroids with humanized antiganglioside GM2 monoclonal antibody. *Cancer Research* 59: 5323-5330.
- Nakayama T. 1991. Effects of split dose irradiation on monolayer cells and multicellular tumor spheroid. *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* 51: 79-87.
- Nelson CM, Bissell MJ. 2005. Modeling dynamic reciprocity: engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation. *Semin Cancer Biol* 15: 342-352.
- Ng CE, Keng PC, Sutherland RM. 1987. Characterization of radiation sensitivity of human squamous carcinoma A431 cells. *British Journal of Cancer* 56: 301-307.
- Nicholson KM, Bibby MC, Phillips RM. 1997. Influence of drug exposure parameters on the activity of paclitaxel in multicellular spheroids. *European Journal of Cancer* 33: 1291-1298.
- Nishikawa K, Newman RA, Murray L, Khokhar AR, Rosenblum MG. 1990. Detection of cellular platinum using the monoclonal antibody 1C1. *Molecular biotherapy* 2: 235-241.
- Ochs RL, Fensterer J, Ohori NP, Wells A, Gabrin M, George LD, Kornblith P. 2003. Evidence for the isolation, growth, and characterization of malignant cells in primary cultures of human tumors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 39: 63-70.
- Offner FA, Bigalke I, Schiefer J, Wirtz HC, Klosterhalfen B, Feichtinger H, Kirkpatrick CJ. 1993. Interaction of human malignant melanoma tumor spheroids with endothelium and re-constituted basement membrane: modulation by RGDS. *International Journal of Cancer* 54: 506-512.
- Offner FA, Schiefer J, Wirtz HC, Bigalke I, Pavelka M, Hollweg G, Ensinger C, Klosterhalfen B, Mittermayer C, Kirkpatrick CJ. 1996. Tumour-cell-endothelial interactions: free radicals are mediators of melanoma-induced endothelial cell damage. *Virchows Arch* 428: 99-106.
- Offner FA, Wirtz HC, Schiefer J, Bigalke I, Klosterhalfen B, Bittinger F, Mittermayer C, Kirkpatrick CJ. 1992. Interaction of human malignant melanoma (ST-ML-12) tumor spheroids with endothelial cell monolayers. Damage to endothelium by oxygen-derived free radicals. *American Journal of Pathology* 141: 601-610.
- Olea N, Villalobos M, Ruiz de Almodovar JM, Pedraza V. 1992. MCF-7 breast cancer cells grown as multicellular spheroids in vitro: effect of 17 beta-estradiol. *International Journal of Cancer* 50: 112-117.
- Olive PL, Banath JP. 1997. Multicell spheroid response to drugs predicted with the comet assay. *Cancer Research* 57: 5528-5533.

- Olive PL, Durand RE. 1994. Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer and Metastasis Reviews* 13: 121-138.
- Olive PL, Vikse CM, Banath JP. 1996. Use of the comet assay to identify cells sensitive to tirapazamine in multicell spheroids and tumors in mice. *Cancer Research* 56: 4460-4463.
- Olumi A, Lam W, Banath JP, Olive PL. 2002. Identification of genes differentially expressed in V79 cells grown as multicell spheroids. *International Journal of Radiation Biology* 78: 483-492.
- Olumi A, MacPhail SH, Johnston PJ, Banath JP, Olive PL. 2000. Changes in subcellular distribution of topoisomerase IIalpha correlate with etoposide resistance in multicell spheroids and xenograft tumors. *Cancer Research* 60: 5747-5753.
- Olsnes C, Heimdal JH, Kross K, Olofsson J, Aarstad HJ. 2002. Mechanisms for monocyte activation in co-culture with autologous tumor spheroids. *Cell Immunologie* 219: 11-21.
- Olsnes C, Heimdal JH, Kross KW, Olofsson J, Aarstad HJ. 2005. Viable head and neck tumor spheroids stimulate in vitro autologous monocyte MCP-1 secretion through soluble substances and CD14/lectin-like receptors. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 262: 953-960.
- Orlandi P, Barbara C, Bocci G, Fioravanti A, Di PA, Del TM, Danesi R. 2005. Idarubicin and idarubicinol effects on breast cancer multicellular spheroids. *Journal of Chemotherapy* 17: 663-667.
- Ozkan A, Fiskin K. 2004. Epirubicin HCl toxicity in human-liver derived hepatoma G2 cells. *Polish Journal of Pharmacology* 56: 435-444.
- Padron JM, van der Wilt CL, Smid K, Smitskamp-Wilms E, Backus HH, Pizao PE, Giaccone G, Peters GJ. 2000. The multilayered postconfluent cell culture as a model for drug screening. *Critical Reviews in Oncology / Hematology* 36: 141-157.
- Parker BS, Cutts SM, Nudelman A, Rephaeli A, Phillips DR, Sukumar S. 2003. Mitoxantrone mediates demethylation and reexpression of cyclin d2, estrogen receptor and 14.3.3sigma in breast cancer cells. *Cancer Biology & Therapy* 2: 259-263.
- Parry RL, Chin TW, Epstein J, Hudson PL, Powell DM, Donahoe PK. 1992. Recombinant human mullerian inhibiting substance inhibits human ocular melanoma cell lines in vitro and in vivo. *Cancer Research* 52: 1182-1186.
- Pelkonen O, Boobis AR, Gundert-Remy U. 2001. In vitro prediction of gastrointestinal absorption and bioavailability: an experts' meeting report. *European Journal of Clinical Pharmacology* 57: 621-629.
- Pereira DA, Williams JA. 2007. Origin and evolution of high throughput screening. *British Journal of Pharmacology* 152: 53-61.
- Persaud R, Zhou H, Baker SE, Hei TK, Hall EJ. 2005. Assessment of low linear energy transfer radiation-induced bystander mutagenesis in a three-dimensional culture model. *Cancer Research* 65: 9876-9882.
- Pervez S, Kirkland SC, Epenetos AA, Mooi WJ, Evans DJ, Krausz T. 1989. Effect of polarity and differentiation on antibody localization in multicellular tumour spheroid and xenograft models and its potential importance for in vivo immunotargeting. *International Journal of Cancer* 44: 940-947.

- Pizao PE, Winograd B, Peters GJ, Leyva A, Giaccone G, Pinedo HM. 1992. In vitro chemosensitivity testing of multilayered microcultures. *Anticancer Res* 12: 1319-1322.
- Poindessous V, Koeppel F, Raymond E, Cvitkovic E, Waters SJ, Larsen AK. 2003. Enhanced antitumor activity of irofulven in combination with 5-fluorouracil and cisplatin in human colon and ovarian carcinoma cells. *International Journal of Oncology* 23: 1347-1355.
- Porwol T, Merten E, Opitz N, Acker H. 1996. Three-dimensional imaging of rhodamine 123 fluorescence distribution in human melanoma cells by means of confocal laser scanning microscopy. *Acta Anat (Basel)* 157: 116-125.
- Pourreau-Schneider N, Berthois Y, Mittra H, Charpin C, Jacquemier J, Martin PM. 1984. Estrogen response of MCF-7 cells grown on diverse substrates and in suspension culture: promotion of morphological heterogeneity, modulation of progestin receptor induction; cell-substrate interactions on collagen gels. *Journal of Steroid Biochemistry* 21: 763-771.
- Rae JM, Ramus SJ, Waltham M, Armes JE, Campbell IG, Clarke R, Barndt RJ, Johnson MD, Thompson EW. 2004. Common origins of MDA-MB-435 cells from various sources with those shown to have melanoma properties. *Clinical and Experimental Metastasis* 21: 543-552.
- Rieber M, Rieber MS. 2006. Signalling responses linked to betulinic acid-induced apoptosis are antagonized by MEK inhibitor U0126 in adherent or 3D spheroid melanoma irrespective of p53 status. *International Journal of Cancer* 118: 1135-1143.
- Rofstad EK, Eide K, Skoyum R, Hystad ME, Lyng H. 1996. Apoptosis, energy metabolism, and fraction of radiobiologically hypoxic cells: a study of human melanoma multicellular spheroids. *International Journal of Radiation Biology* 70: 241-249.
- Ronen SM, Stier A, Degani H. 1990. NMR studies of the lipid metabolism of T47D human breast cancer spheroids. *FEBS Letters* 266: 147-149.
- Roschke AV, Lababidi S, Tonon G, Gehlhaus KS, Bussey K, Weinstein JN, Kirsch IR. 2005. Karyotypic "state" as a potential determinant for anticancer drug discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 102: 2964-2969.
- Sacks PG, Oke V, Vasey T, Lotan R. 1989. Retinoic acid inhibition of a head and neck multicellular tumor spheroid model. *Head Neck* 11: 219-225.
- Santini MT, Rainaldi G. 1999. Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology* 67: 148-157.
- Sausville EA. 2000. Overview. Cancer drug discovery: pathway promise or covalent certainty for drug effect--quo vadis? *Current Opinion in Investigational Drugs* 1: 511-513.
- Scholzen T, Gerdes J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182: 311-322.
- Schuster U, Buttner R, Hofstadter F, Knuchel R. 1994. A heterologous in vitro coculture system to study interaction between human bladder cancer cells and fibroblasts. *Journal of Urology* 151: 1707-1711.
- Schwachofer JH, Crooijmans RP, Hoogenhout J, Jerusalem CR, Kal HB, Theeuwes AG. 1990. Radiosensitivity of human melanoma spheroids influenced by growth rate. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 19: 1191-1197.

- Schwachofer JH, Crooijmans RP, Hoogenhout J, Kal HB, Theeuwes AG. 1991. Sublethal damage repair in two radioresistant human tumor cell lines irradiated as multicellular spheroids. *Tumour biology* 12: 207-216.
- Schwachofer JH, Crooijmans RP, van GJ, Hoogenhout J, Jerusalem CR, Kal HB. 1989. Sublethal damage repair and radiosensitivity of human squamous cell carcinoma cells grown with different culture techniques. *British Journal of Radiology* 62: 1084-1088.
- Seidl P, Huettinger R, Knuechel R, Kunz-Schughart LA. 2002. Three-dimensional fibroblast-tumor cell interaction causes downregulation of RACK1 mRNA expression in breast cancer cells in vitro. *International Journal of Cancer* 102: 129-136.
- Selden C, Khalil M, Hodgson H. 2000. Three dimensional culture upregulates extracellular matrix protein expression in human liver cell lines--a step towards mimicking the liver in vivo? *International Journal of Artificial Organs* 23: 774-781.
- Serova M, Galmarini CM, Ghoul A, Benhadji K, Green SR, Chiao J, Faivre S, Cvitkovic E, Le TC, Calvo F, Raymond E. 2007. Antiproliferative effects of sapacitabine (CYC682), a novel 2'-deoxycytidine-derivative, in human cancer cells. *British Journal of Cancer* 97: 628-636.
- Serpe L, Catalano MG, Cavalli R, Ugazio E, Bosco O, Canaparo R, Muntoni E, Frairia R, Gasco MR, Eandi M, Zara GP. 2004. Cytotoxicity of anticancer drugs incorporated in solid lipid nanoparticles on HT-29 colorectal cancer cell line. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58: 673-680.
- Shellman YG, Park YL, Marr DG, Casper K, Xu Y, Fujita M, Swerlick R, Norris DA. 2003. Release of vascular endothelial growth factor from a human melanoma cell line, WM35, is induced by hypoxia but not ultraviolet radiation and is potentiated by activated Ras mutation. *Journal of Investigative Dermatology* 121: 910-917.
- Si F, Shin SH, Biedermann A, Ross GM. 1999. Estimation of PC12 cell numbers with acid phosphatase assay and mitochondrial dehydrogenase assay: dopamine interferes with assay based on tetrazolium. *Experimental Brain Research* 124: 145-150.
- Siegert A, Denkert C, Leclere A, Hauptmann S. 1999. Suppression of the reactive oxygen intermediates production of human macrophages by colorectal adenocarcinoma cell lines. *Immunology* 98: 551-556.
- Silzle T, Kreutz M, Dobler MA, Brockhoff G, Knuechel R, Kunz-Schughart LA. 2003. Tumor-associated fibroblasts recruit blood monocytes into tumor tissue. *European Journal of Immunology* 33: 1311-1320.
- Simiantonaki N, Jayasinghe C, Kirkpatrick CJ. 2002. Differential endothelial CAM-expression after stimulation with supernatants of LPS- and cytokine-stimulated HT-29 and ST-ML-12 tumor cells growing as monolayer cultures and multicellular spheroids. *Anticancer Research* 22: 2641-2649.
- Skladanowski A, Plisov SY, Konopa J, Larsen AK. 1996. Inhibition of DNA topoisomerase II by imidazoacridinones, new antineoplastic agents with strong activity against solid tumors. *Molecular Pharmacology* 49: 772-780.
- Sommers GM, Alfieri AA. 1998. Multimodality therapy: radiation and continuous concomitant cis-platinum and PKC inhibition in a cervical carcinoma model. *Cancer Investigation* 16: 462-470.

- Song H, David O, Clejan S, Giordano CL, Pappas-Lebeau H, Xu L, O'Connor KC. 2004. Spatial composition of prostate cancer spheroids in mixed and static cultures. *Tissue Engineering* 10: 1266-1276.
- Sonoda T, Kobayashi H, Kaku T, Hirakawa T, Nakano H. 2003. Expression of angiogenesis factors in monolayer culture, multicellular spheroid and in vivo transplanted tumor by human ovarian cancer cell lines. *Cancer Letters* 196: 229-237.
- Soranzo C, Della TG, Ingrosso A. 1986. Formation, growth and morphology of multicellular tumor spheroids from a human colon carcinoma cell line (LoVo). *Tumori* 72: 459-467.
- Soranzo C, Ingrosso A. 1988. A comparative study of the effects of anthracycline derivatives on a human adenocarcinoma cell line (LoVo) grown as a monolayer and as spheroids. *Anti-cancer Research* 8: 369-373.
- Spoettl T, Hausmann M, Herlyn M, Gunckel M, Dirmeier A, Falk W, Herfarth H, Schoelmerich J, Rogler G. 2006. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) inhibits the intestinal-like differentiation of monocytes. *Clinical & Experimental Immunology* 145: 190-199.
- Spoettl T, Hausmann M, Menzel K, Piberger H, Herfarth H, Schoelmerich J, Bataille F, Rogler G. 2007. Role of soluble factors and three-dimensional culture in in vitro differentiation of intestinal macrophages. *World Journal of Gastroenterology* 13: 1032-1041.
- Strasberg RM, Anzellotti A, Sanchez-Delgado RA, Rieber M. 2004. Tumor apoptosis induced by ruthenium(II)-ketoconazole is enhanced in nonsusceptible carcinoma by monoclonal antibody to EGF receptor. *International Journal of Cancer* 112: 376-384.
- Sturgis EM, Sacks PG, Masui H, Mendelsohn J, Schantz SP. 1994. Effects of antiepidermal growth factor receptor antibody 528 on the proliferation and differentiation of head and neck cancer. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 111: 633-643.
- Stuschke M, Budach V, Budach W, Feldmann HJ, Sack H. 1992. Radioresponsiveness, sub-lethal damage repair and stem cell rate in spheroids from three human tumor lines: comparison with xenograft data. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 24: 119-126.
- Stuschke M, Budach V, Stuben G, Streffer C, Sack H. 1995. Heterogeneity in the fractionation sensitivities of human tumor cell lines: studies in a three-dimensional model system. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 32: 395-408.
- Sutherland RM. 1988. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 240: 177-184.
- Sutherland RM, Inch WR, McCredie JA. 1971a. Phytohemagglutinin (PHA)-induced transformation of lymphocytes from patients with cancer. *Cancer* 27: 574-578.
- Sutherland RM, Inch WR, McCredie JA, Kruuv J. 1970. A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine* 18: 491-495.
- Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR. 1971b. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute* 46: 113-120.
- Sutherland RM, Sordat B, Bamat J, Gabbert H, Bourrat B, Mueller-Klieser W. 1986. Oxygenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma. *Cancer Research* 46: 5320-5329.

- Sutton JE, Roos IA, Hillcoat BL. 1982. Combined actions of 5-fluorouracil and 1-(2-chloroethyl)-3-(4-methylcyclohexyl)-1-nitrosourea on human colonic carcinoma cells in vitro. *Cancer Research* 42: 5172-5175.
- Tabatabai M, Williams DK, Bursac Z. 2005. Hyperbolastic growth models: theory and application. *Theoretical Biology and Medical Modelling* 2: 14-15.
- Talts U, Kuhn U, Roos G, Rauch U. 2000. Modulation of extracellular matrix adhesiveness by neurocan and identification of its molecular basis. *Experimental Cell Research* 259: 378-388.
- Tannock IF, Kopelyan I. 1986. Influence of glucose concentration on growth and formation of necrosis in spheroids derived from a human bladder cancer cell line. *Cancer Research* 46: 3105-3110.
- Tarasov SG, Casas-Finet JR, Cholody WM, Kosakowska-Cholody T, Gryczynski ZK, Michejda CJ. 2003. Bisimidazoacridones: 2. Steady-state and time-resolved fluorescence studies of their diverse interactions with DNA. *Photochemistry and Photobiology* 78: 313-322.
- Teutsch HF, Goellner A, Mueller-Klieser W. 1995. Glucose levels and succinate and lactate dehydrogenase activity in EMT6/Ro tumor spheroids. *European Journal of Cell Biology* 66: 302-307.
- Thielecke H, Mack A, Robitzki A. 2001b. Biohybrid microarrays--impedimetric biosensors with 3D in vitro tissues for toxicological and biomedical screening. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 369: 23-29.
- Thielecke H, Mack A, Robitzki A. 2001a. A multicellular spheroid-based sensor for anti-cancer therapeutics. *Biosensors and Bioelectronics* 16: 261-269.
- Thomsen LL, Baguley BC, Wilson WR. 1992. Nitric oxide: its production in host-cell-infiltrated EMT6 spheroids and its role in tumour cell killing by flavone-8-acetic acid and 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 31: 151-155.
- Timmins NE, Dietmair S, Nielsen LK. 2004. Hanging-drop multicellular spheroids as a model of tumour angiogenesis. *Angiogenesis* 7: 97-103.
- Tofilon PJ, Arundel CM, Deen DF. 1987. Response to BCNU of spheroids grown from mixtures of drug-sensitive and drug-resistant cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 20: 89-95.
- Tonary AM, Pezacki JP. 2006. Simultaneous quantitative measurement of luciferase reporter activity and cell number in two- and three-dimensional cultures of hepatitis C virus replicons. *Analytical Biochemistry* 350: 239-248.
- Tong JZ, De Lagausie P, Furlan V, Cresteil T, Bernard O, Alvarez F. 1992. Long-term culture of adult rat hepatocyte spheroids. *Experimental Cell Research* 200: 326-332.
- Torisawa YS, Takagi A, Shiku H, Yasukawa T, Matsue T. 2005. A multicellular spheroid-based drug sensitivity test by scanning electrochemical microscopy. *Oncology Reports* 13: 1107-1112.
- Trivedi S, Dekermendjian K, Julien R, Huang J, Lund PE, Krupp J, Kronqvist R, Larsson O, Bostwick R. 2008. Cellular HTS assays for pharmacological characterization of Na(V)1.7 modulators. *Assay and Drug Development Technologies* 6: 167-179.
- Turpin JA, Buckheit RW, Jr., Derse D, Hollingshead M, Williamson K, Palamone C, Osterling MC, Hill SA, Graham L, Schaeffer CA, Bu M, Huang M, Cholody WM, Michejda CJ, Rice

- WG. 1998. Inhibition of acute-, latent-, and chronic-phase human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by a bistriazoloacridone analog that selectively inhibits HIV-1 transcription. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42: 487-494.
- Vamvakidou AP, Mondrinos MJ, Petushi SP, Garcia FU, Lelkes PI, Tozeren A. 2007. Heterogeneous breast tumoroids: An in vitro assay for investigating cellular heterogeneity and drug delivery. *Journal of Biomolecular Screening* 12: 13-20.
- Vermeulen S, Van M, V, Van HL, Van RF, Bracke M, Mareel M. 1996. Regulation of the invasion suppressor function of the cadherin/catenin complex. *Pathology, Research and Practice* 192: 694-707.
- Vermeulen SJ, Chen TR, Speleman F, Nollet F, Van Roy FM, Mareel MM. 1998. Did the four human cancer cell lines DLD-1, HCT-15, HCT-8, and HRT-18 originate from one and the same patient? *Cancer Genetics and Cytogenetics* 107: 76-79.
- Walenta S, Dotsch J, Mueller-Klieser W. 1990. ATP concentrations in multicellular tumor spheroids assessed by single photon imaging and quantitative bioluminescence. *European Journal of Cell Biology* 52: 389-393.
- Walker J, Martin C, Callaghan R. 2004. Inhibition of P-glycoprotein function by XR9576 in a solid tumour model can restore anticancer drug efficacy. *European Journal of Cancer* 40: 594-605.
- Wartenberg M, Donmez F, Ling FC, Acker H, Hescheler J, Sauer H. 2001. Tumor-induced angiogenesis studied in confrontation cultures of multicellular tumor spheroids and embryoid bodies grown from pluripotent embryonic stem cells. *FASEB Journal* 15: 995-1005.
- Wartenberg M, Finkensieper A, Hescheler J, Sauer H. 2006. Confrontation cultures of embryonic stem cells with multicellular tumor spheroids to study tumor-induced angiogenesis. *Methods Mol Biol* 331: 313-328.
- Wartenberg M, Fischer K, Hescheler J, Sauer H. 2002. Modulation of intrinsic P-glycoprotein expression in multicellular prostate tumor spheroids by cell cycle inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta* 1589: 49-62.
- Wartenberg M, Schallenberg M, Hescheler J, Sauer H. 2003. Reactive oxygen species-mediated regulation of eNOS and iNOS expression in multicellular prostate tumor spheroids. *International Journal of Cancer* 104: 274-282.
- Wenning LA, Murphy RM. 1999. Coupled cellular trafficking and diffusional limitations in delivery of immunotoxins to multicell tumor spheroids. *Biotechnology and Bioengineering* 62: 562-575.
- Winters BS, Raj BK, Robinson EE, Foty RA, Corbett SA. 2006. Three-dimensional culture regulates Raf-1 expression to modulate fibronectin matrix assembly. *Molecular Biology of the Cell* 17: 3386-3396.
- Yang TT, Sinai P, Kain SR. 1996. An acid phosphatase assay for quantifying the growth of adherent and nonadherent cells. *Analytical Biochemistry* 241: 103-108.
- Yoshida D, Watanabe K, Noha M, Takahashi H, Teramoto A, Sugisaki Y. 2002. Tracking cell invasion of human glioma cells and suppression by anti-matrix metalloproteinase agent in rodent brain-slice model. *Brain Tumor Pathology* 19: 69-76.

Yoshida D, Watanabe K, Noha M, Takahashi H, Teramoto A, Sugisaki Y. 2003. Anti-invasive effect of an anti-matrix metalloproteinase agent in a murine brain slice model using the serial monitoring of green fluorescent protein-labeled glioma cells. *Neurosurgery* 52: 187-196.

Yu CW, Li KK, Pang SK, Au-Yeung SC, Ho YP. 2006. Anticancer activity of a series of platinum complexes integrating demethylcantharidin with isomers of 1,2-diaminocyclohexane. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 16: 1686-1691.

Yuhas JM, Blake S, Weichselbaum RR. 1984. Quantitation of the response of human tumor spheroids to daily radiation exposures. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 10: 2323-2327.

Zaffaroni N, De MC, Villa R, Riboldi S, Daidone MG, Double JA. 2001. Cell growth inhibition, G2M cell cycle arrest and apoptosis induced by the imidazoacridinone C1311 in human tumour cell lines. *European Journal of Cancer* 37: 1953-1962.

Zhang LH, Wu L, Raymon HK, Chen RS, Corral L, Shirley MA, Narla RK, Gamez J, Muller GW, Stirling DI, Bartlett JB, Schafer PH, Payvandi F. 2006. The synthetic compound CC-5079 is a potent inhibitor of tubulin polymerization and tumor necrosis factor-alpha production with antitumor activity. *Cancer Research* 66: 951-959.

Zhang X, Wang W, Yu W, Xie Y, Zhang X, Zhang Y, Ma X. 2005. Development of an in vitro multicellular tumor spheroid model using microencapsulation and its application in anticancer drug screening and testing. *Biotechnology Progress* 21: 1289-1296.

Zimmermann S, Zarse K, Schulz TJ, Siems K, Muller-Kuhrt L, Birringer M, Ristow M. 2008. A cell-based high-throughput assay system reveals modulation of oxidative and nonoxidative glucose metabolism due to commonly used organic solvents. *Hormone and metabolic research* 40: 29-37.

VII. Anhang

1. Arbeitsprotokoll Sphäroidhistologie

Zur histologischen Darstellung von Sphäroiden wurde ein Hämatoxylin-Gegenfärbung nach Harris anhand des folgenden Protokolls durchgeführt:

- Anzucht von Sphäroiden in Standardmedium (siehe II.2.2)
- Sammeln der Sphäroide mit einer Pasteurpipette in ein 15 ml Polypropylenröhrchen
- Abnahme des Überstandes und Waschen mit 2 ml PBS
- Abnahme des Überstandes und Zugabe von 5 ml Formafix (10% in PBS)
- Inkubation bei RT für 30 min
- Zugabe von 20 µl Hämatoxylin-Lösung (Merck)
- Inkubation bei RT für 5 min
- Abnahme des Überstandes und Waschen mit 2 ml Formafix (10% in PBS)
- Überführen der Sphäroid auf Filterpapier (Engelbrecht) und
- Eideckeln der gefalteten Filterpapierschiffchen in Einbettkassetten (Engelbrecht)
- Inkubation in Formalinbad (10% Formafix in PBS) bei RT für 48 h
- Einbettung der Sphäroide in flüssiges Paraffin (60°C) mit Hilfe des Hypercenter XP Enclosed Tissue Processor (Shandon)
- Ausgießen einzelner Paraffinblöcke an einem Histocentre 2 (Shandon)
- Schneiden der Sphäroide in den Paraffinblöcken mit Hilfe des Mikrotom HM 350 (Mikrom)
- Aufziehen einzelner Serienschnitte auf Millipore-benetzte Klarsichtobjektträger
- Trocknen der Objektträger auf einer Wärmeplatte bei 37°C für 3 h
- Inkubation für 60 sec in Hämatoxylin-Lösung (Merck)
- Inkubation für 5 min in heißem Leitungswasser
- Inkubation für 15 sec in Eosin-Lösung (Merck)
- Inkubation für 2x2 min in Ethanol (70% (v/v))
- Inkubation für 2x2 min in Ethanol (96% (v/v))
- Inkubation für 2x4 min in Propanol (100% (v/v))
- Inkubation der Schnittpräparate für 2x4 min in Xylol (Merck)
- Aufnahme der Schnittpräparate mit Hilfe des Axiovert 200 Inversmikroskop (Zeiss)

2. Arbeitsprotokoll Anti-BrdU-Färbung

Die Untersuchung des Bromodeoxyuridin (BrdU)-Einbaus in die DNA von Zellen, die als Sphäroidkultur gezüchtet und mit Mitomycin C behandelt wurden wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Anzucht von Sphäroiden in Standardmedium (siehe II.2.2)
- Behandlung mit Mitomycin C (siehe II.3.4.2)
- Abnahme von 100 µl Überstand je Well
- simultane Zugabe von 20 µmol/l BrdU und 10 mol/l Desoxycytin (dC) in 100 µl Standardmedium
- Inkubation unter Standardbedingungen für 30 min
- Abnahme des Überstandes soweit möglich
- 3x Waschen mit je 200 µl Standardmedium
- Inkubation unter Standardbedingungen für 8 h
- Sammeln der Sphäroide mit einer Pasteurpipette in ein 15 ml Polypropylenröhrchen
- enzymatische Dissoziation der Sphäroide (siehe II.3.2)
- Fixierung der Einzelzellsuspension in 2 ml eiskaltem Methanol (70% (v/v))
(Lagerung bei 4°C)
- Zentrifugation der Zellen bei 450 x g für 5 min
- Abnahme des Überstandes
- 2x Waschen mit 2 ml PBS
- Zugabe von 1mg/ml Ribonuclease A
- Inkubation bei 37°C im Wasserbad für 20 min
- Zentrifugation bei 450 x g für 5 min
- Abnahme des Überstandes
- Resuspendieren der Zellen in 2 ml PBS, 0,01 N HCl und 5 mg/ml Pepsin
- Inkubation bei 37°C im Wasserbad für 5 min
- Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 8 ml eiskaltem PBS
- Zentrifugation der Zellen bei 450 x g für 5 min
- Abnahme des Überstandes
- Waschen mit 2 ml PBS
- Zugabe von 2 ml 2 N HCl (in PBS)
- Inkubation bei 37°C im Wasserbad für 10 min
- Zentrifugation der Zellen bei 450 x g für 5 min
- Abnahme des Überstandes
- Waschen mit 10 ml PBS
- Zugabe von 10 µg/ml Anti-BrdU-Antikörper (Stammlösung 556 mg/l)

- Inkubation bei RT für 30 min
- Zentrifugation der Zellen bei 450 x g für 5 min
- Abnahme des Überstandes
- Waschen mit 10 ml PBS
- Zugabe von 20 µg/ml „Rabbit-anti-Mouse“-FITC Sekundärantikörper (Stammlösung 400 mg/l)
- Inkubation für 30 min bei RT
- Zentrifugation der Zellen bei 450 x g für 5 min
- Abnahme des Überstandes
- Zugabe von 2,5 µg/ml Propidiumiodid (Dako; Stammlösung 1 mg/ml)
- Messung am Durchflusszytometer

3. Arbeitsprotokoll Ki-67-Färbung

Das nachfolgende Protokoll diente der Bestimmung der Wachstumsfraktionen Mitomycin C-behandelter Sphäroide. MCTS-Schnittpräparate wurden dabei einer Doppelfärbung mit einem Ki-67-Antikörper (Dako, Klon: MIB-1) und Hämatoxylin unterzogen:

- Anzucht von Sphäroiden in Standardmedium (siehe II.2.2)
- Behandlung mit Mitomycin C (siehe II.3.4.2)
- Vorbereiten der MCTS-Schnittpräparate (siehe II.3.3)
- Inkubation der Schnittpräparate für 2x5 min in Xylol
- Inkubation für 2x3 min in Propanol (100% (v/v))
- Inkubation für 2x3 min in Ethanol (95% (v/v))
- Inkubation für 2x3 min in Ethanol (80% (v/v))
- 10x Waschen in H₂O dest.
- Waschen der Präparate mit Waschlösung (Ventana)
- Beladen des NexES® IHC Systems
- manuelle Zugabe von 100 µl Inhibitorlösung (Ventana) je Schnittpräparat
- Inkubation bei 37°C für 4 min, anschließend Waschen mit Waschlösung
- Färbung mit Hilfe des Ventana Medical Systems Basic DAB Detection Kits laut automatisiertem Protokoll für das NexES® IHC System
- manuelle Zugabe von 100 µl Ki-67-Antikörperlösung (Stammlösung 50 mg/l) je Objekträger
- Inkubation bei 37°C für 24 , anschließend Waschen mit Waschlösung
- Zugabe von 100 µl des biotinylierten Sekundärantikörpers (Ventana)
- Inkubation bei 37°C für 8 min, anschließend Waschen mit Waschlösung
- Zugabe von 100 µl des Avidin-HRPO-Konjugates (Ventana)
- Inkubation bei 37°C für 8 min, anschließend Waschen mit Waschlösung
- Zeitgleiche Zugabe von 100 µl DAB-Lösung und 100 µl Wasserstoffperoxidlösung (Ventana)
- Inkubation bei 37°C für 8 min, anschließend Waschen mit Waschlösung
- Zugabe von 100 µl Kupfersulfatlösung (Ventana)
- Inkubation bei 37°C für 4 min, anschließend Waschen mit Waschlösung
- Gegenfärbung mit Hämatoxylin (siehe II.3.3)
- Aufnahme der Schnittpräparate mit Hilfe des Axiovert 200 Inversmikroskop (Zeiss)

4. Arbeitsprotokoll Affy-Chip Labelling

Das in der vorliegende Arbeit durchgeführte Affy-Chip Labelling zur Analyse der Genexpressionsmuster in verschiedenen Monolayer- und Sphäroid-Kulturen erfolgte nach Vorgaben des „Affy-Chip RNA Labelling and Hybridization Protocols“ von Avalon Pharmaceuticals Inc. und war in folgende Arbeitschritte unterteilt:

a) GeneChip HT One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix)

- Isolierung der RNA (siehe II.6.1)
- Vorlegen von 0,5 - 1,0 µg der isolierten RNA je Well einer 96-Well PCR Platte auf Eis
- Einstellen des finalen Volumens jedes Wells mit RNase-freiem Wasser (RNeasy Kit, Qiagen) auf 5 µl
- (Eintrocken der Proben mit einer Ausgangskonzentration > 0,5 - 1,0 µg/5 µl mit Hilfe eines Speed Vacuum Trockners und in 10 µl RNase-freiem Wasser resuspendieren)
- Zugabe von 5 µl 1x T7 Oligo(dT) Primer je Well und vorsichtiges Mischen (Gesamtvolumen 10 µl)
- Inkubation im PCR Thermo Cycler (70°C für 10 Minuten, dann 4°C für 5 Minuten)
- Lagerung der Proben auf Eis
- Vorbereiten des „1st strand cDNA Synthesis Mix“:

	für 96 Reaktionen
5x 1 st Strand Reaction Mix	456,0 µl
DTT (0,1M)	228,0 µl
DNTP Mix (10 mM)	114,0 µl
SuperScript II	114,0 µl
Nuklease-freies Wasser	228,0 µl
Endvolumen	1140,0 µl

- Zugabe von 10 µl „1st strand cDNA Synthesis Mix“ je Well und vorsichtiges Mischen (Gesamtvolumen 10 µl)
- Inkubation im PCR Thermo Cycler (42°C für 60 Minuten, dann 4°C für 5 Minuten)
- Lagerung der Proben auf Eis
- Vorbereiten des „2nd strand cDNA Synthesis Mix“:

	für 96 Reaktionen
5x 2 nd Strand Reaction Mix	3240,0 µl
DNTP Mix (10 mM)	324,0 µl
<i>E.coli</i> DNA Ligase (10 U/µl)	108,0 µl
<i>E.coli</i> DNA Polymerase I (10 U/µl), SuperScript II	432,0 µl
RnaseH (2 U/µl)	108,0 µl
Endvolumen	4212,0 µl

- Zugabe von 39 µl „2nd strand cDNA Synthesis Mix“ je Well
- Zugabe von 91 µl destilliertes Wasser je Well und vorsichtiges Mischen (Gesamtvolumen 150 µl)
- Inkubation im PCR Thermo Cycler (16°C für 120 Minuten, dann 4°C für 5 Minuten bzw. ÜN)
- Vorbereiten des „T4 mix“ je well:

	für 96 Reaktionen
T4 DNA Polymerase	236,0 µl
1x T4 DNA Polymerase Puffer	236,0 µl
Endvolumen	472,0 µl

- Zugabe von 4 µl „T4 mix“ je Well und vorsichtiges Mischen
- Inkubation im PCR Thermo Cycler (16°C für 10 Minuten, 72°C für 10 Minuten, dann 4°C für 5 Minuten)
- Lagerung der Proben bei 4°C

b) Qiaquick 96-well Kit (Qiagen)

- Aufreinigung der cDNA laut Protokoll des Herstellers
- Elution der gereinigten doppelsträngigen cDNA in 70 µl dest. H₂O
- Eintrocken der Proben mit Hilfe eines Speed Vacuum Trockners
- Resuspendieren in 25 µl RNase-freiem Wasser

c) GeneChip HT IVT Labelling Kit (Affymetrix)

- Vorbereiten des „IVT Master Mix“:

	für 96 Reaktionen
5x IVT Puffer	672,0 µl
IVT Labelling NTP Mix	2016,0 µl
IVT Labelling Enzyme Mix	672,0 µl
T7 RNA Polymerase	112,0 µl
Nuklease-freies Wasser	784,0 µl
Endvolumen	4256,0 µl

- Transfer von 22 µl cDNA je Well einer neuen 96-Well PCR Platte
- Zugabe von 38 µl „IVT Master Mix“ und vorsichtiges Mischen (Gesamtvolumen 60 µl)
- Inkubation bei 37°C ÜN

c) Aufreinigung und Fragmentierung Biotin-gelabelter cRNA

- Einsatz eines modifizierten Protokolls des RNeasy Kits (Qiagen)
- Überführen der Proben (60 µl) in je 1 Well einer 96-Deep-Well-Platte
- Zugabe von 350 µl Lysepuffer (LNS) und 250 µl Ethanol (100% (v/v)) und vorsichtiges Mischen
- Transfer der Proben in RNeasy Reaktionsgefäß
- Eluation der gereinigten cRNA in 70 µl dest. H₂O
- Transfer von 40 µl je Probe auf eine neue 96-Well-Microtiterplatte
- Qualitätskontrolle durch Konzentrationsbestimmung der gereinigten cRNA mit Hilfe eines Absorptionsmessgerätes (Microplate Reader)
- Einstellen der finalen Konzentration jeder Probe mit dest. H₂O auf 0,2 µg/µl
- Transfer von 40 µl je eingestellter Probe auf eine neue 96-Well PCR Platte
- Zugabe von 7 µl Fragmentationspuffer je Well
- Inkubation im PCR Thermo Cycler (95°C für 35 Minuten)

d) Hybridisierung

- Vorbereiten der benötigen Puffer:

12x MES (pH 6,5-6,7; sterilfiltriert (0,2 µm))

	Endvolumen 1000 ml
MES Hydrat	64,6 g
MES Natriumsalz	193,3 g
RNase-freies Wasser	~ 800,0 ml

1,6x Hyb Puffer

	für 96 Reaktionen
12x MES	1970,6 µl
TMAC (5M)	12016,0 µl
EDTA Dinatriumsalz (0,5M)	961,3 µl
Tween 10%	24,0 µl
Endvolumen	15000,0 µl

Pre-Hyb Puffer

	für 96 Reaktionen
Hering Sperm DNA (10mg/ml)	105,6 µl
Bovine Serum Albumine (BSA), acetyliert (50mg/ml)	105,6 µl
1,6x Hyb Puffer	6600,0 µl
Wasser	3748,8 µl
Endvolumen	10560,0 µl

Hybridisierungspuffer

	für 96 Reaktionen
20x bio-B, -C, -D	347,9 µl
Kontroll-Oligo B2 (3nM)	190,1 µl
Hering Sperm DNA (10mg/ml)	111,5 µl
Bovine Serum Albumine (BSA), acetyliert (50mg/ml)	111,5 µl
1,6x Hyb Puffer	7296,0 µl
Endvolumen	8064,0 µl

- Zugabe von 70 µl Pre-Hyb Puffer je Well einer 96-Well „Pre-Hyb“-Mikrotiter-Platte
- Eintauchen der PEG-Platten in befüllte „Pre-Hyb“-Platten“ spätestens 15 Minuten vor einer Hybridisierung
- Zugabe von 70 µl Hybridisierungspuffer je Well einer 96-Well PCR Platte
- Zugabe der fragmentierten cRNA-Proben je 70 µl Hybridisierungspuffer (Gesamtvolumen ~ 110 µl)
- Inkubation im PCR Thermo Cycler (95°C für 5 Minuten)
- Beladen des Gene Chip (Hybridisierungplatte) mit cRNA-Proben in Hybridisierungspuffer
- Transfer der PEG-Platten aus den Pre-Hyb-Platten auf den Gene Chip
- Inkubation im Wärmeschrank bei 37°C für 16 h
- Einlesen der Daten des Gene Chips mit Hilfe eines Affymetrix GeneChip HT Scanners

5. Therapieempfehlungen der Projektgruppen des Tumorzentrums Regensburg, 2004

Wirkstoff	Entität	Stadium/Behandlung	Kombination
5-Fluorouracil	Magen	Nichtoperative Palliativmaßnahmen (Metastasen)	+ Epidoxorubixin + Cisplatin (ECF)
			+ Etoposid + Folinsäure (ELF)
			+ Folinsäure + Cisplatin (FLP)
	Harnblase	Induktive Radiochemotherapie des muskelinvadiven Blasenkarzinoms	
		Kurative Radiochemotherapie	
	Mamma	Präoperative/adjuvante Chemotherapie	+ Vincristin + Doxorubicin + Cyclophosphamid (+ Methotrexat) (AVCF(M))
			+ Cyclophosphamid + Doxorubicin (FAC)
			+ Epirubicin + Cyclophosphamid (FEC)
			+ Thiotepa + Methotrexat (TMF)
			+ Methotrexat + Cyclophosphamide (CMF)
Cyclophosphamide	Ovarium	Frühe Stadien (FIGO I) High risk	+ Carboplatin

Lymphom	Morbus Hodgkin Risikogruppe hoch	+ Cyclophosphamid + Etoposid(phosphat) + Procarbazin + Vincristin + Bleomycin +Predniso(lo)n (BEACOPP)
	Chronisch Lymphatische Leukämie (B-CLL)	
	- Follikuläre Lymphome Grad I und II - Mantelzell-Lymphom (Stadien III-IV) - MALT-Lymphome (Hochmaligne Lymphome) - Diffuse großzellige B-Zell NHL - Burkitt-Lymphom - Angioimmunoblastisches T-Zell Lymphom - Anaplastisches großzeliges T- oder Null-NHL - Reife T-Zell Lymphome und NK-Zell Leukämien - Kutane T-Zell Lymphome (Mykosis fungoides + pemorphes CTCL)	+ Doxorubicin + Vincristin + Predniso(lo)n (CHOP) (+ Rituximab)
	- Diffuse großzellige B-Zell NHL - Angioimmunoblastisches T-Zell Lymphom - Anaplastisches großzeliges T- oder Null-NHL - Reife T-Zell Lymphome und NK-Zell Leukämien	+ Doxorubicin + Vincristin + Predniso(lo)n + Etoposid (CHOEP)
	Follikuläre Lymphome Grad I und II	+Fludarabin + Mitoxantrone (FCM) + Rituximab

		Plasmozytom – Multiples Myelom	+ Doxorubicin + Dexamethason (CAD)
			+ Vincristin + Doxorubicin + 5-FU (+ Methotrexat) (AVCF(M))
			+ 5-FU + Doxorubicin (FAC)
	Mamma	Präoperative/adjuvante Chemotherapie	+ Doxorubicin (AC)
			+ Epidoxorubicin + 5-FU (FEC)
			+ Methotrexat + 5-FU (CMF)
	Lunge	Kleinzelliges Bronchialkarzinom (SCLC)	
Carboplatin	Ovarium	Frühe Stadien (FIGO I) High risk	+ Cyclphosphamid
			+ Paclitaxel
		Fortgeschrittene Stadien (FIGO II-III)	+ Paclitaxel
	Harnblase	Kurative Radiochemotherapie	
	Lunge	Kleinzelliges Bronchialkarzinom (SCLC + NSCLC)	

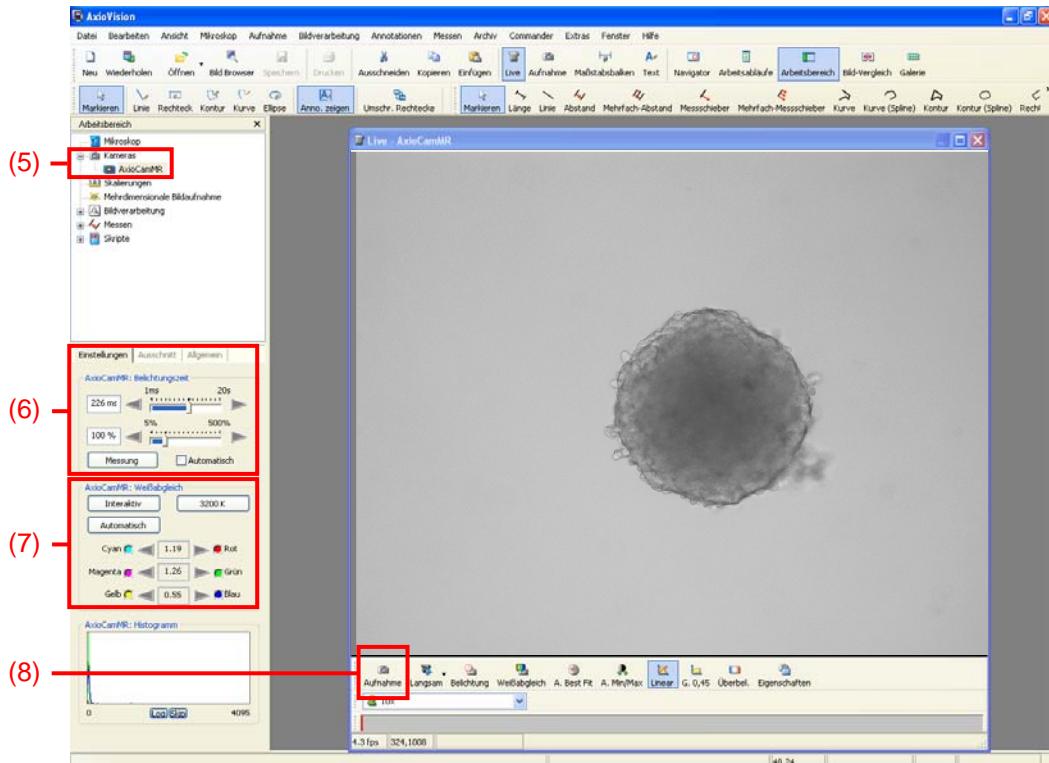
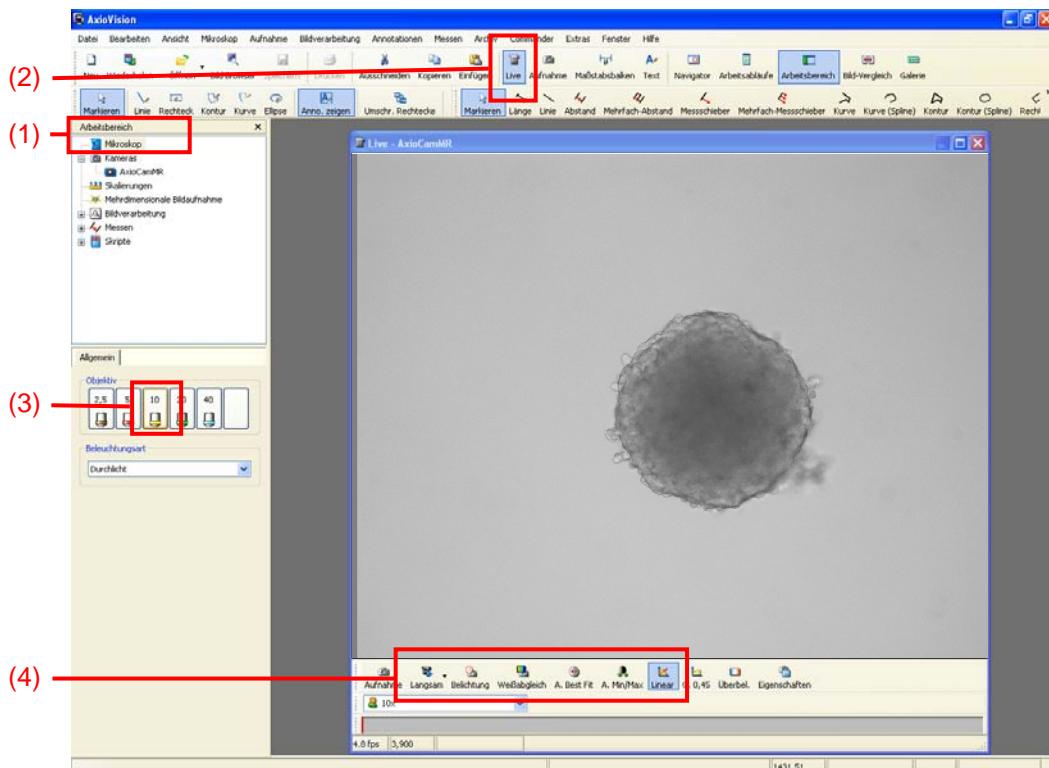
Cisplatin	Magen	Nichtoperative Palliativmaßnahmen (Metastasen)	+ Epidoxorubixin + 5-FU (ECF)
			+ Folinsäure + Cisplatin (FLP)
	Harnblase	Induktive Radio-Chemotherapie des muskel-invasiven Blasenkarzinoms	
		Kurative Radiochemotherapie	
	Systemische Chemotherapie		+ Methotrexat + Vinblastin + Doxorubicin (Adriamycin) (MVAC)
			+ Methotrexat + Vinblastin (CMV)
			+ Gemcitabine (GC)
			+ Paclitaxel
	Lymphom	Reife T-Zell Lymphome und NK-Zell Leukämien	+ Dexamethason + Ara-C (DHAP)
	Lunge	Kleinzelliges Bronchialkarzinom (SCLC + NSCLC)	
CCNU/ Lomustin	Lymphom	Reife T-Zell Lymphome und NK-Zell Leukämien	+ Etoposid + Vindesin + Dexamethason (CEVD)
Paclitaxel	Ovarium	Frühe Stadien (FIGO I) High risk	+ Carboplatin
	Harnblase	Induktive Radio-Chemotherapie des muskel-invasiven Blasenkarzinoms	

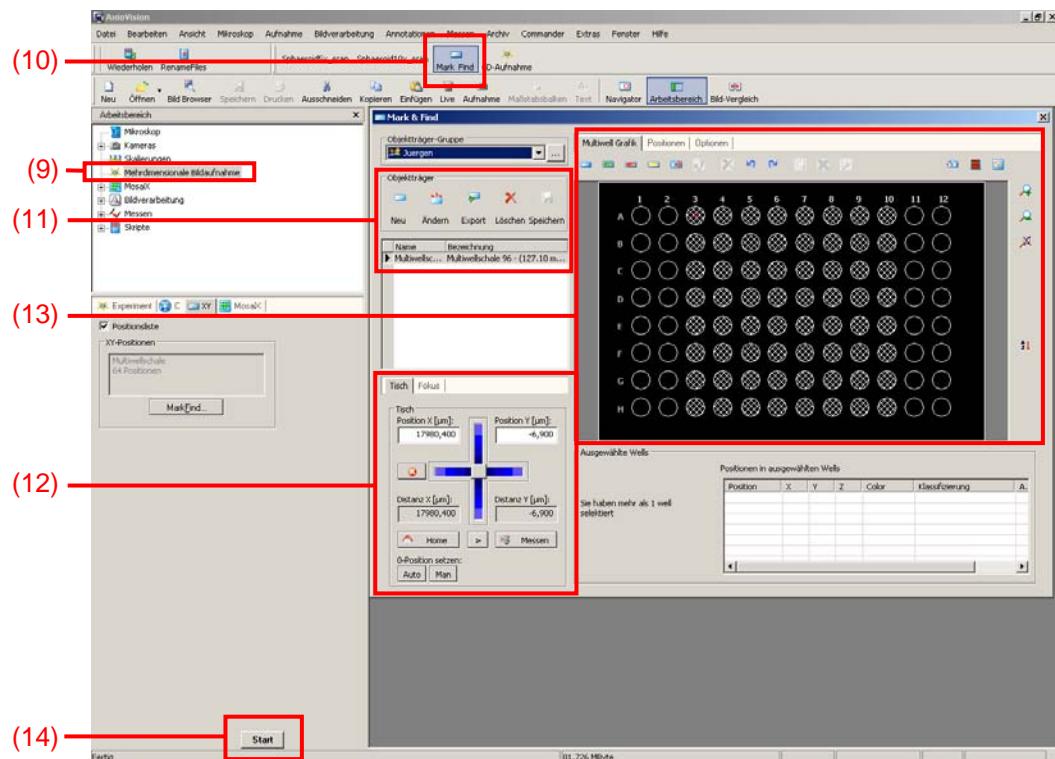
		Systemische Chemotherapie	+ Carboplatin
	Mamma	Präoperative/adjuvante Chemotherapie	
	Lunge	Kleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC)	
Mitoxantrone	Lymphom	Chronisch Lymphatische Leukämie (B-CLL)	
		Follikuläre Lymphome Grad I und II	+ Fludarabin + Cyclophosphamid (FCM) + Rituximab
	Mamma	Präoperative/adjuvante Chemotherapie	+ Methotrexat + Mitomycin (MMM)
Doxorubicin	Harnblase	Topische Chemotherapie hochdifferenzierter oberflächlicher Blasenkarzinome (G1-G2)	
		Systemische Chemotherapie	+ Methotrexat + Vinblastin + Cisplatin (MVAC)
	Lymphom	Morbus Hodgkin Risikogruppe niedrig/mittel	+ Bleomycin + Vinblastin + Dacarbazine (ABVD)
		Morbus Hodgkin Risikogruppe hoch	+ Cyclophosphamid + Etoposid(phosphat) + Procarbazine + Vincristin + Bleomycin + Prednisolone (BEACOPP)
		Chronisch Lymphatische Leukämie (B-CLL)	

	<ul style="list-style-type: none"> - Follikuläre Lymphome Grad I und II - MALT-Lymphome (Hochmaligne ymphome) - Mantelzell-Lymphom (Stadien III-IV) - Diffuse großzellige B-Zell NHL - Burkitt-Lymphom - Angioimmunoblastisches T-Zell Lymphom - Anaplastisches großzelliges T- oder Null-NHL - Reife T-Zell Lymphome und NK-Zell Leukämien - Kutane T-Zell Lymphome (Mykosis fungoides) 	+ Cyclophosphamid + Vincristin + Predniso(lo)n (CHOP) (+ Rituximab)
	<ul style="list-style-type: none"> - Diffuse großzellige B-Zell NHL - Angioimmunoblastisches T-Zell Lymphom - Anaplastisches großzelliges T- oder Null-NHL - Reife T-Zell Lymphome und NK-Zell Leukämien 	+ Cyclophosphamid + Vincristin + Predniso(lo)n + Etoposid (CHOEP)
	Plasmozytom - Multiples Myelom	+ Cyclophosphamid + Dexamethason (CAD)
Mamma	Präoperative/adjuvante Chemotherapie	+ Vincristin + Cyclophosphamid + 5-FU (+ Methotrexat) (AVCF(M))
		+ 5-FU + Cyclophosphamid (FAC)
		+ Cyclophosphamid (AC)

Epidoxorubicin	Magen	Nichtoperative Palliativmaßnahmen (Metastasen)	+ Cisplatin + 5-FU (ECF)
	Harnblase	Adjuvante Installations-therapie oberflächlicher Blasentumoren, Intravesikuläre Chemotherapie	+ Paclitaxel
	Mamma	Präoperative/adjuvante Chemotherapie	+ Cyclphosphamid + 5-FU (FEC)
			+ Vincristin + Methotextrat (ECM)

6. Bildaufnahme mittels AxioVision 4.5 Software





Live-Bild Einstellungen im Arbeitsbereich „Mikroskop“

- (1) Arbeitsbereich „Mikroskop“ wählen
- (2) Live-Bild öffnen
- (3) Objektiv auswählen
- (4) Aufnahmegeschwindigkeit und Kontrastierung wählen

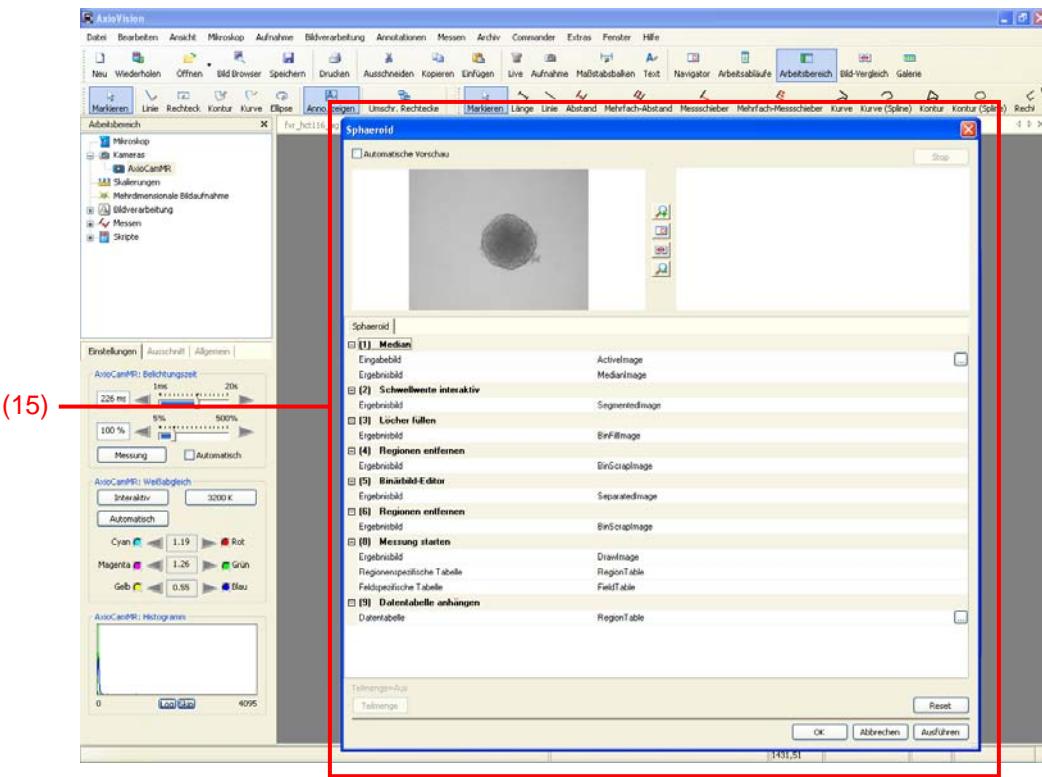
Live-Bild Einstellungen im Arbeitsbereich „Kameras“

- (5) Arbeitsbereich „Kameras“ → AxioCam MR wählen
- (6) Belichtungszeit einstellen
- (7) Weißabgleich einstellen
- (8) (Optional für Einzelbildaufnahme) „Aufnahme“ starten

Aufnahmebereich festlegen

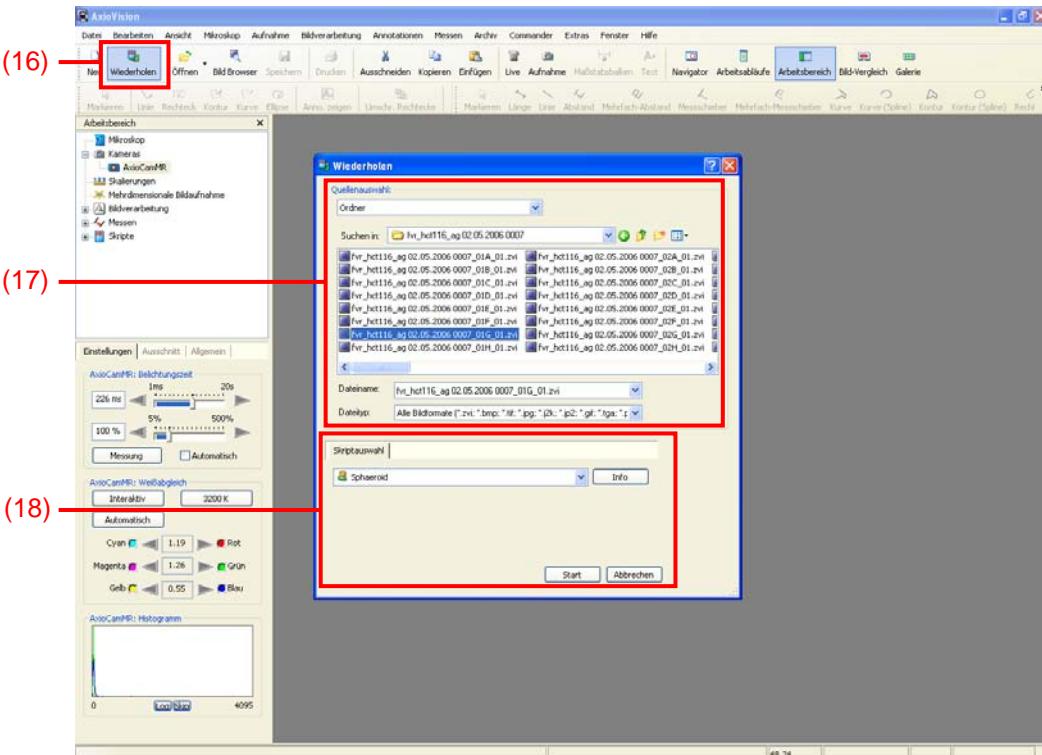
- (9) Arbeitsbereich „Mehrdimensionale Bildaufnahme“ wählen
- (10) Fenster „Mark + Find“ öffnen
- (11) Objektträger wählen
- (12) Start-/0-Position (immer well A1) manuell setzen
- (13) Aufnahmebereich wählen und „Mark + Find“ schließen
→ Positionen werden automatisch übernommen
- (14) Mehrdimensionale Bildaufnahme starten (Bereich des Autofokus' wurde vorher festgelegt)

7. Bestimmung von Sphäroiddurchmesser und Volumen



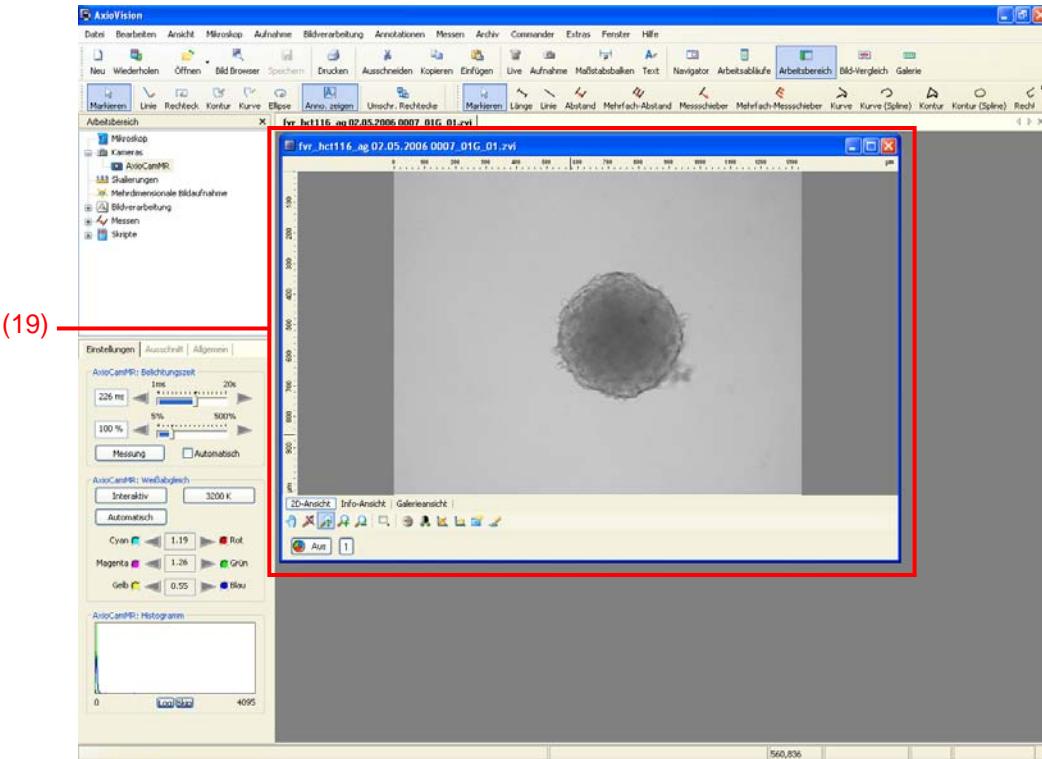
Sphäroidanalyse

(15) Protokoll des Auswerteskriptes „Sphäroid“



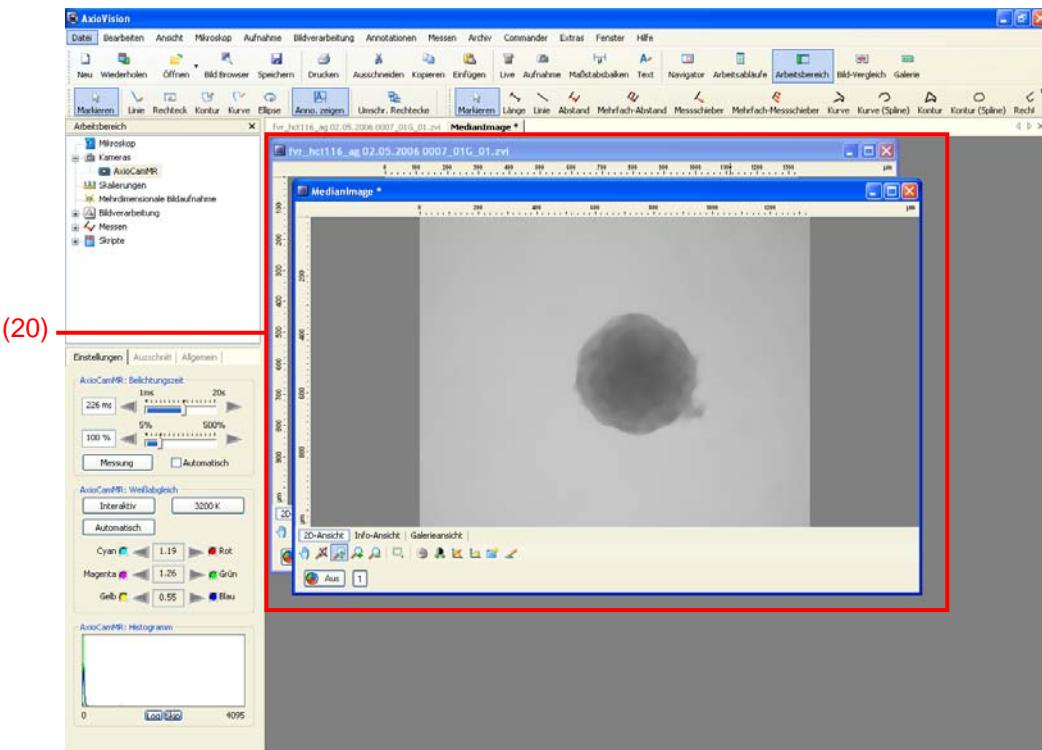
Auswertung starten

- (16) Skript „Wiederholen“
- (17) Quelldateien auswählen
- (18) Skript („Sphäroid“) auswählen und starten



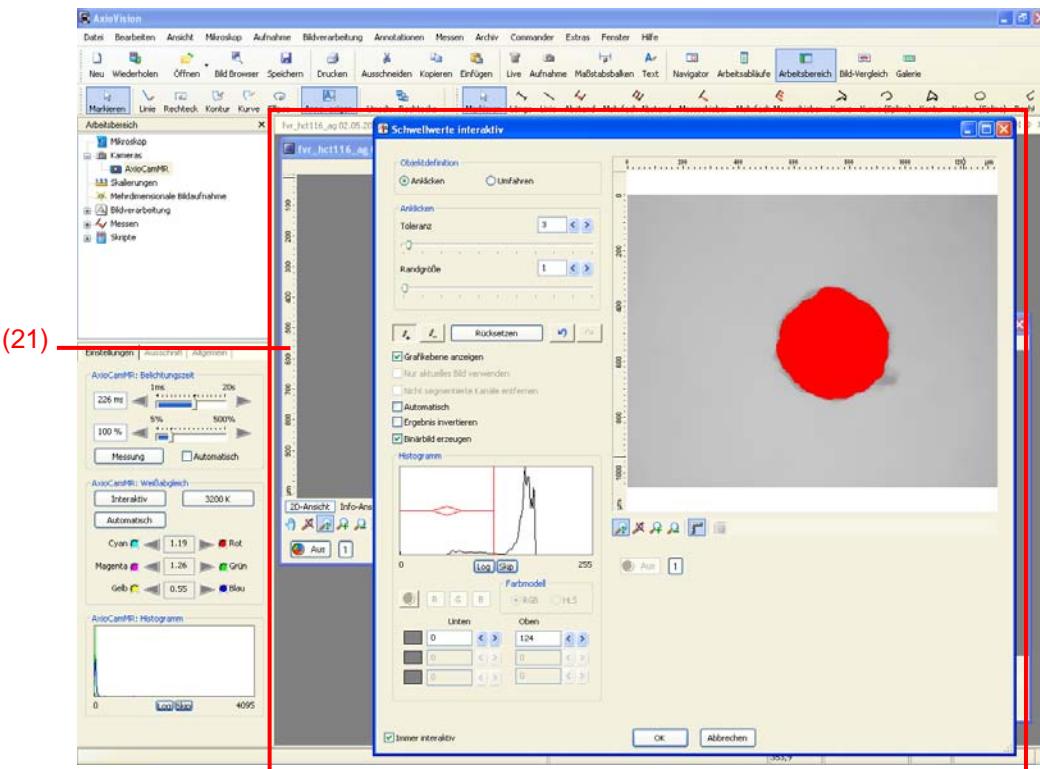
Skript „Sphäroid“

(19) „Median“ Eingabebild (MedianImage)



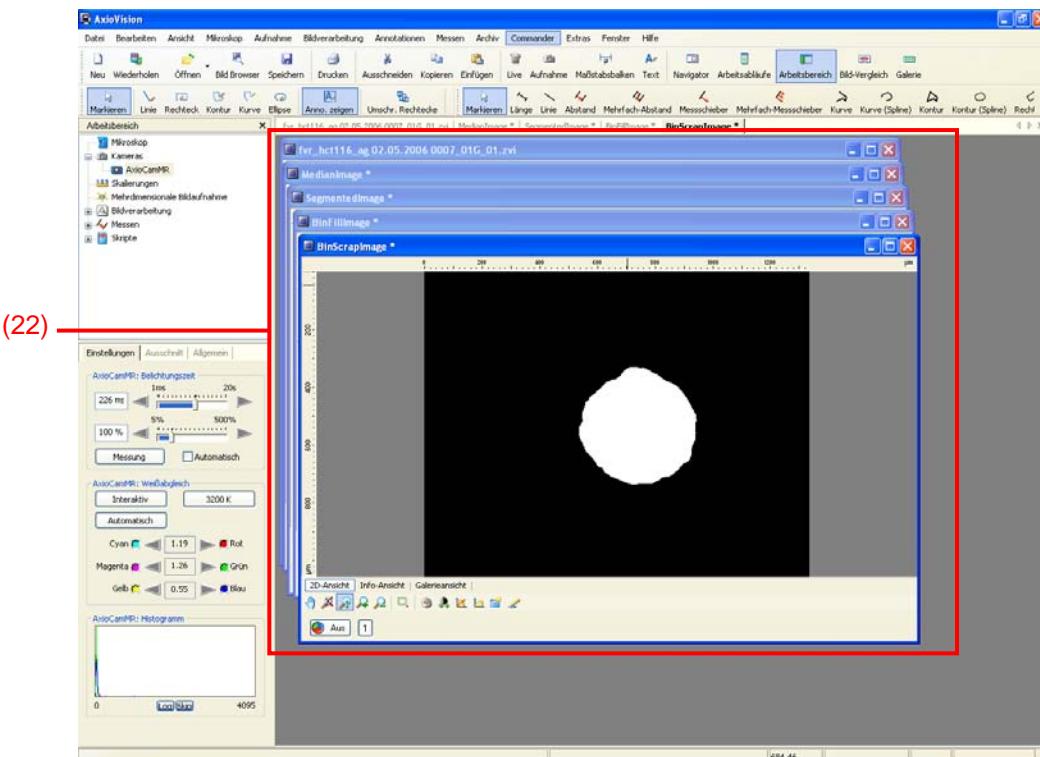
Skript „Sphäroid“

(20) „Median“ Ergebnisbild (MedianImage)



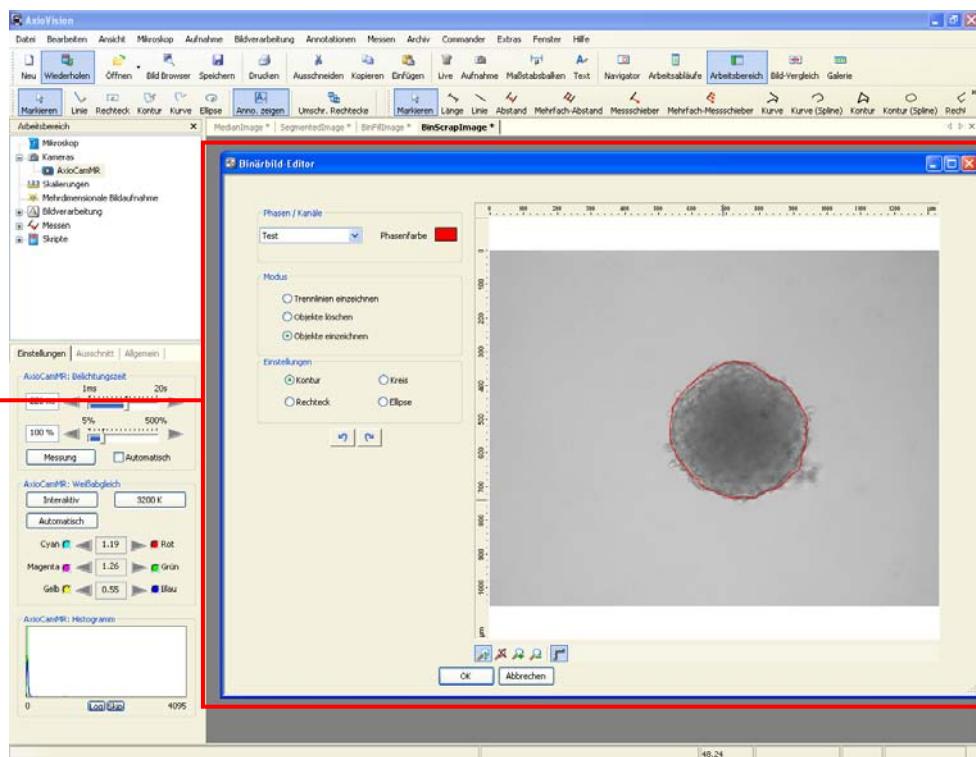
Skript „Sphäroid“

- (21) „Schwellwerte interaktiv“ → Messbereich auswählen und mit OK bestätigen (SegmentedImage)



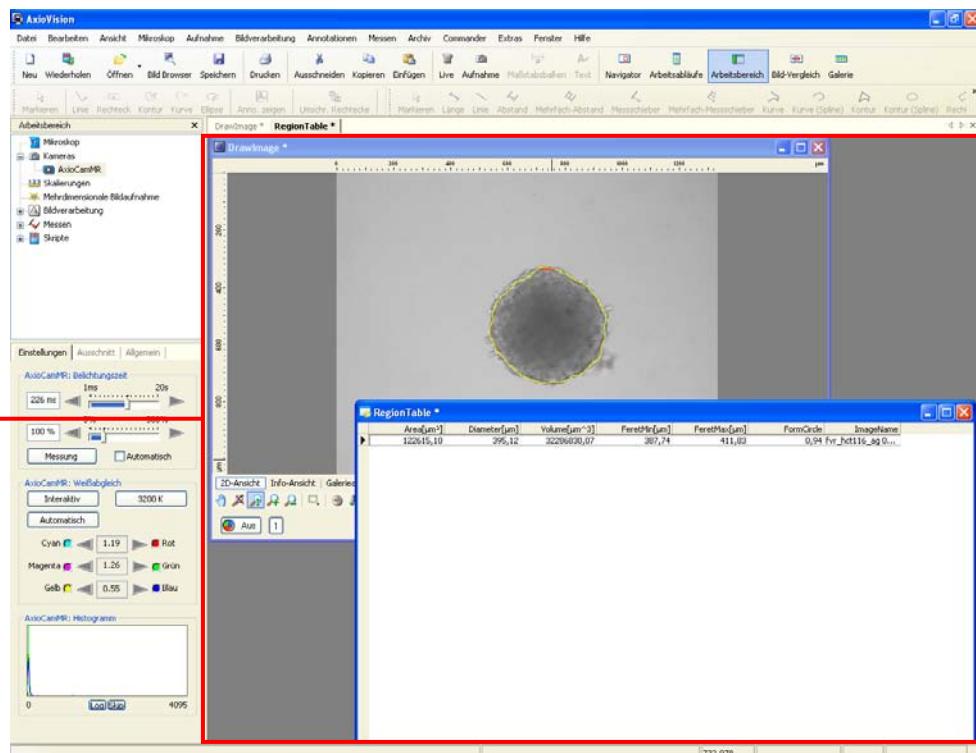
Skript „Sphäroid“

- (22) „Binärbild-Editor“ Löcher füllen (BinFillImage), Regionen definierter Größe entfernen (BinScrapImage)



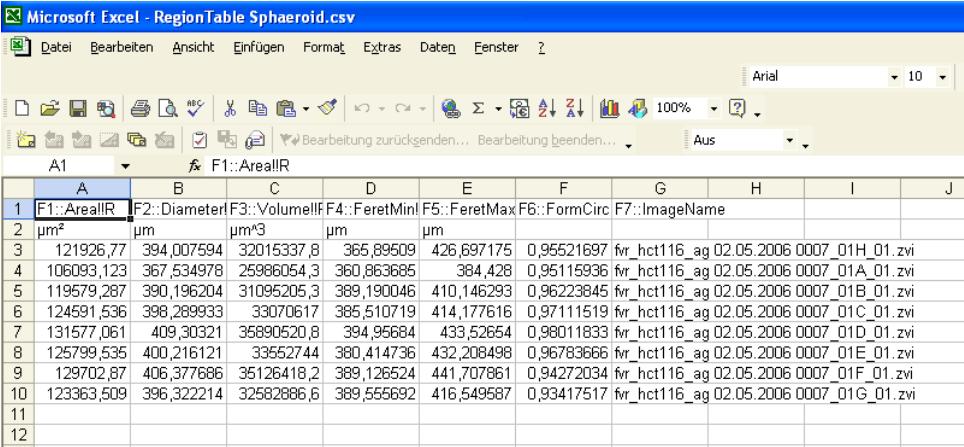
Skript „Sphäroid“

- (23) „Binärbild-Editor“ → abschließende Korrekturen (Entfernen, Hinzufügen) möglich, mit OK bestätigen



Skript „Sphäroid“

- (24) „Messung starten“ → Ergebnisbild (DrawImage) und Regionenspezifische Tabelle (RegionTable)

(25) 

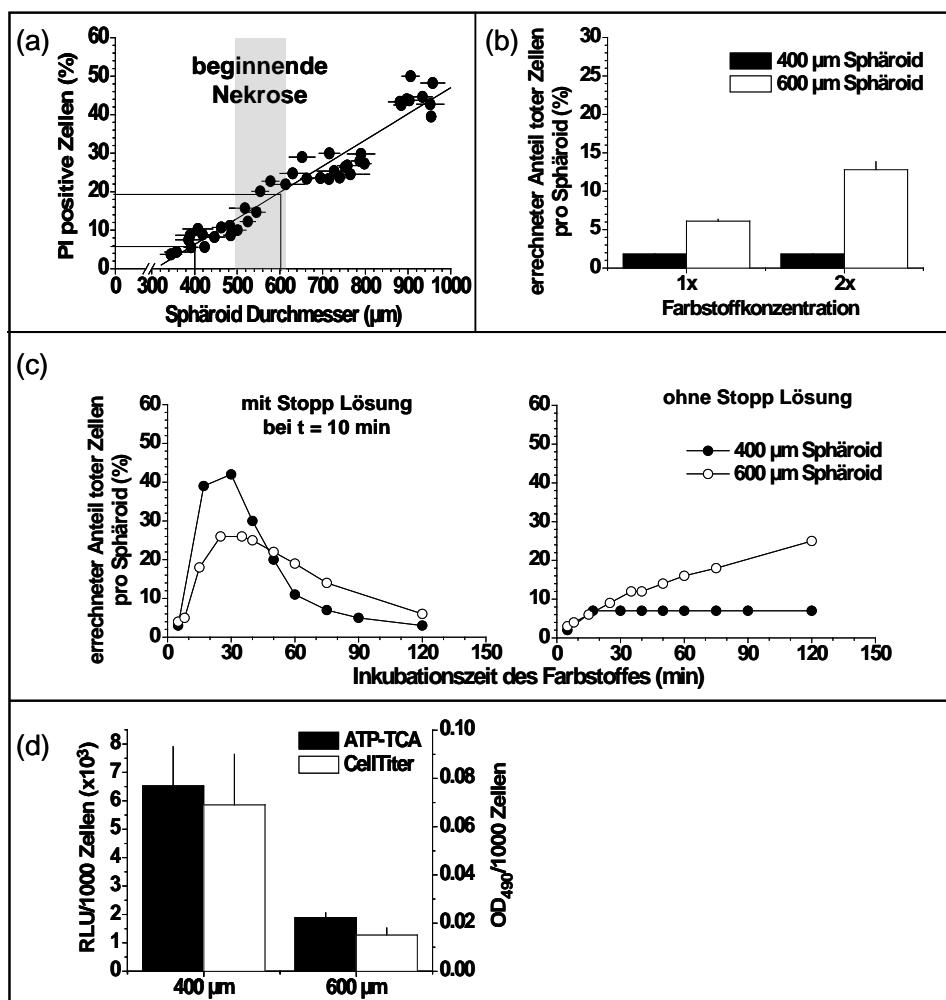
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	F1::ArealIR	F2::Diameter	F3::Volumell	F4::FeretMin	F5::FeretMax	F6::FormCirc	F7::ImageName			
2	μm ²	μm	μm ³	μm	μm	μm	μm			
3	121926,77	394,007594	32015337,8	365,89509	426,697175	0,95521697	fv_hct116_ag 02.05.2006 0007_01H_01.zvi			
4	106093,123	367,534978	25986054,3	360,863685	384,428	0,95115936	fv_hct116_ag 02.05.2006 0007_01A_01.zvi			
5	119579,287	390,196204	31095205,3	369,190046	410,146293	0,96223645	fv_hct116_ag 02.05.2006 0007_01B_01.zvi			
6	124591,536	398,289933	33070617	385,510719	414,177616	0,97111519	fv_hct116_ag 02.05.2006 0007_01C_01.zvi			
7	131577,061	409,30321	35890520,8	394,956684	433,52654	0,98011833	fv_hct116_ag 02.05.2006 0007_01D_01.zvi			
8	125799,535	400,216121	33562744	380,414736	432,208498	0,96783662	fv_hct116_ag 02.05.2006 0007_01E_01.zvi			
9	129702,87	406,377686	35126418,2	389,126524	441,707861	0,94272034	fv_hct116_ag 02.05.2006 0007_01F_01.zvi			
10	123363,509	396,322214	32582886,6	389,555692	416,549587	0,93417517	fv_hct116_ag 02.05.2006 0007_01G_01.zvi			
11										
12										

Regionenspezifische Tabelle

(25) Ausgabe der Ergebnisse im Excelformat:

Fläche (Area), Sphäroiddurchmesser (Diameter), Sphäroidvolumen (Volume), minimaler und maximaler Durchmesser (FeretMin, FeretMax), Zirkularität (FormCirc) und Dateiname (ImageName)

8. Testung standardmäßig angewandter Zellvitalitätsassays an Sphäroiden



Verschiedene Zytotoxizitäts-/Vitalitätsassay, die routinemäßig an Monolayerkulturen eingesetzt werden, scheiterten beim Einsatz an Multizellulären Tumor Sphäroiden (MCTS). (a) Anteil Membran-defekter, Propidiumiodid (PI)-positiver Zellen in HT29 Sphäroiden als Funktion des durchschnittlichen Sphäroiddurchmessers (\pm SD), bestimmt mittels Durchflußzytometrie nach Dissoziation von Aliquots bestehend aus 16 bis 32 Sphäroiden. (b) Geschätzter Anteil toter Zellen in 400 μ m und 600 μ m HT29 Sphäroiden, bestimmt mittels Vybrant® Cytotoxicity Assay (Molecular Probes). Der Assay wurde mit der im Standardprotokoll angegebenen (1x) und mit doppelter Farbstoffkonzentration (2x) durchgeführt. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für $n \geq 5$ Sphäroide. Die Ergebnisse entsprechen weder dem tatsächlichen Anteil Membran-defekter Zellen in 600 μ m Sphäroiden, noch können sie als konstanter (vernachlässigbarer) Hintergrund betrachtet werden. (c) Anteil toter Zellen in 400 μ m und 600 μ m HT29 Sphäroiden, ermittelt mit Hilfe des CytoTox-One™ Homogenous Membrane Integrity Assays Promega, Madison, WI). Der Test wurde ohne (rechte Abbildung) und mit Zugabe der Stopp-Lösung (linke Abbildung) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SD für $n = 7$ Sphäroide. Als Funktion der Zeit (nach Zugabe der Färbelösung) konnte das Assay-Signal nicht stabil gemessen werden. (d) Einsatz des ATP-TCA (DCS Innovative Diagnostic Systems, Hamburg, Deutschland) und des CellTiter 96 ® Aqueous One Solution Cell Proliferation (Promega) Assays zur Bestimmung der Zellviabilität in 400 μ m und 600 μ m HT29 Sphäroiden. Die schwarzen Balken zeigen die Adenosintriphosphat (ATP)-Konzentration dargestellt als relative Lichteinheiten (RLUs) pro 1000 Zellen bestimmt mittels des ATP-TCA Assays; die weißen Balken zeigen den Umbau von MTS in Formazan, dargestellt als Absorption bei 405 nm pro 1000 Zellen bestimmt mittels des Cell Titer 96 AQ. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm SDs für $n = 7$ Sphäroide. Die Signalstärke pro Zelle bzw. pro 1000 Zellen nimmt kritisch mit der Sphäroidgröße ab (Friedrich et al. 2007a).

9. Abkürzungen

Einheiten

m milli (1/10³)

µ mikro (1/10⁶)

n nano (1/10⁹)

2-D zweidimensional

2-DG 2-Desoxyglukose

3-D dreidimensional

5-FU 5-Fluorouracil

17-AAG 17-N-Allyl-amino-17-Demethoxy-Geldanamicin

A

ADP Adenosindiphosphat

APH saure Phosphatase

ATP Adenosintriphosphat

B

BCNU Bis-chlorethylnitrosourea

BIAAs Bisimiazoacridionone

BrdU Bromdesoxyuridin

BSA Rinderserumalbumin

C

cDNA vervielfältigte Desoxyribonukleinsäuren

CIN Chromosomen-instabil

CMV Zytomegalievirus

CO₂ Kohlenstoffdioxid

cRNA vervielfältigte Ribonukleinsäuren

D

d Durchmesser

DAB 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydro-chlorid

DAPI 4',6-Diamidino-2-phenylindol

dC 2'-Desoxycytidin

DC dendritische Zellen

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

E

EB	Embryoid-Körper
EC	Endothelzellen
ECM	Extrazellulärarmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EthHD-1	Ethidiumhomodimer 1

F

F	Fibroblasten
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FDG	Fluorodesoxyglukose
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat Isomer 1
FKS	fötales Kälberserum
FLT	FMS-Gen-ähnliche Tyrosinkinase 3

G

g	Gramm
G6PD	Glukose-6-Phosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein

H

h	Stunde
HCL	Salzsäure
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HRPO	Meerrettichperoxidase
Hsp	Hitze-Schock-Protein
HTS	High-Throughput-Screening

I

I	Immunzellen
IC ₅₀	50% Inhibitorische Konzentration
IgG, IgM	Immunglobulin G, Immunglobulin M
Kan	Kanamycin

L

I	Liter
LB	Luria Bertani
LDH	Laktatdehydrogenase
LSM	Laserscanningmikroskopie

M

m	Meter
M	Mol/Liter
MCS	multizelluläres Sphäroid
MCTS	multizelluläres Tumor-Sphäroid
min	Minuten
MSI	Mikrosatelliten-instabil
mTOR	Ziel von Rapamycin bei Säugetieren
MTS	Tetrazoliumsalz
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid

N

n	(An-)Zahl
N	Nekrose
NAD(P)H	Nikotinamide-Adenine-Dinukleotid-(Phosphat)
NaHCO ₃	Natriumbicarbonat
NaOH	Natronlauge
NASA	National Aeronautics and Space Administration
NCI-DTP	National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program
NK	natürliche Killerzellen
NSCLC	Non Small Cancer Lung Cells

O

OD	optische Dichte
----	-----------------

P

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
PET	Positronen-Emissionstomographie
PI	Propidiumiodid

PNPP p-Nitrophenylphosphat
poly-HEMA poly-Hydroxyethylmethakrylat

R

RNA Ribonukleinsäure
RT Raumtemperatur

S

SCLC Small Cancer Lung Cells
SD Standardabweichung
sec Sekunden
SECM Scanning elektrochemische Mikroskopie
S.O.C. SOB (super optimal broth) Medium plus Glukose

T

T Tumorzellen

U

ÜN über Nacht
U/min Umdrehungen pro Minute

V

VR vitale Randschicht

W

WST-8 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-di-sulfophenyl)-2H tetrazolium monosodium

Danksagung:

Frau Prof. Dr. Leoni Kunz-Schughart möchte ich für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Vergabe dieses Themas danken. Sie hatte jederzeit für Fragen oder Probleme ein offenes Ohr und konnte mir zahlreiche wertvolle Ratschläge geben.

Herrn Prof. Dr. Achim Göpferich möchte ich recht herzlich für die Betreuung dieser Doktorarbeit danken. Seine Unterstützung und seine Anregungen konnten wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beitragen.

Herrn Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter möchte ich für die freundliche Aufnahme an seinem Lehrstuhl danken. Die hervorragenden Arbeitsbedingungen an seinem Institut trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Die Genexpressionsanalysen entstanden in Kooperation mit **Avalon Pharmaceuticals**, Germantown, MD, USA. Zudem möchte ich mich für die Bereitstellung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und Wirkstoffe bedanken. Besonders möchte ich mich bei **Dr. Juana Castaneda, Dr Marek Cholody** und **Dr. Reinhard Ebner** für die Zusammenarbeit und den schönen und produktiven Aufenthalt in ihrem Unternehmen bedanken. Dank gilt auch **Derong Liu** und **Dr. Qin Zong** für die Hilfe bei den Genexpressionsanalysen.

Danke auch an **Dr. Wolfgang Eder** für sein Interesse an und seine wertvollen Tipps bezüglich meiner Doktorarbeit.

Ein herzliches Dankeschön gilt meinen Kollegen in der Zellkultur, **Marit Wondrak, Frank van Rey** und **Brigitte Krause**. Eure tatkräftige Unterstützung beim Kultivieren und Analysieren der Zellen war sehr wertvoll und ich habe immer gerne mit Euch zusammengearbeitet.

Auch bei **Elisabeth Schmidt-Brücken** und **Rosi Kromas** möchte ich mich sehr für die gute Zusammenarbeit, viele nette Gespräche und die schöne Zeit im Labor bedanken.

Danke auch an meine „Büro-WG“, **Dr. Simone Diermeier-Daucher, Magdalena Kadlubek, Andrea Sassen, Dr. Arabel Vollmann**, für diverse wissenschaftliche und unwissenschaftliche Gespräche, viel Spaß und die schöne Zeit.

Herzlicher Dank gilt den stets hilfsbereiten und freundlichen Kollegen am Lehrstuhl.

Vielen Dank an alle Korrekturleser dieser Arbeit.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, und nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet haben. Diese Arbeit war bisher nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens. Andere Promotionsversuche wurden nicht unternommen.

Teilergebnisse dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht worden:

Friedrich J, Eder W, Castaneda J, Doss M, Huber E, Ebner R, Kunz-Schughart LA. 2007. A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the Acid Phosphatase assay. Journal of Biomolecular Screening 12: 925-937.

Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart LA. 2007. Experimental ant-tumor therapy in 3-D: Spheroids - old hat or new challenge? International Journal of Radiation Biology 83: 849-871.

Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. 2009. Spheroid-Based Drug Screen: Consider-ations and Practical Approach. Nature Protocols 4(3): 309-324.

Regensburg, den

