



Frauenklinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktorin: Prof. Dr. Marion B. Kiechle)

Expressionsanalyse von Komponenten des Urokinase-Systems im Sphäroid-Mikrotumormodell

Christina Elisabeth Kohl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Viktor Magdolen
2. Prof. Dr. Marion B. Kiechle (schriftliche Beurteilung)
Prof. Dr. Florian Bassermann (mündliche Beurteilung)

Die Dissertation wurde am 04.10.2017 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 02.05.2018 angenommen.

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1. Das Urokinase-System	1
1.1.1. Komponenten und ihre (tumor-)biologischen Eigenschaften	1
1.1.1.1. uPA	4
1.1.1.2. PAI-1	5
1.1.1.3. uPAR und die Spleißvariante uPAR-del4/5.....	7
1.1.1.4. Das GTP-bindende Protein Rab31	11
1.1.2. Komponenten des Urokinase-Systems als Biomarker einer individualisierten Tumorthherapie.....	12
1.2. Das (Tumor-)Protease-System der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen	15
1.3. Sphäroid-Mikrotumormodelle	17
1.3.1. Hintergründe und Methoden	17
1.3.2. Charakteristik des Sphäroid-Mikrotumormodells	23
1.3.3. Etablierung eines Sphäroid-Mikrotumormodells als prädiktives <i>ex vivo</i> Testsystem zur Vorhersage des Ansprechens einer medikamentösen Tumorthherapie	24
1.4. Fragestellung und Zielsetzung	26
2. Material und Methoden.....	28
2.1. Patienten und Patientenmaterial	28
2.1.1. Patienten: Klinische Datenakquise im Rahmen der SpheroNeo-Studie ..	28
2.1.2. Patientenmaterial: Suspensionszellen und Gewebesphäroide	29
2.2. Zelllinien.....	30
2.3. Zellkultur	32
2.3.1. Kultivierung der Zelllinie MDA-MB-231 als Monolayerzellen	32
2.3.2. Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität.....	33
2.4. Generierung von Verdünnungsreihen in 2D- und 3D-Zellsystemen.....	33

2.5. Extraktion der Gesamt-RNA.....	35
2.6. Spektrophotometrische Qualitäts- und Quantitätsbestimmung der extrahierten RNA	38
2.7. Reverse Transkription der RNA zur cDNA-Synthese.....	39
2.8. Expressionsanalyse von Referenzgenen und ausgewählten Zielgenen mittels quantitativer <i>real time</i> PCR	40
2.8.1. Allgemeines Prinzip der quantitativen <i>real time</i> PCR	40
2.8.2. Expressionsanalyse von Referenzgenen zur cDNA-Qualitätsbestimmung mittels TaqMan Methode	41
2.8.2.1. Prinzip der TaqMan <i>real time</i> PCR	41
2.8.2.2. Versuchsdurchführung und Auswertung der TaqMan <i>real time</i> PCR	43
2.8.3. Expressionsanalyse von ausgewählten Zielgenen mittels LightCycler Methode.....	46
2.8.3.1. Prinzip der LightCycler <i>real time</i> PCR.....	46
2.8.3.2. Versuchsdurchführung und Auswertung der LightCycler <i>real time</i> PCR	47
3. Ergebnisse	50
3.1. Bestimmung einer optimalen Zellzahl pro Sphäroid für reproduzierbare Genexpressionsanalysen	50
3.1.1. RNA-Isolierung und cDNA-Qualitätsbestimmung im 2D-Zellmodell: Analyse der Zelllinie MDA-MB-231	50
3.1.2. RNA-Isolierung und cDNA-Qualitätsbestimmung im 2D- und 3D-Zellmodell: Analyse von Zelllinien unterschiedlicher Tumorentität	52
3.1.3. RNA-Isolierung aus Tumorgewebe unterschiedlicher Entität	56
3.2. Genexpressionsanalyse von Komponenten des Urokinase-Systems	57
3.2.1. Expressionsmuster ausgewählter Zielgene in der Zelllinie MDA-MB-231 im 2D-Zellmodell.....	57
3.2.2. Expressionsmuster ausgewählter Zielgene in Zelllinien unterschiedlicher Tumorentität im 2D- und 3D-Zellmodell	59
3.2.2.1. Expressionsmuster in ausgewählten Verdünnungsreihen	59
3.2.2.2. Expressionsmuster einzelner Zelllinien	62
3.2.2.3. Expressionsmuster der einzelnen Zielgene	67

3.2.2.4. Darstellung der Reproduzierbarkeit	67
3.3. Kooperationsprojekt mit dem Institute of Health and Biomedical Innovation, Brisbane.....	71
3.3.1. Expressionsanalyse von Referenzgenen	71
3.3.2. Expressionsanalyse von Komponenten des Urokinase-Systems	72
3.4. Die SpheroNeo-Studie: Ergebnisse der <i>in vitro</i> Wirkstofftestung am Sphäroid- Mikrotumormodell	75
4. Diskussion	82
4.1. RNA-Isolierung und Expressionsanalyse von Referenzgenen.....	82
4.2. Expressionsanalyse von Komponenten des Urokinase-Systems im Sphäroid- Mikrotumormodell	86
4.3. Kooperationsprojekt mit dem Institute of Health and Biomedical Innovation, Brisbane.....	89
4.4. Die SpheroNeo-Studie: Etablierung des Sphäroid-Mikrotumormodells als Prädiktor für das Ansprechen einer medikamentösen Tumorthherapie im Mammakarzinom?.....	91
5. Zusammenfassung	96
6. Literaturverzeichnis	98
7. Abbildungsverzeichnis	111
8. Tabellenverzeichnis	113
9. Danksagung	114

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
AMV	<i>avian myeloblastosis virus</i>
Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
ATF	aminoterminales Fragment
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cat.No.	Katalognummer, Bestellnummer, Artikelnummer
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CRC	kolorektales Karzinom
Ct	<i>cycle treshold</i>
D	Docetaxel
D	Domäne
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1, 4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EC	Epirubicin / Cyclophosphamid
ECM	<i>extracellular matrix</i> , extrazelluläre Matrix
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> , Ethylenediamintetraessigsäure
EGF(R)	<i>epidermal growth factor (receptor)</i> , epidermaler Wachstumsfaktor (Rezeptor)
et al.	und andere (lat.: et alii / et aliae)
e.V.	eingetragener Verein

FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FGF-2	<i>fibroblast growth factor 2</i> , Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2
FPRL1/LXA4R	<i>formyl peptide receptor (FPR)-like receptor-1 / lipoxin A4 receptor</i>
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i> , Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GAPs	<i>GTPase-activating proteins</i> , GTPase-aktivierende Proteine
GCP	<i>good clinical practice</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEFs	<i>guanine-nucleotide-exchange factors</i> , GTP-Austauschfaktoren
GITC	Guanidinisothiocyanat
Gly	Glycin
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosintriphosphat
H	Trastuzumab, Herceptin®
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i> , Typ-2 Rezeptor des humanen epidermalen Wachstumsfaktors
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i> , Hepatozyten-Wachstumsfaktor
hKLKs	<i>human tissue kallikrein-related peptidases</i>
HMBS	Hydroxymethylbilan-Synthase
HMW-uPA	<i>high molecular weight uPA</i> , hochmolekularer Urokinasetyp-Plasminogenaktivator
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HuR	<i>human antigen R</i> , humanes Antigen R
ID	Identifizierungsnummer
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i> , insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KLKs	Kallikrein-ähnliche Peptidasen
KLK4-7	Kallikrein-ähnliche Peptidasen 4 bis 7
LDL(R)	<i>low density lipoprotein (receptor)</i> , Lipoprotein geringer Dichte (Rezeptor)
LMW-uPA	<i>low molecular weight uPA</i> , niedermolekularer Urokinasetyp-Plasminogenaktivator
LNN	<i>lymph node negative</i> , negative Lymphknotenmetastasierung
LRP	<i>low density lipoprotein receptor related lipoprotein</i>
M	Molar, Stoffmengenkonzentration in mol/l
miRNA	<i>micro RNA</i>

MMPs	Matrix-Metalloproteasen
M _r	relative Molekülmasse
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
NTC	<i>no template control</i>
OvCa	Ovarialkarzinom, Eierstockkrebs
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1
PAI-2	Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 2
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
pCR	<i>pathological complete response</i> , pathologische Komplettremission
PEG	Polyethylenglykol
Poly-A	Poly-Adenylierung
PPC	<i>peak plasma concentration</i> , maximale Plasma-Wirkstoffkonzentration
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PST	primäre systemische Therapie, neoadjuvante Chemotherapie
qPCR / QPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
Rab-Proteine	<i>Ras-related-proteins in brain</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROC-Kurve	<i>receiver operating characteristic curve</i> , Grenzwertoptimierungskurve
ROX	5-Carboxy-Rhodamin-X
R ₀ -Resektion	komplette Resektion des Tumors im Gesunden
rRNA	ribosomale RNA
RSV	<i>rous sarcoma virus</i>
RT	reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
s	Standardabweichung
s.	siehe
SOP	<i>standard operating procedure</i> , Standardarbeitsanweisung
SpheroNeo	<i>spheroids for the prediction of neoadjuvant chemotherapy</i> , Sphäroide zur Prädiktion des Ansprechens einer neoadjuvanten Chemotherapie
suPAR	<i>soluble uPAR</i> , löslicher Urokinasetyp-Plasminogenaktivator-Rezeptor
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> -Polymerase
TBP	<i>TATA-box binding protein</i>
TGFβ	<i>transforming growth factor beta</i> , transformierender Wachstumsfaktor beta

tPA	<i>tissue type plasminogen activator</i> , gewebespezifischer Plasminogenaktivator
tRNA	Transfer-RNA
u.a.	unter anderem
uPA	Urokinasetyp-Plasminogenaktivator
uPAR	Urokinasetyp-Plasminogenaktivator-Rezeptor
uPAR-del4/5	uPA-Rezeptor-Spleißvariante mit Deletion von Exon 4 und 5
uPAR-del5	uPA-Rezeptor-Spleißvariante mit Deletion von Exon 5
UV-vis	ultravioletter und sichtbarer (<i>visible</i>) Wellenlängenbereich
v.a.	vor allem
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VLDL(R)	<i>very low density lipoprotein (receptor)</i> , Lipoprotein sehr geringer Dichte (Rezeptor)
Vn	Vitronektin
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1. Das Urokinase-System

1.1.1. Komponenten und ihre (tumor-)biologischen Eigenschaften

Das Urokinase-System, auch unter dem Namen uPA-System (Urokinasetyp-Plasminogenaktivator-System) bekannt, ist eines der am besten untersuchten proteolytischen Systeme im menschlichen Organismus (*Taubert et al., 2010*). Zum einen ist es aufgrund seiner pleiotropen physiologischen Funktionen von großem wissenschaftlichem Interesse, zum anderen zeigt es zahlreiche pathologische Einflüsse auf die Entstehung und Progression eines malignen Tumorgeschehens. Das Urokinase-System umfasst ein komplexes Gefüge aus vielen interaktiven Faktoren. Zu den wichtigsten Komponenten gehören die Serinprotease uPA (Urokinasetyp-Plasminogenaktivator) mit ihrem membranständigen Rezeptor uPAR (Urokinasetyp-Plasminogenaktivator-Rezeptor) und dessen Spleißvariante uPAR-del4/5 (uPA-Rezeptor-Spleißvariante mit Deletion von Exon 4 und 5), sowie die endogenen uPA-Inhibitoren, PAI-1 und PAI-2 (Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 und Typ 2) (*Duffy, 2004; Taubert et al., 2010*).

Das Urokinase-System wurde 1947 von Astrup und Permin zum ersten Mal im Zusammenhang mit der Aktivierung und Regulierung der Hämostase (Blutgerinnung) beschrieben (*Astrup und Permin, 1947*). Unter physiologischen Bedingungen wird intravaskulär aus dem zymogenen Plasmaprotein Plasminogen durch die Plasminogenaktivatoren uPA und tPA (*tissue type plasminogen activator*, gewebe-spezifischer Plasminogenaktivator) die aktive Serinprotease Plasmin generiert. Die proteolytische Eigenschaft von Plasmin induziert durch den Abbau von Fibrinpolymeren die Aktivierung der Fibrinolyse im Sinne einer Thrombolyse (*Cesarman-Maus und Hajjar, 2005*). Dieses Fibrinolyse-System steht durch das Zusammenspiel von zahlreichen Substraten, Inhibitoren, Cofaktoren und Rezeptoren im Gleichgewicht mit der koagulatorischen Fibrinbildung. Die Aktivität von Plasmin wird durch α_2 -Antiplasmin und α_2 -Makroglobulin inhibiert, wohingegen die enzymatische Aktivität von uPA bzw. tPA hauptsächlich durch die zwei spezifischen Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 reguliert wird (*Cesarman-Maus und Hajjar, 2005*).

Wenige Jahre nach der Erstbeschreibung des Urokinase-Systems durch Astrup und Permin wurde 1951 von Williams der Nachweis von uPA im Urin erbracht (*Williams, 1951*). Im Jahre 1956 konnte uPA erstmals aus dem Urin isoliert werden (*Ploug und Kjeldgaard, 1956*). Im Jahre 1976 wurde von Astedt und Holmberg das Vorkommen von uPA im malignen Ovarialkarzinomgewebe beschrieben (*Astedt und Holmberg, 1976*). Im Vergleich zu tPA ist uPA nicht nur im Gewebe, sondern auch im Blutplasma zu finden (*Wun et al., 1982; Rijken, 1995*). Seit den 1980er Jahren wurden die Komponenten des Urokinase-Systems, insbesondere uPA, in diversen malignen und nicht malignen Tumorgeweben nachgewiesen (*Schmitt et al., 2008*). 1985 wurde zum ersten Mal eine erhöhte uPA-Aktivität beim Mammakarzinom gezeigt (*O'Grady et al., 1985*).

Heute weiß man, dass das Urokinase-System durch Modulation von Angiogenese, Migration, Adhäsion und Proliferation von Tumorzellen auch eine Schlüsselrolle in der Tumorinvasion und Metastasierung spielt (Abb. 1) (*Danø et al., 1985; Conese und Blasi, 1995; Duffy und Duggan, 2004; Taubert et al., 2010*). Das Urokinase-System zählt neben anderen Serinproteasen, (Matrix-)Metalloproteasen, Cystein- und Aspartylproteasen zu den peri- und intrazellulären Protease-Systemen. Diese Protease-Systeme üben komplexe Interaktionen mit extrazellulären Gewebefaktoren, z.B. Integrinen, Membranrezeptoren, Wachstumsfaktoren, Inhibitoren und Adhäsionsproteinen, aus. Das Urokinase-System induziert den Abbau von Basalmembranen und der extrazellulären Matrix (ECM, *extracellular matrix*). Dieses sogenannte *Tissue Remodeling* des die Tumorzelle umgebenden Gewebesystems fördert Tumorzellwachstum, Invasion und Metastasierung (*Andreasen et al., 1997*). Diese Erkenntnisse waren auch den Weiterentwicklungen experimenteller Mausmodelle aus den 1990er Jahren zu verdanken (*Andreasen et al., 1997*).

Im Mausmodell führen Gendefekte bei Plasminogen, uPA bzw. tPA, PAI-1 und uPAR zu Thrombose, verzögerter Wundheilung, reduzierter Fertilität, erhöhter Infektneigung und reduzierter Lebenserwartung (*Bugge et al., 1996*). Dies ist ein Hinweis auf die pleiotropen physiologischen Funktionen des Urokinase-Systems. Gerade in Prozessen, in denen das Gewebe über extrazelluläre Proteolyse ständig erneuert und umgebaut wird (z.B. Plazentaentwicklung, postlaktationelle Brustinvolution), spielt das uPA-System im physiologischen *Tissue Remodeling* eine entscheidende Rolle (*Irigoyen et al., 1999; Crippa, 2007*).

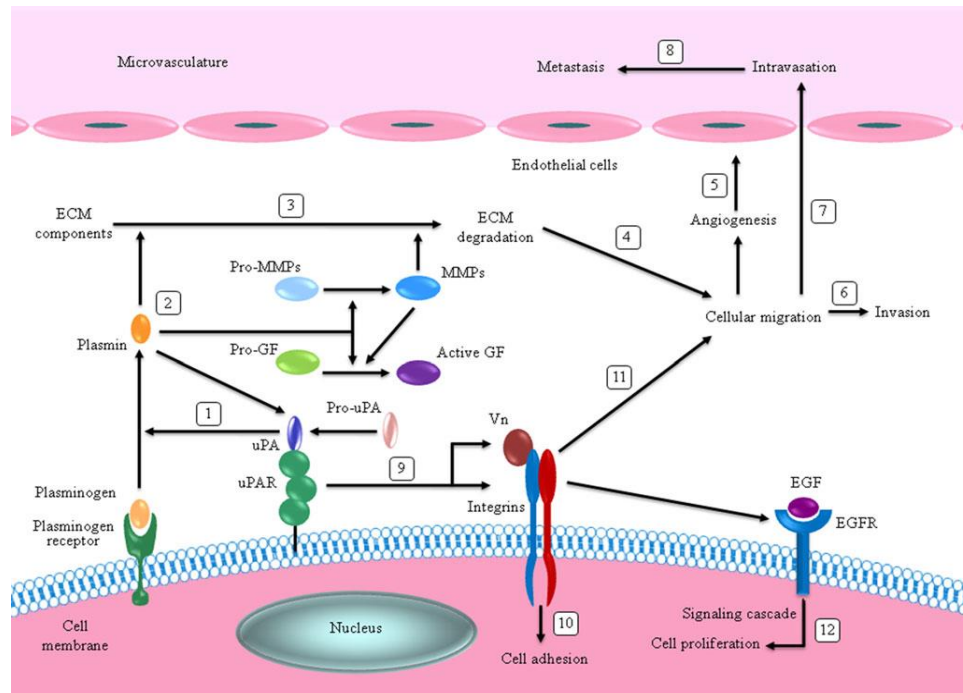


Abbildung 1: Das uPA-System und seine Interaktion im Tumor-Mikromilieu.

(1) Über uPA, welches an uPAR gebunden ist, findet die Umwandlung von membrangebundenem Plasminogen zu Plasmin statt. (2) Plasmin induziert die Umwandlung von pro-uPA zu uPA, die Aktivierung von MMPs (Matrix-Metalloproteasen) und Wachstumsfaktoren (GF: *growth factor*, Pro-GF: inaktive Vorstufe von GF), sowie die proteolytische Spaltung von ECM-Bestandteilen. (3) Plasmin und MMPs degradieren die extrazelluläre Matrix. (4) Durch ECM-Abbau wird die Migration von Endothelzellen, Muskelzellen, Immunzellen und Tumorzellen gefördert, was zur Angiogenese (5), Zellinvasion (6) und Intravasation ins Gefäßsystem (7) mit Metastasierung (8) beiträgt. (9) uPAR interagiert mit membranständigen Adhäsionsmolekülen, wie Integrinen und Vn (Vitronectin), unter Regulierung von Zelladhäsion (10), Zellmigration (11) und Zellproliferation (12) über Stimulierung der EGFR-Signalkaskade (*epidermal growth factor receptor*, epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor). Nicht dargestellt sind PAI-1 und PAI-2, eine mögliche Bindung von pro-uPA an uPAR, sowie eine Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden durch Internalisierung des uPAR-uPA-PAI-1-Komplexes (aus *Mekkawy et al., 2014*).

Neben seiner tumorbiologischen Rolle ist das Urokinase-System auch an zahlreichen anderen pathophysiologischen Prozessen beteiligt. So beeinflusst das Urokinase-System u.a. chronische Entzündungen wie Asthma bronchiale oder chronisch obstruktive Lungenerkrankungen (*Flemmig und Melzig, 2012; Fuhrman, 2012; Schuliga et al., 2013*). Aus den vielseitigen physiologischen und pathophysiologischen Zusammenhängen ergibt sich die Schwierigkeit einer gezielten pharmakologischen Intervention, speziell im Rahmen der Entwicklung neuer Tumortherapeutika.

1.1.1.1. uPA

Die Serinprotease uPA (A- und B-Kette, $M_r \approx 53$ kDa) besteht in ihrer aktiven Form aus zwei Polypeptidketten, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die N-terminale A-Kette enthält eine sogenannte *growth factor domain*, welche strukturelle Ähnlichkeiten zum epidermalen Wachstumsfaktor (EGF, *epidermal growth factor*) aufweist, eine *kringle domain*, die Interaktionen mit Komponenten der extrazellulären Matrix vermittelt, und eine *interdomain linker* Region (Duffy, 2004). Die C-terminale B-Kette umfasst das katalytische Zentrum mit der katalytischen Triade, bestehend aus den Aminosäuren Serin, Asparaginsäure und Histidin (Stepanova und Tkachuk, 2002). Das katalytische Zentrum stellt die Inhibitor-Bindungsstelle dar. Wie viele Serinproteasen wird uPA als einkettige inaktive Vorstufe pro-uPA translatiert und durch Spaltung einer Peptidbindung zwischen Lysin 158 und Isoleucin 159 in die aktive zweikettige *high molecular weight* Form von uPA (HMW-uPA) überführt. Diese Reaktion wird v.a. durch Plasmin katalysiert. Andere Proteasen wie Cathepsin B, Cathepsin L, Trypsin oder Kallikrein-ähnliche Peptidasen spalten ebenso zwischen Lysin 158 und Isoleucin 159 und tragen so zur Bildung von aktivem HMW-uPA bei (Duffy, 2004; Beaufort et al., 2010; Mekkawy et al., 2014). HMW-uPA hat eine um mindestens 250-fach höhere Enzymaktivität als die einkettige zymogene Vorstufe pro-uPA (Petersen et al., 1988). Durch Plasmin bzw. durch die oben genannten Proteasen wird pro-uPA extrazellulär in löslicher Form und membrangebunden über die spezifische Bindung an den uPA-Rezeptor in die aktive Form überführt (Crippa, 2007).

Die Protease Plasmin hat eine geringe Substratspezifität. Durch proteolytische Spaltung kann Plasmin die katalytisch-aktive zweikettige *high molecular weight* Form von uPA in die sogenannte aktive zweikettige *low molecular weight* Form von uPA (LMW-uPA) überführen (Stepanova und Tkachuk, 2002). LMW-uPA enthält das aktive katalytische Zentrum der B-Kette. Die *interdomain linker* Region verbleibt über eine Disulfidbrücke mit der B-Kette verknüpft. Da die B-Kette das katalytische Zentrum beinhaltet, ist die proteolytische Aktivität von LMW-uPA vergleichbar mit der Aktivität des zweikettigen HMW-uPA (Stepanova und Tkachuk, 2002). Das abgespaltene inaktive aminoternale Fragment (ATF) umfasst die *growth factor domain* und die *kringle domain*. ATF hat wegen des Fehlens der katalytischen Einheit keine Protease-Eigenschaften. Da die *growth factor domain* die Bindungsstelle für den uPA-Rezeptor umfasst, können neben ATF alle Formen von uPA, die die sogenannte *growth factor domain* enthalten, an den uPA-Rezeptor binden (pro-uPA, HMW-uPA) (Mekkawy et al., 2014). LMW-uPA kann trotz proteolytischer Aktivität wegen des Fehlens der *growth factor domain* nicht an den uPA-Rezeptor binden (Stepanova und Tkachuk, 2002).

uPA wird von zahlreichen Zellen produziert, insbesondere von Gefäßendothelzellen, Monozyten und Makrophagen, Fibroblasten, Epithelzellen, glatten Muskelzellen und von diversen Tumorzellen (Fuhrman, 2012).

Die Serinprotease tPA, ein weiterer Plasminogenaktivator, ist im Gegensatz zu uPA hauptsächlich an intravaskulären fibrinolytischen Prozessen beteiligt. Sezerniert von Gefäßendothelzellen, kommt es durch Bindung von tPA und Plasminogen an die Thrombusoberfläche zu einer Plasminaktivierung und somit zu einer direkten proteolytischen Spaltung von Fibrinpolymeren. tPA hat im Gegensatz zu uPA eine hohe Fibrin-Affinität. Somit bewirkt tPA eine fibrin-selektive thrombuslokalisierte Fibrinolyse (Schmitt et al., 2003; Flemmig und Melzig, 2012).

uPA ist eine Protease mit hoher Substratspezifität. Die bekannteste durch uPA katalysierte Enzymreaktion ist die Umwandlung von Plasminogen in die Serinprotease Plasmin, die im Vergleich zu uPA nur geringe Substratspezifität hat (Duffy und Duggan, 2004). Plasmin kann neben nativem Kollagen zahlreiche Proteine extrazellulär abbauen und somit einen Gewebeumbau initiieren. Über die Plasminvermittelte Aktivierung einer Vielzahl extrazellulärer Matrix-Metalloproteasen, wie MMP-3, MMP-9, MMP-12 und MMP-13, wird dieses *Tissue Remodeling* unterstützt (Duffy und Duggan, 2004). Plasmin selbst kann wiederum die Umwandlung von pro-uPA in aktives uPA katalysieren und somit seine aktive Bildung aufrechterhalten (Stepanova und Tkachuk, 2002). Des Weiteren kann Plasmin diverse Wachstumsfaktoren, wie HGF (*hepatocyte growth factor*), TGF β (*transforming growth factor beta*), IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) und FGF-2 (*fibroblast growth factor 2*) aktivieren und freisetzen (Duffy und Duggan, 2004). Über direkte Aktivierung von HGF und VEGF (*vascular endothelial growth factor*) spielt uPA eine wichtige Rolle in der Tumorangiogenese (Duffy et al., 1999). Diese multiplen Interaktionsmöglichkeiten beeinflussen Prozesse der Zellproliferation, Zellmigration, Zellinvasion und Angiogenese (Duffy und Duggan, 2004). Therapeutisch werden uPA und tPA beispielsweise zur akuten Thrombolyse bei Lungenembolie, beim akuten Myokardinfarkt, bei peripherer Gefäßembolie, beim ischämischen Apoplex oder bei retinaler Ischämie eingesetzt (Crippa, 2007).

1.1.1.2. PAI-1

PAI-1 gehört wie auch PAI-2 zu der Proteinklasse der Serpine (**Serin-Protease-Inhibitoren**) und fungiert neben PAI-2 über Bildung eines stöchiometrischen 1:1-Komplexes als wichtigster uPA-Inhibitor. Durch kovalente Bindung der „Suizid-Substrate“ PAI-1 bzw. PAI-2 im aktiven Zentrum der Serinprotease uPA kommt es zu

einer irreversiblen Enzymhemmung (*Stepanova und Tkachuk, 2002; Duffy und Duggan, 2004*). Als weitere spezifische uPA-Inhibitoren sind der sogenannte Protein-C-Inhibitor und die Protease Nexin-1 beschrieben, welche ebenfalls zu den Serpinen gehören (*Baker et al., 1980; Geiger et al., 1989*). PAI-1 ist ein einzelkettiges Glykoprotein ($M_r \approx 43$ kDa). Nach Bindung des uPA/PAI-1-Komplexes an uPAR kommt es zu einer Clathrin-vermittelten Internalisierung des ternären uPA/PAI-1/uPAR-Komplexes. Anschließend wird der ternäre uPA/PAI-1/uPAR-Komplex intrazellulär über Endozytose abgebaut. Während uPA und PAI-1 in den Lysosomen degradiert werden, wird der uPA-Rezeptor über Vesikel an die Zelloberfläche zurücktransportiert und somit recycelt (*Duffy und Duggan, 2004*). Diese Internalisierung erfolgt ausschließlich in Interaktion mit membranständigen Rezeptoren der LDLR-Familie (*low density lipoprotein receptor*-Familie), wie LRP (*low density lipoprotein receptor related lipoprotein*, Synonym: α_2 -Makroglobulin-Rezeptor) oder VLDLR (*very low density lipoprotein receptor*) (*Stepanova und Tkachuk, 2002*).

Vitronektin ist ein multifunktionelles Glykoprotein der extrazellulären Matrix, welches u.a. Kollagen, Plasminogen, uPA und PAI-1 binden kann. Durch die Bindung von PAI-1 an Vitronektin wird PAI-1 stabilisiert und vor spontaner extrazellulärer Inaktivierung geschützt (*Yasar Yildiz et al., 2014*). Über diesen Weg stellt PAI-1 auch eine Verbindung zu Adhäsionsmolekülen her und kann Zelladhäsion und Migration beeinflussen (*Duffy und Duggan, 2004*).

Hohe Konzentrationen von PAI-1 korrelieren in einer Vielzahl von malignen Tumoren mit einer schlechten Krankheitsprognose, u.a. im Mammakarzinom (*Duffy und Duggan, 2004; Mekkawy et al., 2014*). Interessanterweise wurde dabei auch nachgewiesen, dass PAI-1 durch Aktivierung endothelialer Mikropartikel mit prokoagulatorischen Eigenschaften die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin fördert (*Brodsky et al., 2002*). Thrombin seinerseits begünstigt die Entstehung von Fibrin, welches, lokalisiert an der Tumorzelloberfläche, die Tumorzelle einer Erkennung und einem Abbau durch das Immunsystem entzieht (*Mekkawy et al., 2014*). Das Wissen um die klassische Rolle der Inhibition von enzymatischer uPA-Aktivität durch PAI-1 sowie dem Stellenwert von PAI-1 als negativem prognostischen und prädiktiven Marker in zahlreichen malignen Tumoren mag auf den ersten Blick kontrovers erscheinen. Dieser Gegensatz lässt sich allerdings mit den multifunktionellen zellulären Einflüssen von PAI-1 und uPA auf diverse Signalkaskaden erklären. Die Signalkaskaden haben Einfluss auf das umgebende Tumor-Mikromilieu, auf die Hemmung von Apoptose und die Förderung von Angiogenese (*Yasar Yildiz et al., 2014*). PAI-1 ist aufgrund seiner vielseitigen Interaktionen also ein multifunktionelles Protein, dessen Funktion sich nicht auf die Inhibierung von uPA bzw. tPA beschränkt.

PAI-2 ist ebenfalls in einem stöchiometrischen 1:1-Komplex ein effektiver Inhibitor von uPA, agiert aber langsamer als PAI-1 mit uPA (Duffy und Duggan, 2004). PAI-2 wurde erstmalig im Plazentagewebe nachgewiesen, was seine ursprüngliche Bezeichnung als Plazenta-Typ Plasminogenaktivator-Inhibitor erklärt (Schmitt et al., 2008). Durch den Nachweis von PAI-2 in diversen anderen Gewebeentitäten ist diese ursprüngliche Bezeichnung heute kaum noch gebräuchlich. Bereits 2004 wurde von Duffy und Duggan beschrieben, dass Brustkrebspatienten mit erhöhten PAI-2-Konzentrationen ein verlängertes rezidivfreies Überleben und ein verlängertes Gesamtüberleben zeigen (Duffy und Duggan, 2004). Eine Überexpression von PAI-2 führt zu einer reduzierten Tumorzellmigration und Metastasierung (Croucher et al., 2008; Schroder et al., 2014). Eine Evaluierung der tumorbiologischen Eigenschaften von PAI-2 aus dem Jahre 2015 bestätigte, dass erhöhte PAI-2-Konzentrationen im Gegensatz zu uPA und PAI-1 beim Mamma- und Pankreaskarzinom mit einer verbesserten Krankheitsprognose und einer verringerten Tumorprogression einhergehen (Lee et al., 2015). Die prognostische Aussagekraft ist aber bei PAI-2 geringer als bei uPA und PAI-1 (Duffy und Duggan, 2004). PAI-2 kommt im Vergleich zu PAI-1 v.a. in seiner intrazellulären nicht-glykosylierten Form vor. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang, dass PAI-2 Annexin-vermittelt über Mikropartikel an die Zelloberfläche gelangt, dort extrazelluläres uPA erreicht und somit Tumorzellmigration, Invasion und Metastasierung reduziert (Schroder et al., 2014). Da sich die Rolle von PAI-2 wohl überwiegend auf intrazelluläre Prozesse beschränkt, können diese strukturellen Unterschiede von PAI-1 und PAI-2 die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse in der Tumorbiologie erklären (Lee et al., 2015).

1.1.1.3. uPAR und die Spleißvariante uPAR-del4/5

Der uPA-Rezeptor (uPAR), auch als CD87 bekannt, ist ein glykosyliertes, extrazelluläres Protein ($M_r \approx 55-60$ kDa), welches aus drei strukturell homologen Domänen (DI, DII und DIII) besteht. uPAR ist über einen Glykosylphosphatidylinositol-(GPI-)Anker an der Domäne III mit der Zellmembran verbunden (Duffy, 2004; Llinas et al., 2005). Der uPA-Rezeptor kann über die *composite binding site* von Domäne I und Domäne III alle Formen von uPA binden, die die sogenannte *growth factor domain* enthalten. Für eine hochaffine Ligandenbindung ist allerdings eine intakte 3-Domänen-Struktur Voraussetzung (Duffy, 2004; Blasi und Sidenius, 2010). Auch der Glykosylierungsgrad der Domäne I ist entscheidend für die uPA-Bindungsaffinität (Farthmann et al., 2004).

Das uPAR-Molekül wurde 1985 erstmals von *Vassalli et al. (1985)* als zellmembranständiger Rezeptor von uPA in Monozyten beschrieben. Im gesunden Organismus wird uPAR in vielen Geweben exprimiert, v.a. in Lunge, Herz, Thymus, Niere, Milz, Leber, Uterus, Hoden und in Blutzellen. Eine erhöhte uPAR-Expression wird in Geweben mit einem hohen Zellumsatz, wie in den Trophoblasten des Plazentagewebes und in Keratinozyten, beobachtet. Dabei sind Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Endothelzellen die vorherrschenden Zelltypen (*Blasi und Sidenius, 2010*). Auch unter pathophysiologischen Bedingungen, z.B. bei einer Infektion, Inflammation und insbesondere bei einer Vielzahl von malignen soliden und hämatologischen Tumorentitäten, ist eine Überexpression von uPAR nachgewiesen (*Mazar, 2008; Blasi und Sidenius, 2010*). Im Mammakarzinom sind hohe uPAR-Expressionswerte mit einer schlechten Prognose verbunden, wobei uPAR eine geringere prognostische Relevanz als uPA und PAI-1 hat (*Kotzsch et al., 2010*).

Das uPAR-Molekül kann durch uPA, Plasmin, MMPs, Elastase, Cathepsin G oder Chymotrypsin in der DI-DII Linker Region in ein lösliches DI-Fragment und in ein membrangebundenes DII/DIII-Fragment gespalten werden. Das DII/DIII-Fragment kann aufgrund des Fehlens von Domäne I kein uPA bzw. Vitronektin binden. Zudem entsteht nach proteolytischer Spaltung am GPI-Anker eine intakte lösliche Form des uPA-Rezeptors (suPAR, *soluble uPAR*). suPAR wurde vermehrt in der Blutzirkulation von Tumorpatienten nachgewiesen, wahrscheinlich als Konsequenz einer verstärkten Abspaltung von der Tumorzellmembran. Durch Interaktion von suPAR mit dem G-Protein gekoppelten Rezeptor FPRL1/LXA4R kann die chemotaktische Aktivität von suPAR erklärt werden (*Mekkawy et al., 2014*).

Von uPAR sind *in vitro* und *in vivo* unterschiedliche Glykosylierungsformen und Spaltprodukte mit verschiedenen Funktionen beschrieben (*Mekkawy et al., 2014*). Den einzelnen Spaltprodukten von uPAR (suPAR, membranständiges DII/DIII-Spaltprodukt, freies DII/DIII-Fragment, freies DI-Fragment) werden unterschiedliche (tumor-)biologische Funktionen sowie eine Signifikanz als Tumorbiomarker zugesprochen (*Blasi und Sidenius, 2010; Thurison et al., 2015*). So sind erhöhte Plasmakonzentrationen der verschiedenen uPAR-Spaltprodukte signifikant mit einer schlechten Prognose im kolorektalen Karzinom, Mamma-, Ovarial- und Prostatakarzinom assoziiert (*Taubert et al., 2013*).

Allgemein beruhen die Effekte von uPAR sowohl auf proteolytischen als auch auf nicht-proteolytischen Funktionen. uPAR vermittelt über rezeptorgebundenem uPA die Umwandlung von membrangebundenem Plasminogen in die Protease Plasmin. Dadurch ist uPAR ein wichtiger Mediator in perizellulären Proteolysemechanismen. Die über den membranständigen uPA-Rezeptor an die Zelloberfläche fokussierten Proteolysereaktionen laufen membrangebunden effektiver ab als in freier löslicher

Form (Plasminogen → Plasmin, pro-uPA → uPA). Unter dem Aspekt des ECM-Remodelings ist uPAR ein wichtiger Regulator von Tumorzellinvasion und Metastasierung (Blasi und Sidenius, 2010). uPAR kann durch Interaktion mit membranständigen Molekülen (z.B. EGFR, Rezeptoren der LDLR-Familie, Caveolin, Integrinen) bzw. Strukturen der extrazellulären Matrix auch unabhängig von einer uPA-Bindung bzw. rezeptorgebundener uPA-Aktivität diverse nicht-proteolytische Funktionen ausüben. Über Interaktion mit Vitronektin und Adhäsionsrezeptoren der Integrinfamilie (β_1 -, β_2 -, β_3 - Integrin) kann uPAR intrazelluläre Signalkaskaden modulieren und somit Einfluss auf Zelladhäsion, Migration und Proliferation nehmen (Mekawy et al., 2014).

Zusammenfassend kann uPAR über Aktivierung von extra- und intrazellulären Signalkaskaden sowohl unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Bedingungen im Hinblick auf *Tissue Remodeling*, Zellproliferation und Zellmigration als multifunktionaler Rezeptor angesehen werden.

Nicht nur auf Proteinebene, sondern auch mittels posttranskriptionalem alternativen Spleißens können verschiedene mRNA-Varianten des uPA-Rezeptors entstehen (Abb. 2). Das uPAR-Gen, lokalisiert auf Chromosom 19, besteht aus sieben Exons und sechs Introns unterschiedlicher Länge, verteilt auf eine genomische DNA-Länge von 23 kb. Exon 1 kodiert eine lipophile Signalpeptidsequenz, beinhaltet aber v.a. nicht-kodierende Gensequenzen. Exon 2 und 3, Exon 4 und 5 bzw. Exon 6 und 7 kodieren für die Domänen I, II bzw. III (Casey et al., 1994). Casey identifizierte bereits 1994 eine uPAR-Spleißvariante ohne Exon 5 in der kodierenden uPAR-mRNA (uPAR-del5) (Casey et al., 1994). Dadurch fehlen dem Protein strukturelle Anteile der Domäne II. 2003 wurde eine weitere Spleißvariante von uPAR identifiziert, uPAR-del4/5, mit einer Deletion von Exon 4 und 5 und somit einer auf Proteinebene fehlenden Domäne II (Luther et al., 2003).

Bei uPAR-del4/5 kommt es also zu einer Fusion von Domäne I und III im uPAR-del4/5 Protein. Da für eine Ligandenbindung alle drei homologen Domänen des uPAR-Proteins notwendig sind, können uPA und auch das ECM-Protein Vitronektin nicht mehr binden (Kotzsch et al., 2011a; Sato et al., 2011). Sowohl die über uPA an die Zelloberfläche fokussierte extrazelluläre proteolytische Aktivität als auch die uPA-vermittelte Interaktion mit membrangebundenen Integrinen werden dadurch beeinflusst und verändern das Verhalten von malignen Tumorzellen.

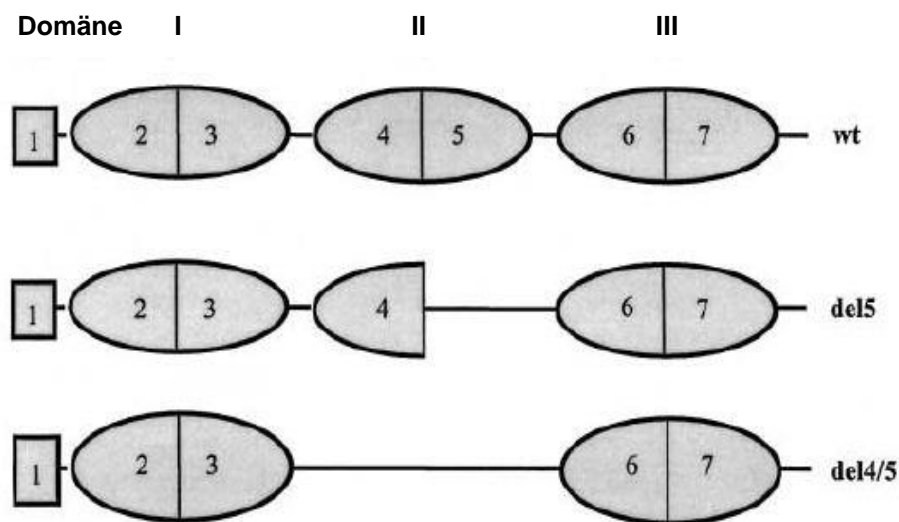


Abbildung 2: Schematische Darstellung von mRNA-Spleißvarianten des uPA-Rezeptors. (wt) uPAR Wildtyp-mRNA mit Exon 1 und den jeweils für eine Protein-Domäne kodierenden Exonpaaren: Exon 2/3 → Domäne I, Exon 4/5 → Domäne II, Exon 6/7 → Domäne III. (del 5) uPAR mRNA-Spleißvariante ohne Exon 5 der Domäne II. (del4/5) uPAR mRNA-Spleißvariante ohne Exon 4 und 5 und vollständigem Verlust der Domäne II (Abbildung modifiziert nach *Luther et al., 2003*).

In uPAR-del4/5 überexprimierenden Mammakarzinomzelllinien (MDA-MB-231, MCF-7, MDA-MB-435, CAMA1) und in der uPAR-del4/5 überexprimierenden Ovarialkarzinomzelllinie OVMZ-6 waren bei gleichbleibender Zellproliferation eine signifikant reduzierte Zelladhäsion und Zellinvasion nachweisbar, zusammen mit einer verringerten Lungenmetastasierung im *in vivo* Mausmodell (*Sato et al., 2011*). Hohe uPAR-del4/5 mRNA-Expressionswerte im Tumorgewebe von Brustkrebspatienten korrelierten mit einer schlechten Krankheitsprognose und einem kürzeren *disease-free survival* (*Luther et al., 2003; Kotzsch et al., 2005; Kotzsch et al., 2008*). Die mRNA-Spleißvariante uPAR-del4/5 ist neben uPA/PAI-1 und uPAR als unabhängiger prognostischer Marker im Brustkrebs anzusehen (*Kotzsch et al., 2011a*). Ebenso sind hohe mRNA-Expressionswerte von uPAR-del4/5 (und PAI-1) in R₀-resezierten Patienten mit Weichteilsarkomen signifikant mit einem 19-fach erhöhten Risiko für einen tumorbedingten Tod assoziiert (*Kotzsch et al., 2011a*). Im fortgeschrittenen Ovarialkarzinom konnte allerdings keine prognostische Relevanz von uPAR-del4/5 nachgewiesen werden (*Kotzsch et al., 2011b*).

1.1.1.4. Das GTP-bindende Protein Rab31

Das Protein Rab31 ($M_r \approx 22$ kDa) als Mitglied der Rab-GTPasen wurde 2008 in uPAR-del4/5 überexprimierendem Brustkrebsgewebe anhand von Microarray-Analysen als eines von sieben tumorassoziierten Genen identifiziert (neben Cadherin-11, TIMP-3, Dermatopontin, Homeobox B6, Tropomyosin-1 und *olfactomedin-like protein*) (Kotzsch et al., 2008). Rab31 hat sich neben uPAR-del4/5 in Brustkrebspatienten ohne Lymphknotenmetastasierung und ohne adjuvante Chemotherapie als unabhängiger prognostischer Marker erwiesen (Kotzsch et al., 2008). Hohe Rab31 mRNA-Expressionswerte waren analog zu uPAR-del4/5 signifikant mit einer schlechten Prognose assoziiert. Dieses Ergebnis stimmt mit der Annahme aus früheren Studien überein, dass Rab-Proteine über intrazelluläre Signalkaskaden unter Beteiligung von Integrinen und Wachstumsfaktoren (z.B. EGF) Zelladhäsion, Proliferation und Migration von Tumorzellen beeinflussen. Hervorzuheben ist, dass in der Studie von Kotzsch et al. (2008) die schlechteste Prognose in der Untergruppe zu finden war, in der sowohl Rab31 als auch uPAR-del4/5 überexprimiert waren. Insgesamt stellen beide Faktoren einen unabhängigen prognostischen Marker im Mammakarzinom dar, wobei bei einer Überexpression von beiden Faktoren additive Effekte bezüglich der prognostischen Relevanz zu sehen sind (Kotzsch et al., 2008).

Die Gruppe der Rab-Proteine (*Ras-related-proteins in brain*) stellt im Vergleich zu den vier weiteren Untergruppen (Ras, Rho, Arf/Sar und Ran) die größte Untergruppe der Ras-Superfamilie dar, wobei im menschlichen Organismus ca. 70 verschiedene Rab-Proteine identifiziert wurden (Mitra et al., 2011). Rab-Proteine sind kleine monomere GTP-bindende Proteine (G-Proteine) mit einer Molekülmasse von 20-25 kDa, die mit ihrer intrinsischen GTPase Funktion die hydrolytische Umwandlung von GTP zu GDP katalysieren. Über GTPase-aktivierende Proteine (GAPs, *GTPase-activating proteins*) wird die Hydrolyse der aktiven, GTP-gebundenen Form in die inaktive, GDP-bindende Form katalysiert. Sogenannte GEFs (*guanine-nucleotide-exchange factors*, GTP-Austauschfaktoren) katalysieren die Aktivierung zur GTP-gebundenen Form. Zudem werden Rab-Proteine durch kovalente Bindung von Geranyl-Geranylresten an C-terminale Cysteinreste posttranslational modifiziert. Dadurch werden die Rab-Proteine mit einem lipophilen Prenyl-Anker versehen, der die Koppelung an die Zielmembran ermöglicht. Lokalisiert in spezifischen subzellulären Kompartimenten, können Rab-Proteine in ihrem aktiven, GTP- und membrangebundenen Zustand mit einer Vielzahl von Effektormolekülen in Interaktion treten und diverse endo- und exozytische Signaltransduktionswege regulieren (Pfeffer, 2017). Rab-Proteine sind v.a. an der Regulierung des intrazellulären Vesikel- bzw. Membrantransportes beteiligt (Mitra et al., 2011).

Rab31, auch bekannt als Rab22B, ist hauptsächlich im Trans-Golgi-Netzwerk und in den Endosomen lokalisiert (Grismayer et al., 2012). Neben einer Beteiligung am Vesikeltransport zwischen Golgi-Apparat sowie frühen und späten Endosomen spielt Rab31 als Modulator von intrazellulären Signalwegen (z.B. EGF-Rezeptor, Mannose-6-Phosphat-Rezeptor) eine wichtige Rolle. Dysfunktionen bzw. Dysregulationen dieser komplexen und sensiblen Signalkaskaden sind in Zusammenhang mit Immundefekten und neurologischen Störungen beschrieben (Grismayer et al., 2012). Auch auf Proteinebene haben Untersuchungen in Rab31 überexprimierenden Brustkrebszellen tumorfördernde Eigenschaften von Rab31 gezeigt. Der exakte molekulare Mechanismus bzw. eine mögliche Verknüpfung zum uPA-System, insbesondere zu uPAR-del4/5, ist aktuell Gegenstand weiterer Untersuchungen (Grismayer et al., 2012). Das mRNA-Bindungsprotein HuR (*human antigen R*) wird als möglicher Verknüpfungspunkt zwischen der Expression von Rab31 und uPAR bzw. uPAR-del4/5 betrachtet. Hohe Expressionswerte dieser drei Faktoren waren in Untersuchungen mit einer schlechten Prognose von Brustkrebspatienten assoziiert. Das HuR-Protein dient vermutlich als Stabilisator der mRNA-Transkripte von Rab31 und uPAR-del4/5 (Grismayer et al., 2012; Chua und Tang, 2015). Hervorzuheben ist an dieser Stelle, dass Rab31 keine direkte Komponente des Urokinase-Systems ist, allerdings aufgrund seiner bisher bekannten tumorbiologischen Eigenschaften in engem Zusammenhang mit dem uPA-System steht, insbesondere mit uPAR-del4/5.

1.1.2. Komponenten des Urokinase-Systems als Biomarker einer individualisierten Tumorthherapie

Umfangreiche Untersuchungen der letzten Jahrzehnte haben gezeigt, dass das uPA-System mit seinen multifunktionellen Komponenten eine entscheidende Rolle in Tumorprogression, Tumordinvasion und Metastasierung spielt. Neben dem Mammakarzinom konnte bei einem breiten Spektrum an malignen Tumorerkrankungen, u.a. beim Ovarial-, Magen-, Lungen- und kolorektalem Karzinom, sowie beim Weichteilsarkom, nachgewiesen werden, dass hohe Expressionswerte von Komponenten des Urokinase-Systems, insbesondere von uPA und PAI-1, mit einer hohen Tumoraggressivität und einer schlechten klinischen Prognose verbunden sind (Duffy und Duggan, 2004; Kotzsch et al., 2005; Taubert et al., 2013).

uPA und PAI-1 waren die ersten tumorbiologischen Faktoren, denen beim Brustkrebs hinsichtlich ihres klinischen Nutzens das höchste *Oxford Level of Evidence*, *Level of Evidence Typ 1 (LoE1)*, zugeschrieben wurde (Harbeck et al., 2004). Dabei wurde u.a. in der sogenannten Chemo N₀-Studie gezeigt, dass im primären Mamma-

karzinom ohne Lymphknotenbefall (LNN, *lymph node negative*) anhand von uPA und PAI-1 zwischen einer Hochrisiko- und einer Niedrigrisikogruppe stratifiziert werden kann. Die Entscheidung für oder gegen eine adjuvante Chemotherapie bzw. endokrine Therapie kann mit Hilfe des uPA- bzw. PAI-1 Status individualisiert werden (Harbeck et al., 2013; Duffy et al., 2017). Im Vergleich zu Patientinnen mit hohen uPA-/PAI-1 Expressionswerten haben LNN-Patienten mit niedrigen uPA-/PAI-1 Werten eine gute Prognose und würden daher nicht von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren, welche zudem die Lebensqualität empfindlich beeinträchtigt (Harbeck et al., 2004; Harbeck et al., 2013; Gouri et al., 2016; Duffy et al., 2017). In Übereinstimmung mit den Empfehlungen des St. Gallen Konsensus erhalten aktuell mehr als 90% der LNN-Patienten eine adjuvante systemische Chemotherapie, obwohl nach primärer Operation bei nur etwa 30% der LNN-Patienten ein Rezidiv zu beobachten ist (Gouri et al., 2016). Somit profitieren nach den Ergebnissen der Chemo N₀-Studie nur etwa 5% der Kandidaten von einer adjuvanten Chemotherapie (Harbeck et al., 2004; Gouri et al., 2016).

Die EGTM (**E**uropean **G**roup on **T**umor **M**arkers), die NACB (**N**ational **A**cademy of **C**linical **B**iochemistry) und die ASCO (**A**merican **S**ociety of **C**linical **O**ncology) empfehlen seit 2007 die Antigenbestimmung von uPA und PAI-1 im primären Tumorgewebe, insbesondere bei neudiagnostizierten LNN-Brustkrebspatienten. Unter Evaluierung der Krankheitsprognose kann hiermit eine Risikostratifizierung durchgeführt werden, die eine personalisierte Entscheidung für oder gegen eine adjuvante Chemotherapie ermöglicht (Duffy und Crown, 2008; Schmitt et al., 2010; Gouri et al., 2016).

Prognostische Faktoren sind definiert als Parameter, die zu einem bestimmten Zeitpunkt (meist bei Erstdiagnose der Krankheit) mit dem krankheitsfreien Überleben oder dem Gesamtüberleben, d.h. mit dem natürlichen Krankheitsverlauf, korrelieren, sofern keine weitere Therapie erfolgt (angelehnt an die Definition der AGO e.V., **A**rbeitsgemeinschaft **G**ynäkologische **O**nkologie e.V.). Sie erlauben im Patientenkollektiv eine frühzeitige individuelle Risikoeinstufung und ermöglichen somit für Hochrisikopatienten eine schnelle und zielorientierte Therapie. Zu den Standard-Prognosefaktoren des Mammakarzinoms zählen u.a. das Alter des Patienten, die Tumorgroße, der Differenzierungsgrad und der Lymphknotenstatus. Die prognostische Aussagekraft von uPA und PAI-1 beim Mammakarzinom ist im Vergleich zu den Standard-Prognosefaktoren als stärker einzustufen (Duffy und Duggan, 2004). Neben uPA und PAI-1 beim Mammakarzinom gehören das α -Fetoprotein, das humane Choriongonadotropin und die Laktat-Dehydrogenase beim nichtseminomatösen Hodentumor des Mannes zu den am besten evaluierten Prognosefaktoren. Als weitere serumbasierte prognostische Faktoren sind beim Prostatakarzinom das Prostataspezifische Antigen (PSA), beim Kolonkarzinom das Carcinoembryonale

Antigen (CEA) bzw. beim Ovarialkarzinom das *Cancer-Antigen 125* (CA-125) zu nennen (Duffy und Crown, 2008). Durch Bestimmung unabhängiger prognostischer Faktoren kann anhand eines risikoadaptierten, patientenbezogenen und individuellen Therapiemanagements gezielt die weitere Tumorthherapie festgelegt werden (Harbeck et al., 2004).

Neben prognostischen Faktoren sind für ein individuelles Therapiemanagement prädiktive Faktoren entscheidend, die den individuellen Nutzen einer spezifischen Therapie anzeigen können. Prädiktive Faktoren sind definiert als Parameter, die das Ansprechen bzw. eine Resistenz auf eine spezifische Therapie vorhersehbar machen (angelehnt an die Definition der AGO e.V.). Aktuell sind in der Brustkrebstherapie zwei prädiktive Marker in klinischer Anwendung: der Hormonrezeptorstatus (Östrogen- bzw. Progesteronrezeptor-Expression) und der HER2-Status (HER2-Expression, *human epidermal growth factor receptor 2*). Ein positiver Hormonrezeptorstatus ist prädiktiv für das Ansprechen einer antihormonellen Therapie (z.B. Tamoxifen, Anastrozol), während ein positiver HER2-Status mit dem Ansprechen auf die anti-HER2-Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab/Herceptin® korreliert (Duffy und Crown, 2008). Unabhängig vom Hormonrezeptorstatus haben sich im fortgeschrittenen Mammakarzinom hohe uPA- und PAI-1-Expressionen als prädiktiv für eine Resistenz gegenüber Tamoxifen erwiesen (Duffy und Duggan, 2004).

Die Entwicklung von Medikamenten, welche gezielt das uPA-System beeinflussen, ist von besonderem Interesse in der pharmazeutischen Forschung (Su et al., 2016). Es wird die Suppression des uPA-Systems sowohl auf Ebene der Genexpression als auch mittels direkter Blockade von entscheidenden Faktoren wie uPA, uPAR oder PAI-1 durch Antikörper oder sogenannte *small molecules* diskutiert (Mekkawy et al., 2014). Der *small molecule* Inhibitor WX-UK1, ein 3-Amidinophenylalanin basierender uPA-Inhibitor, und seine Vorstufe Upamostat (Mesupron®, WX-671) wurden bisher erfolgreich in Phase-I- und Phase-II-Studien untersucht (Schmitt et al., 2010; Mekkawy et al., 2014). Auch uPAR stellt eine interessante Zielstruktur in der Entwicklung neuer medikamentöser Tumorthapien dar (Montuori et al., 2016).

Unter Einbeziehung der prognostischen und prädiktiven Eigenschaften nicht nur von uPA und PAI-1 im Mammakarzinom, sondern auch von speziellen Biomarkern in anderen Tumorentitäten, hat sich in den letzten Jahren in der modernen Tumorthherapie ein personalisiertes Therapiemanagement entwickelt. Durch Einsatz gezielter Therapien können Kosten und Nebenwirkungen reduziert und der größtmögliche individuelle Nutzen herausgestellt werden (Gouri et al., 2016).

1.2. Das (Tumor-)Protease-System der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen

Das Urokinase-System interagiert unter (patho-)physiologischen Bedingungen mit einer Vielzahl weiterer extrazellulärer Proteolyse-Systeme (Abb. 3). Diese Systeme interagieren untereinander in einem komplexen Netzwerk, bestehend aus diversen Proteasen, deren Inhibitoren und einer Vielzahl von Regulatoren und Mediatoren. Ein System dieses Protease-Netzwerkes ist neben dem uPA-System die Familie der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen (hKLKs = *human tissue kallikrein-related peptidases*), bestehend aus 15 verschiedenen Serinproteasen (KLK1-15) (Dong et al., 2014). Über KLK2, KLK4, KLK5, KLK6, KLK8 und KLK12 besteht eine Verbindung zum uPA-System, da diese KLKs die Umwandlung von pro-uPA in aktives uPA katalysieren können (Beaufort et al., 2010; Mason und Joyce, 2011).

Die Kallikrein-ähnlichen Peptidasen haben je nach proteolytischer Aktivität Trypsin- oder Chymotrypsin-ähnliche Substrateigenschaften (Dong et al., 2014). Co-exprimierte KLKs können möglicherweise auch katalytische Kaskaden bilden. Die Aktivierung dieser katalytischen Kaskaden kann in einer Vielzahl von Geweben ablaufen, wobei sich gewebespezifische Assoziationen gezeigt haben (Dong et al., 2014). Neben KLK3, welches auch als PSA (Prostata-spezifisches Antigen) bekannt ist, sind v.a. KLK2, KLK4, KLK11 und KLK15 im Prostatagewebe exprimiert und unter physiologischen Bedingungen durch Hydrolyse von Seminogelin an der Samenverflüssigung beteiligt (Lilja, 1985; Shaw und Diamandis, 2007). Dagegen werden KLK6 und KLK8 mit neuronaler Plastizität im zentralen Nervensystem assoziiert. KLK5-8 und KLK14 werden vorwiegend in der Haut exprimiert (Dong et al., 2014).

Neben KLK5 und KLK14 ist KLK7, auch bekannt als hSCCE (*human stratum corneum chymotryptic enzyme*), an der Abschuppung der obersten Hornhautschicht beteiligt (Brattsand et al., 2005). KLK5 und KLK7 spalten in der äußeren Epidermis die Zelladhäsionsproteine Corneodesmosin und Plakoglobin und initiieren unter Proteolyse der Corneodesmosomen die Abschuppung der äußeren Hautschicht (Dong et al., 2014). KLK7 ist das Endglied einer komplex regulierten Protease-kaskade im *stratum corneum*, hauptsächlich bestehend aus KLK5, KLK7 und KLK14. Pro-KLK7 kann durch KLK5 aktiviert werden, KLK5 wiederum wird durch KLK14 in die aktive Form überführt (Brattsand et al., 2005). Dysfunktionen von KLK7 sind u.a. in der Pathogenese der Psoriasis und der Neurodermitis beschrieben (Ekholm und Egelrud, 1999; Komatsu et al., 2007).

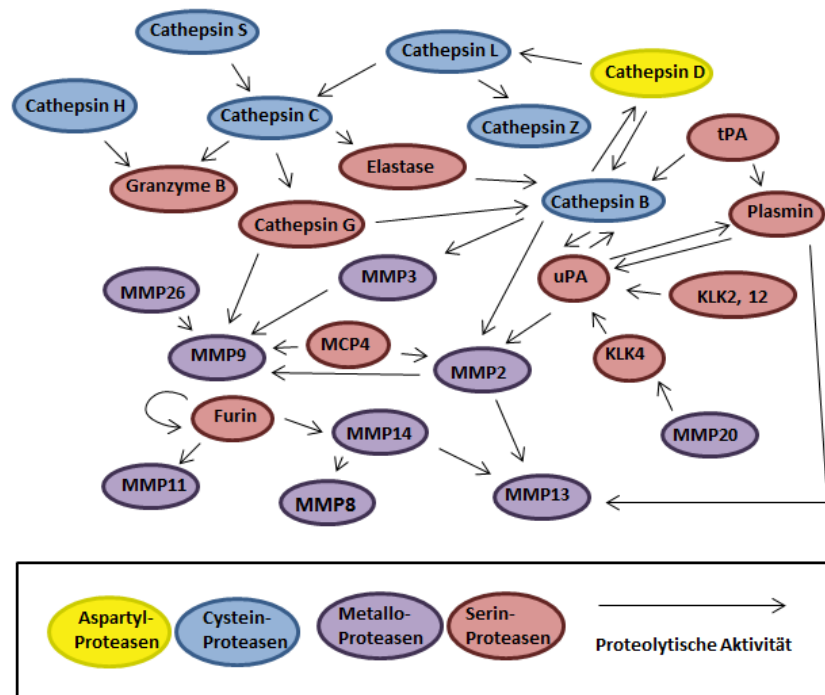


Abbildung 3: Das Urokinase-System und die Kallikrein-ähnlichen Peptidasen als Komponenten eines komplexen proteolytischen Tumor-Netzwerkes. Komponenten des Urokinase-Systems (dargestellt uPA, tPA, Plasmin) interagieren multidirektional mit weiteren Protease-Familien (Aspartyl-, Cystein-, Metallo-, Serinproteasen), u.a. mit Kallikrein-ähnlichen Peptidasen (dargestellt KLK2, KLK4, KLK12) und diversen MMPs. Multiple Eintrittspunkte in die koordinativen Kaskadenmechanismen sind möglich. Einige Komponenten stellen Schlüsselpositionen in der Regulation und Modulation von proteolytischer Aktivität dar (MCP-4, *monocyte chemotactic protein-4*) (Abbildung modifiziert nach *Mason und Joyce, 2011*).

Den Kallikrein-ähnlichen Peptidasen wird auch in der Tumorphathogenese eine tragende Rolle zugeschrieben. KLKs werden in diversen Tumorentitäten exprimiert, u.a. in Karzinomen von Prostata, Hoden, Ovar, Brust, Lunge, Kolon, Pankreas, Niere und Gehirn (*Schmitt und Magdolen, 2009*). KLK7 ist mit dem Mamma- und Ovarialkarzinom assoziiert (*Holzscheiter et al., 2006; Dorn et al., 2011; Dorn et al., 2015*). Im Prostatakarzinom ist insbesondere KLK3 (PSA, Prostataspezifisches Antigen) als potenter prognostischer und prädiktiver Biomarker etabliert (*Schmitt und Magdolen, 2009*). Zur Verbesserung des klinischen Therapiemanagements im Sinne einer personalisierten Tumorthherapie ist die Suche nach weiteren Biomarkern von entscheidender Bedeutung (*Holzscheiter et al., 2006; Schmitt und Magdolen, 2009*).

1.3. Sphäroid-Mikrotumormodelle

1.3.1. Hintergründe und Methoden

Zellen im menschlichen Organismus, auch Tumorzellen, interagieren mit Nachbarzellen und Komponenten der extrazellulären Matrix. Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte formen ein komplexes Kommunikationsnetzwerk, welches sowohl für physiologische als auch für pathophysiologische Zellprozesse von entscheidender Bedeutung ist. Zwei Komponenten dieses Kommunikationsnetzwerkes, das Urokinase-System bzw. die Kallikrein-ähnlichen Peptidasen, sind bereits vorgestellt worden. Neben den vielseitigen Zellkontakten findet im extrazellulären Milieu auch ein reger Transport und Austausch von Hormonen, Nährstoffen, Sauerstoff und Stoffwechselprodukten statt (*Lin und Chang, 2008*). Dieses „Zell-Environment“ ist kein starres Gerüst, sondern stellt unter Beteiligung einer Vielzahl von verschiedenen Zelltypen und Mediatorsubstanzen ein belebtes, dreidimensionales System dar. Diese (tumor-)biologische Zellumgebung kann folglich in dreidimensionalen Zellkulturtechnologien besser reflektiert werden als in konventionellen zweidimensionalen Monolayerzellkulturen (*Hutmacher et al., 2010*).

Bereits 1985 beobachteten Miller und Mitarbeiter, dass Tumorzellen in einer Kollagenmatrix als multizelluläre dreidimensionale Zellaggregate, auch genannt Sphäroide, eine höhere Therapieresistenz als Zellen aus einer konventionellen Monolayerkultur aufweisen (*Miller et al., 1985*). Später stellten Bissell und Radisky fest, dass dreidimensionale Brustkrebszellen, kultiviert in einer synthetischen extrazellulären Matrix (Matrigel®), vollständig ihre Gestalt verändern und unorganisierte Zellaggregate formen, ähnlich dem Prozess einer *in vivo* Tumorphysion (*Bissell und Radisky, 2001; Hutmacher et al., 2010*).

Seither ist die Technologie von dreidimensionalen Tumorsphäroiden und deren Einsatz in der biomedizinischen Forschung weiter vorangeschritten. Nach wie vor wird allerdings die überwiegende Zahl von tumorbiologischen Studien *in vitro* in zweidimensionalen Monolayerzellkulturen durchgeführt. Eine Medline-Analyse von Hutmacher aus dem Jahre 2010 ergab, dass noch in ca. 70-80% der Fälle 2D-Techniken benutzt werden (*Hutmacher, 2010*). Hierbei werden Tumorzellen an der Oberfläche von Plastikzellkulturflaschen gezüchtet. 2D-Zellkulturen sind in der Durchführung relativ kostengünstig und bei schnell proliferierenden Zellen steht regelmäßig ein breiter Pool an Zellen für weitere Analysen zur Verfügung. Neben genetischen Modifikationsmöglichkeiten können relativ einfach funktionelle Assays zur Untersuchung von Zellmorphologie, Migration, Invasion und Zellproliferation durchgeführt werden (*Dong et al., 2012*). Zu betonen ist ebenso, dass 2D-

Zellkulturmodelle trotz aller Limitierungen in den letzten Jahrzehnten entscheidende Beiträge zum grundlegenden Verständnis der heutigen Tumorbiologie und deren molekularen Grundprinzipien geliefert haben.

Durch die Charakterisierung und das funktionelle Verständnis der extrazellulären Matrix ist die Wissenschaft jedoch deutlich in Richtung 3D-Zelltechnologie gelenkt worden (*Dong et al., 2012; Antoni et al., 2015*). Gerade in den letzten zehn Jahren wurde in der Tumorforschung die Analyse des sogenannten Tumor-Mikromilieus (*tumor microenvironment*) im Hinblick auf Tumorprogression und Metastasierung immer bedeutsamer. Daher war es von großem Interesse, das *in vivo* Tumor-Mikromilieu für weitere Experimente *in vitro* bestmöglich zu reproduzieren. Unter möglichst exakter Nachstellung der *in vivo* Tumorsituation sollen *in vitro* detailliertere Resultate bezüglich Tumorentwicklung, Metastasierungsprozess, Angiogenese, Morphogenese, Tumorinvasion und Chemosensitivität erzielt werden (*Dong et al., 2012; Antoni et al., 2015*).

In 3D-kultivierten Tumorzellen konnte eine zu 2D-Monolayerzellen abweichende metabolische Stoffwechselaktivität nachgewiesen werden (*Hutmacher et al., 2010*). 3D-Zellen zeigten hierbei unter Zunahme der Glykolyseaktivität eine erhöhte Laktatproduktion. Auch in Genexpressionsanalysen ergaben sich im direkten Vergleich von 2D- und 3D-Zellkultur Unterschiede im Expressionsmuster (*Timmins et al., 2004; Feder-Mengus et al., 2008; Hutmacher et al., 2010; Loessner et al., 2010*). Chemokine (z.B. Interleukin-8) und wichtige Mediatoren der Angiogenese (VEGF, Angiopoietin, Hypoxie-induzierter Faktor 2) waren ähnlich dem Expressionsmuster in Tumorgewebe in 3D-Tumorzellaggregaten deutlich höher exprimiert als in 2D-Tumorzellen (*Hutmacher et al., 2010*).

Neben einer reduzierten Apoptose-Sensitivität zeigten 3D-Zellmodelle auch eine reduzierte Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika (*Frankel et al., 1997; Friedrich et al., 2007; Hirschhaeuser et al., 2010; Hutmacher et al., 2010*). Dies lässt darauf schließen, dass bisherige zweidimensional gestaltete Chemosensitivitäts-Assays (z.B. ATP-TCA-Assay, Koloniebildungsassay) nicht in jedem Fall die Verhältnisse *in vivo* widerspiegeln. Auch bei Untersuchungen mit den Ovarialkarzinomzelllinien OVMZ-6 und SKOV-3 zeigte sich im 3D-Zellmodell, basierend auf einer PEG-Hydrogelmatrix, eine niedrigere Chemosensitivität gegenüber Paclitaxel (Überlebensrate 40-60%) als in 2D-Monolayerzellen (Überlebensrate 20%) (*Loessner et al., 2010*).

Unter 2D-Bedingungen können zudem gewebespezifische Informationen und Interaktionen des *in vivo* Tumor-Mikromilieus zusammen mit der Gewebemorphologie nicht akkurat wiedergegeben werden. Da *in vivo* eine größere Heterogenität und Komplexität vorzufinden ist, sind Experimente in 2D-Tumorzelllinien nicht immer ausreichend repräsentativ für das *in vivo* Tumorgeschehen (*Biermann et al., 2008; Antoni et al., 2015*). Bereits die Tatsache, dass die Seite der Zellmembran, durch die im 2D-Zellmodell die Haftung an die Zellkulturflasche ermöglicht wird, mit all ihren Oberflächenrezeptoren und membranengebundenen Strukturen für therapeutische Zwecke nicht erreicht werden kann, unterstreicht die Aussage von *Biermann et al. (2008)*. Da außerdem nur ein Teil der Zelle mit den umliegenden Strukturen und Nachbarzellen in Interaktion tritt, kommt es im 2D-Zellmodell automatisch zu einer unnatürlichen Polarisierung der Zelle, was z.B. in unphysiologischen Integrin-Bindungskontakten oder veränderten Zellphänotypen resultieren kann (*Hutmacher et al., 2010*).

Die zunehmenden Kenntnisse hinsichtlich des *in vivo* Tumor-Mikromilieus haben die Entwicklung der 3D-Technologie weiter vorangetrieben. Dabei soll die biologische, physikalische und biochemische Umgebung der natürlichen extrazellulären Matrix möglichst wirklichkeitsgetreu reflektiert werden (*Hutmacher, 2010; Antoni et al., 2015*). Bereits unter 2D-Kulturbedingungen werden seit langer Zeit Kulturgefäße verwendet, deren Oberfläche zur Imitierung der extrazellulären Matrix und somit zur Förderung eines soliden Tumorwachstums mit natürlichem Laminin, Kollagen oder Fibronectin beschichtet ist. Lange Zeit galt Matrigel[®] als Mittel der Wahl zur Oberflächenbeschichtung, welches hauptsächlich aus Kollagen Typ I und Laminin besteht. Daneben enthält Matrigel[®] aber oft undefinierte Bestandteile und Verunreinigungen (*Hutmacher et al., 2010*).

Zur Generierung dreidimensionaler Kulturbedingungen werden heute verschiedene Technologien angewandt. Um die Komponenten des natürlichen extrazellulären Stromas bestmöglich *in vitro* nachzuahmen, werden der Zellsuspension für eine ideale Interaktion mit den Tumorzellen u.a. Fibroblasten, mesotheliale, mesenchymale, endotheliale und inflammatorische Zellen, sowie Adipozyten zugesetzt (*Dong et al., 2012*). Zunehmend werden synthetische biomimetische Materialien, z.B. Polyethylenglykol-(PEG-)basierte Hydrogelmatrixen eingesetzt (Abb. 4) (*Dong et al., 2012*). Ein großer Vorteil besteht darin, dass die PEG-basierten Hydrogelmatrixen in ihrer Zusammensetzung sehr variabel gestaltet werden können. Diese experimentellen Zellmodelle können die *in vivo* Tumorarchitektur nahezu exakt in ihrer physikalischen und biochemischen Charakteristik repräsentieren. Hydrogele stellen ein Netzwerk von PEG-Polymerketten dar, die unter Einlagerung von Wasser kolloidale Gele bilden. Die Vernetzung der Polymerketten erfolgt unter Einsatz einer Faktor XIII-katalysierten Reaktion, ähnlich dem endogenen „Fibrinogen crosslinking“

bei der physiologischen Fibrininformation (Loessner et al., 2010). An den vielarmigen Enden der PEG-Polymere sind ausgewählte bioaktive funktionelle Gruppen vorhanden, z.B. das Arg-Gly-Asp (RGD) Integrin-Bindungsmotiv oder diverse Wachstumsfaktoren, welche auch *in vivo* extrazellulär vorkommen. Dadurch können sezernierte Enzyme, Proteasen (z.B. MMPs) oder Adhäsionsmoleküle mit den PEG-Polymeren interagieren (Hutmacher et al., 2010; Loessner et al., 2010). Um ein spezielles extrazelluläres Mikromilieu zu schaffen, können die synthetischen und biomimetischen 3D-Hydrogele mit flexiblen biologischen Funktionalitäten ausgestattet werden. Treten die Tumorzellen mit der Hydrogel-Matrix in Kontakt, interagieren sie mit den PEG-Polymeren und formen dreidimensionale Zellsphäroide (Loessner et al., 2010).

Das genannte 3D-Zellmodell beruht auf einer Sphäroid-Formation, die auf einer Interaktion von Tumorzellen mit synthetischen, biomimetischen ECM-Materialien basiert. Neben diesem Matrix-basierten 3D-Zellmodell gibt es eine weitere Technik der Sphäroidbildung, die in einer Zellsuspension unter nicht-adhäsiven Umgebungsbedingungen und in Abwesenheit von synthetischen ECM-Komponenten eine spontane Bildung von Zellaggregaten ermöglicht (Abb. 5) (Lin und Chang, 2008; Loessner et al., 2010). Bereits 1952 konnte unter Verhinderung der Adhäsion in Suspensionszellen aus Hühnerembryonen eine spontane, cluster- und gewebeartige Reaggregation im Sinne einer Sphäroidbildung beobachtet werden (Moscona und Moscona, 1952). In dieser sogenannten Liquid-Overlay-Technik werden zur Sphäroidgenerierung Reaktionsgefäße aus nicht-adhäsivem Kunststoff verwendet bzw. Gefäße, deren Kunststoffoberfläche mittels Agarose bzw. hydrophoben Polymeren (z.B. PHEMA: Polyhydroxyethylmethacrylate, PVLA: Polyvinylbenzyl-D-Lactonamid) nicht adhäsiv gemacht wurde. Unter Variation von Zellzahl, Zelltypus und Zusammensetzung des Kulturmediums können Sphäroidgröße und -form beeinflusst werden. Die Vorteile dieser Technologie liegen darin, dass sie relativ kostengünstig ist, sowie einfach und variabel durchgeführt werden kann (Lin und Chang, 2008).

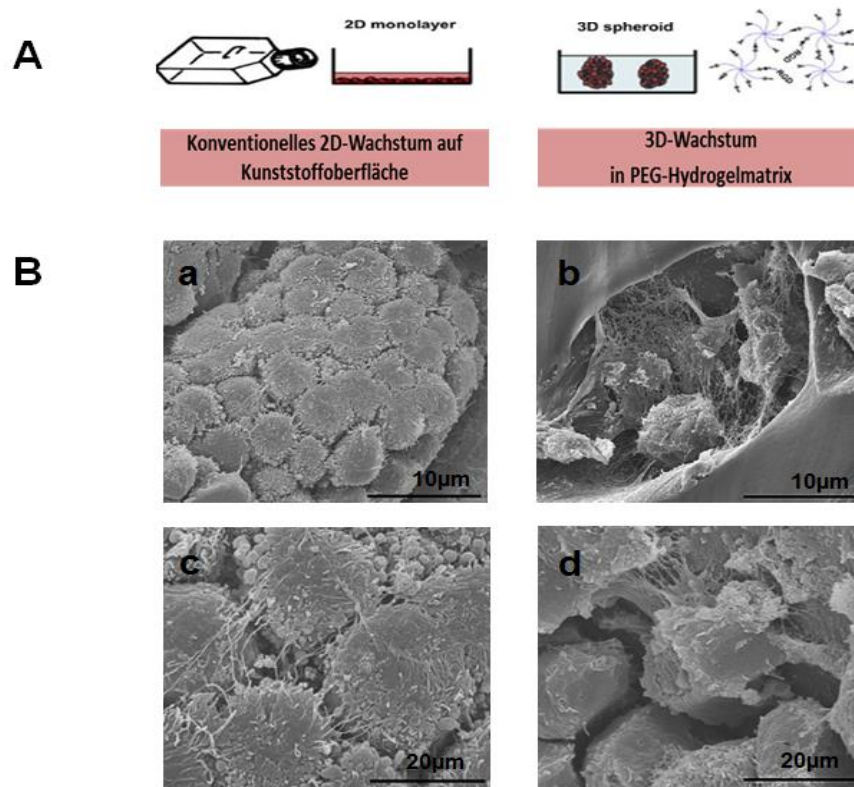


Abbildung 4: Sphäroid-Formation in biomimetischer PEG-Hydrogelmatrix.

- A) Schematische Darstellung des Tumorzellwachstums in 2D als Monolayer auf konventioneller Kunststoffoberfläche (links) und in 3D als multizelluläre Sphäroide, eingebettet in Hydrogelmatrix (rechts). (RGD, Arg-Gly-Asp Integrin-Bindungsmotiv)
- B) Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Sphäroid-Formation von Ovarialkarzinomzellen (Zelllinie OVMZ-6) in Hydrogelen (PEG-Matrix) (a-d). (Abbildung modifiziert nach *Loessner et al., 2010*).

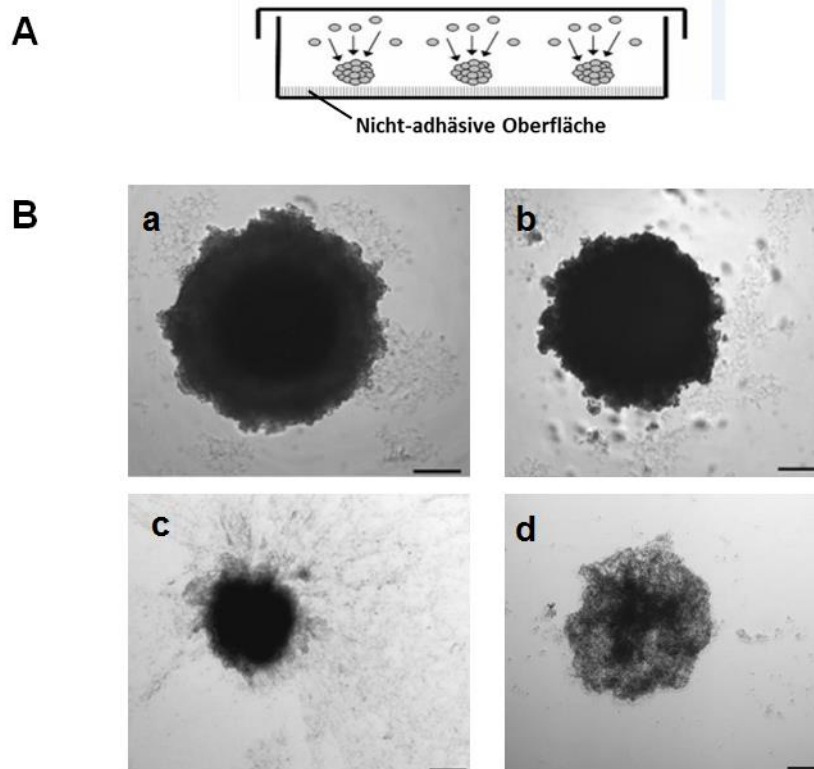


Abbildung 5: Sphäroid-Formation in Liquid-Overlay-Technik.

- A) Schematische Darstellung der Liquid-Overlay-Technik: Unter Einsatz von nicht-adhäsiven Oberflächenmaterialien, z.B. Agarose, formen Suspensionszellen aufgrund interzellulärer adhäsiver Kräfte multizelluläre Aggregate (Sphäroide) (Abbildung modifiziert nach *Lin und Chang, 2008*).
- B) Lichtmikroskopische Darstellung von Sphäroiden, generiert in Liquid-Overlay-Technik nach 48h Sphäroidbildung. a) Kolonkarzinomzelllinie DLD-1. b) Kolonkarzinomzelllinie CaCo-2. c-d) Kolonkarzinom-Gewebesphäroide. a-d) 5×10^4 Zellen/Sphäroid. Maßstab 200 μm . (Abbildung modifiziert nach *Hoffmann et al., 2015*).

Die Verwendung von 3D-Technologien *in vitro* sollte gezielt mit dem Fokus auf die bestmögliche Abbildung des *in vivo* Tumorgeschehens erfolgen, bevor anschließend aufwändige *in vivo* Tiermodelle angewendet werden (*Hutmacher, 2010*). 3D-Zellmodelle schlagen die Brücke zwischen 2D-Monolayerexperimenten und dem *in vivo* Tiermodell, sowohl in der tumorbiologischen Forschung als auch in der Entwicklung neuer therapeutischer Screeningmethoden (*Falkenberg et al., 2016*).

1.3.2. Charakteristik des Sphäroid-Mikrotumormodells

Unter entsprechenden Wachstumsbedingungen formen Tumorzellen charakteristische multizelluläre 3D-Zellaggregate, sogenannte Sphäroide. Diese Sphäroide weisen im Vergleich zu zweidimensional wachsenden Tumorzellen Merkmale auf, die starke Ähnlichkeit zu einem *in vivo* Tumor haben, insbesondere hinsichtlich des frühen Tumorwachstums (Abb. 6). In dieser frühen Phase der Tumorentstehung ist die Vaskularisation noch sehr gering ausgeprägt, was in einer 3D-Architektur nicht abgebildet werden kann (Hutmacher, 2010).

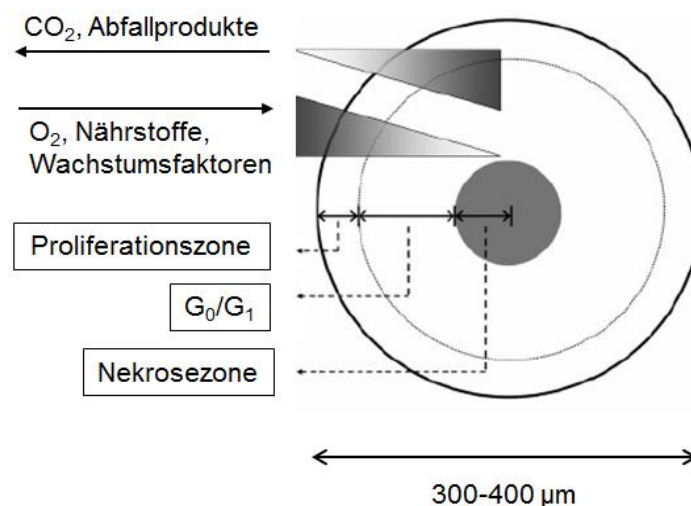


Abbildung 6: Sphäroid-Geometrie.

Geometrischer Aufbau eines Sphäroids, bestehend aus einer äußeren Schicht proliferierender Zellen (Proliferationszone), einer mittleren Schicht mit Zellen in der Ruhephase (G₀/G₁) und einer inneren Schicht mit nekrotischen Zellen (Nekrosezone). Der mehrschichtige Aufbau führt zu einem insuffizienten Stoffaustausch in beiden Richtungen (Abbildung modifiziert nach Lin und Chang, 2008).

Im Zentrum eines Sphäroids bildet sich ein Hohlraum, der das nekrotische Areal eines *in vivo* Tumors imitiert. Dieses Areal ist bei einem Gesamtdurchmesser von ca. 300-400 µm aufgrund eingeschränkter Diffusion von der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung abgeschnitten (Lin und Chang, 2008; Hutmacher, 2010; Hutmacher et al., 2010). Auf die zentrale Nekrosezone folgt eine mittlere Zone mit Zellen in der Ruhephase (G₀/G₁) und eine dünne äußere Schicht mit schnell proliferierenden Tumorzellen. Die Proliferation von Zellen im Sphäroid ist vergleichbar mit der physiologischen Proliferationsgeschwindigkeit, aber insgesamt deutlich langsamer als die Wachstumsgeschwindigkeit von Tumorzellen in Monolayerkulturen (Hutmacher, 2010).

Anhand des zonalen Aufbaus kann auch die im Vergleich zu einer 2D-Zellkultur erhöhte Chemoresistenz eines Sphäroids erklärt werden. Durch mangelnde Perfusion dieses avaskulären Tumormodells und abnehmender Diffusion Richtung Zentrum können Chemotherapeutika nur eingeschränkt das Zell-Ensemble penetrieren und somit die inneren Zellen erreichen. Viele Chemotherapeutika wirken zudem nur bei schnell proliferierenden Zellen in der äußeren Proliferationszone, während die ruhenden Zellen in der G₀/G₁-Zone nicht abgetötet werden (Timmins et al., 2004). In 2D-Monolayerzellen dagegen sind überwiegend schnell proliferierende Zellen zu finden. Zudem wurde in 3D-Sphäroiden eine Expression von chemo-resistenzvermittelnden Molekülen (z.B. p48, S100A4, SKIP3) beobachtet (Timmins et al., 2004).

1.3.3. Etablierung eines Sphäroid-Mikrotumormodells als prädiktives *ex vivo* Testsystem zur Vorhersage des Ansprechens einer medikamentösen Tumortherapie

In der Tumortherapie lautet das gegenwärtige Prinzip oftmals *one size fits all* oder ist angelehnt an das *trial and error* Prinzip (Schmitt et al., 2010). Allerdings zeigen in der klinischen Praxis bei weitem nicht alle Patienten das gleiche Therapieansprechen. Einige Patienten sind mit der klassischen Leitlinientherapie übertherapiert und andere mit aggressivem Krankheitsverlauf werden damit nicht ausreichend behandelt. Ein unterschiedliches Ansprechen auf eine Tumortherapie kann mitunter in interindividuellen Genpolymorphismen und in verschiedenen tumorspezifischen Gen- bzw. Proteinexpressionsprofilen begründet liegen (van't Veer und Bernards, 2008). Die Leitlinientherapie hat für den Patienten daher oft eine ungeeignete Therapieentscheidung zur Folge, die bei geringem therapeutischem Nutzen viele toxische Nebenwirkungen mit sich bringen kann. Eine personalisierte Tumortherapie hingegen hat das Potential, unter Minimierung von Toxizität eine Maximierung des klinischen Nutzens zu erreichen (Duffy und Crown, 2008). Das U.S. National Cancer Institute hat 2011 personalisierte Medizin wie folgt definiert: *A form of medicine that uses information about a person's genes, proteins and environment to prevent, diagnose, and treat disease* (NCI, 2011). Im Rahmen der personalisierten Tumortherapie lautet demnach das Prinzip: *Give the right drug at the right dose to the right patient.* (Duffy und Crown, 2008).

Um in der klinischen Praxis das Ziel einer personalisierten Tumortherapie kostensparend und flächendeckend umzusetzen, werden verschiedene diagnostische, prognostische und therapeutische Strategien evaluiert. Dazu werden präklinische Modelle benötigt, welche die *in vivo* Tumorbilologie imitieren können, prädiktiv für die klinische Prognose sind und das Potential haben, die beste Therapieoption bereits *in vitro* zu identifizieren (Hoffmann et al., 2015; Halfter et al., 2016). Das Sphäroid-Mikrotumormodell stellt dafür ein vielversprechendes präklinisches und prädiktives Tumormodell dar, gerade im Hinblick auf die Vorhersage des Ansprechens einer medikamentösen Tumortherapie.

Chemosensitivität und Chemoresistenz werden entscheidend vom Tumor-Mikromilieu, der Tumorerogenität und den vielfältigen Zell-Zell-Interaktionen geprägt, sowohl zwischen den Tumorzellen selbst als auch zwischen Tumorzelle und der umliegenden Stromazelle. Zahlreiche tumorbiologische Faktoren, wie Hypoxie, Azidose oder das Vorhandensein von Chemokinen oder diversen Immunzellen haben Einfluss auf die Wirkung von Chemotherapeutika (Hoffmann et al., 2015). In der Etablierung individueller 3D-Sphäroide liegt folglich auch das Potential für neue Chemosensitivitäts-Assays. Sowohl in der adjuvanten als auch in der neoadjuvanten Tumortherapie können am Sphäroid-Modell *ex vivo* Wirkstoffe getestet werden und ineffiziente Therapiekandidaten bereits präklinisch eliminiert werden, während vielversprechende Wirkstoffe *in vitro* selektiert und *in vivo* weiter verfolgt werden können (Hirschhaeuser et al., 2010; Halfter et al., 2016; Halfter und Mayer, 2017).

Die SpheroTec[®] GmbH, welche die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sphäroide zur Verfügung stellte, generiert Sphäroide nach einer patentierten Liquid-Overlay-Technik. Dreidimensionale, *in vitro* aus Tumorgewebe oder Zelllinien erzeugte Zellaggregate werden unter definierten Kulturbedingungen nach aktueller Leitlinienempfehlung mit verschiedenen Chemotherapeutika in Mono- oder Kombinationstherapie behandelt (Abb. 7). Bereits nach wenigen Tagen liegt ein Ergebnis hinsichtlich individueller Chemoresistenz bzw. -sensitivität vor. Das *in vitro* Therapieergebnis soll an den behandelnden Arzt weitergeleitet werden und diesen in der weiteren Therapieauswahl nach dem Prinzip *the right patient receives the right drug* lenken. Für jeden Tumorpatienten könnte somit die optimale individuelle Therapie gefunden werden (Halfter und Mayer, 2017). Zum jetzigen Zeitpunkt findet allerdings noch keine Umsetzung dieses Prinzips im klinischen Alltag statt.

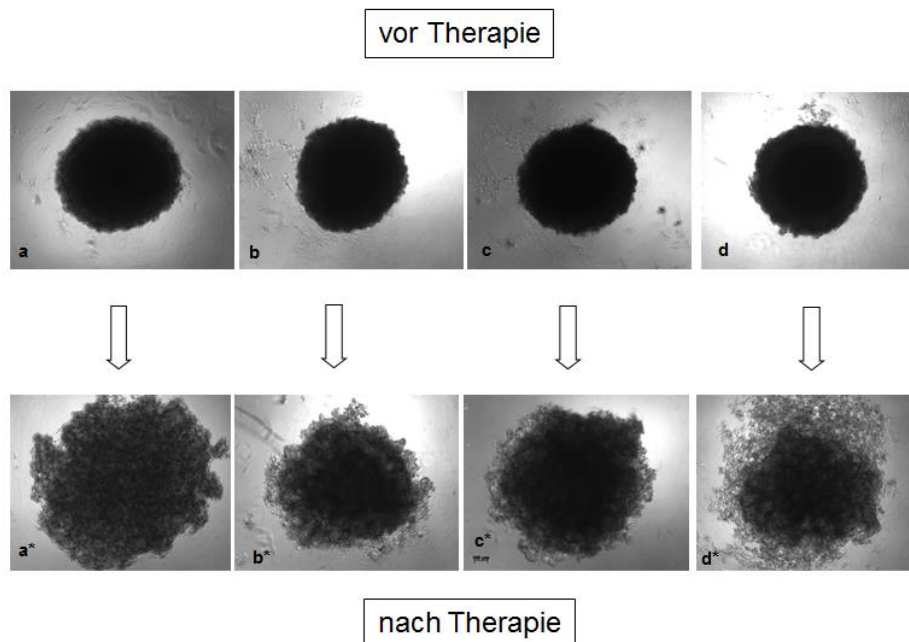


Abbildung 7: Lichtmikroskopische Darstellung von Gewebesphäroiden (Mammakarzinom) vor und nach Therapie mit Epirubicin/Cyclophosphamid und Docetaxel. Einfluß einer Zytostatikatherapie mit Epirubicin/Cyclophosphamid und Docetaxel auf die Sphäroid-Morphologie. (a-d) Lichtmikroskopische Darstellung verschiedener Gewebesphäroide (Mammakarzinom) vor Therapiebeginn (nach 48h Sphäroidbildung) und (a*-d*) nach Therapieende (nach 98h Behandlungsdauer in PPC, *peak plasma concentration*). Die Therapie mit Epirubicin/Cyclophosphamid und Docetaxel entspricht der aktuellen S3-Leitlinienempfehlung beim neoadjuvanten Mammakarzinom (Stand Juli 2012). Die Bilder wurden von SpheroTec[®], Martinsried, zur Verfügung gestellt.

1.4. Fragestellung und Zielsetzung

Sphäroide sind dreidimensionale Zellaggregate unterschiedlicher Zellzusammensetzung und Komplexität. *In vitro* ermöglichen sie eine möglichst wirklichkeitsgetreue Nachstellung des *in vivo* Tumorwachstums. Es konnte gezeigt werden, dass dreidimensionale Zellmodelle gegenüber konventionellen 2D-Monolayertechnologien ein unterschiedliches Genexpressionsmuster von z.B. chemoresistenzvermittelnden Mediatoren aufweisen (Timmins et al., 2004; Feder-Mengus et al., 2008; Hutmacher et al., 2010; Loessner et al., 2010).

Welche sonstigen tumorbiologischen Faktoren in 2D- und 3D-Systemen unterschiedlich exprimiert werden und ob davon auch Komponenten des Urokinase-Systems als entscheidende Mediatoren von Tumorzellinvasion und Metastasierung betroffen sind, wurde bisher nicht untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde im direkten Vergleich von 2D-Monolayerzellkultur und 3D-Sphäroiden in verschiedenen Zelllinien und Gewebeproben unterschiedlicher Tumorentität das Genexpressionsmuster von Komponenten des Urokinase-Systems (uPA, PAI-1, uPAR, uPAR-del4/5), dem GTP-bindenden Protein Rab31 und KLK7 aus der Gruppe der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen mittels quantitativer *real time* PCR bestimmt.

In diesem Zusammenhang ergaben sich folgende Fragestellungen und Zielsetzungen:

- Welche Zellzahl pro Sphäroid kann optimal evaluiert und etabliert werden, um valide und reproduzierbare Genexpressionsanalysen durchzuführen?
- Gibt es unter 2D- versus 3D-Kulturbedingungen Genexpressionsunterschiede von ausgewählten Biomarkern in ausgewählten Zelllinien?
- Gibt es unter 2D- versus 3D-Kulturbedingungen Unterschiede im Expressionsmuster hinsichtlich Tumorentität bzw. individuellem Biomarker?
- Sind Genexpressionsanalysen in Sphäroiden aus Tumorgewebe mit den gleichen Methoden durchführbar wie in Sphäroiden, die aus etablierten Zelllinien hergestellt wurden?
- Beeinflusst eine Überexpression von Kallikrein-ähnlichen Peptidasen das Genexpressionsmuster von Komponenten des Urokinase-Systems?
- Dienen Sphäroide, generiert aus Brustkrebsgewebe, als prädiktives Testsystem zur Vorhersage des Ansprechens einer medikamentösen Tumorthherapie?

2. Material und Methoden

2.1. Patienten und Patientenmaterial

2.1.1. Patienten: Klinische Datenakquise im Rahmen der SpheroNeo-Studie

Im Rahmen der prospektiven nicht-interventionellen Kohortenstudie SpheroNeo (*Spheroids for the prediction of neoadjuvant chemotherapy*) wurde an der Organisation und Durchführung einer klinischen Studie mitgewirkt. In dieser deutschlandweiten, multizentrisch angelegten Studie war das Brustkrebszentrum der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar eines von insgesamt 13 Rekrutierungszentren (Prüfärzte: Dr. Stefan Paepke, Dr. Heike Jansen). Die Studienleitung lag bei PD Dr. Barbara Mayer, SpheroTec[®] GmbH, Martinsried. Die SpheroNeo-Studie war innerhalb des Spitzencluster-Programms „m⁴ - Personalisierte Medizin und zielgerichtete Therapien“ eines von insgesamt 14 Projekten. Der m⁴-Spitzencluster war Sieger im Spitzencluster-Wettbewerb 2010, gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF).

Nach GCP-Richtlinien (*good clinical practice*) und SOP-Vorgaben (*standard operating procedure*, Standardarbeitsanweisung) wurde eine interne Infrastruktur zur Probengewinnung und Probenversendung ins Partnerlabor aufgebaut. Zur Gewinnung von Primärgewebe wurden Mammakarzinompatienten Feinnadelbiopsien entnommen. Daraus wurden *in vitro* 3D-Gewebesphäroide generiert und diese mit verschiedenen Chemotherapeutika behandelt. Ziel der SpheroNeo-Studie war es, eine *in vitro* Wirkstofftestung an Sphäroiden aus Primärgewebe (SpheroTest) als Prädiktor für das Ansprechen einer neoadjuvanten medikamentösen Tumorthherapie bei Brustkrebspatienten zu etablieren. Dazu wurden die Sphäroide mit Chemotherapeutika nach den aktuellen Leitlinienempfehlungen zur neoadjuvanten Therapie des Mammakarzinoms behandelt, z.B. mit einer Kombination aus Epirubicin/Cyclophosphamid und Docetaxel (Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Juli 2012). Unmittelbar nach Gewinnung des Tumorgewebes wurde das geplante klinische Chemotherapieschema an die Studienzentrale weitergeleitet, um ein identisches Therapiemuster *in vitro* am Sphäroid zu testen. Neben dem Mitwirken bei der Patientenrekrutierung wurden im Rahmen der Follow-up-Erhebung die klinischen Daten der am Studienzentrum rekrutierten Patienten gesammelt.

2.1.2. Patientenmaterial: Suspensionszellen und Gewebesphäroide

Neben verschiedenen etablierten Tumorzelllinien aus 2D- und 3D-Kulturbedingungen wurde auch Patientengewebe aus dem Ovarial- und kolorektalen Karzinom analysiert, da hier im Vergleich zur primären Mammakarzinomstanze nach chirurgischer Resektion ausreichend Material für die Sphäroidgenerierung zur Verfügung stand (Tab. 1).

Patienten-ID	Tumor-Entität	Kultivierung	Anzahl Sphäroide	eingesetzte Gesamtzellzahl	RLT-Lysepuffer/ eingesetzter Zellzahl
1	CRC	3D	3	150.000	700 µl
2	OvCa	3D	3	150.000	700 µl
3	CRC	3D	3	150.000	700 µl
4	OvCa	3D	3	150.000	700 µl
5	OvCa	3D	3	150.000	700 µl
6	CRC	3D	3	150.000	700 µl
7	OvCa	3D	3	150.000	700 µl
8	OvCa	3D	3	150.000	700 µl
9	CRC	3D	3	150.000	700 µl
10	OvCa	3D	3	150.000	700 µl
11	CRC	3D	3	150.000	700 µl
12	OvCa	3D	4	200.000	700 µl
13	OvCa	3D	6	300.000	700 µl
14	CRC	3D	6	300.000	700 µl
15	CRC	3D	6	300.000	700 µl
16	OvCa	3D	6	300.000	700 µl
17	OvCa	3D	6	300.000	700 µl
18	OvCa	3D	6	300.000	700 µl
19	CRC	3D	6	300.000	700 µl
20	CRC	3D	7	350.000	700 µl
21	OvCa	3D	8	400.000	700 µl
22	OvCa	2D	-	500.000	700 µl
		3D	10	500.000	700 µl
23	OvCa	2D	-	150.000	150 µl
		3D	3	150.000	150 µl
24	OvCa	2D	-	150.000	150 µl
		3D	3	150.000	150 µl

Tabelle 1: Übersicht über das verwendete Patientengewebe.

Insgesamt wurden 24 Gewebeproben unterschiedlicher Tumorentität analysiert. Neun Proben stammten vom kolorektalen Karzinom (CRC), 15 Proben vom Ovarialkarzinom (OvCa). Gewebe der Patienten 22, 23 und 24 wurde in Form von Sphäroiden (3D) und Suspensionszellen (2D) untersucht. Die Zellzahl/Sphäroid lag bei 50.000. Pro Patientengewebe wurden drei bis zehn Gewebesphäroide eingesetzt. Das Probenmaterial wurde in 700 µl bzw. 150 µl (Patient 23, 24) RLT-Lysepuffer suspendiert. Das Patientengewebe wurde von SpheroTec[®], Martinsried, zur Verfügung gestellt.

Die Gewebeproben wurden SpheroTec[®] von der LMU München, Campus Großhadern, in Form von OP-Resektaten zur Verfügung gestellt, woraus SpheroTec[®] nach einer patentierten Liquid-Overlay-Technik Sphäroide generierte. Die Gewebesphäroide wurden anschließend mit verschiedenen Chemotherapeutika behandelt. Detaillierte Angaben zur Histologie, Morphologie, zum Tumorstadium oder zur Tumorgroße lagen nicht vor.

Insgesamt wurden 24 Patientenproben analysiert. Von den Patienten 22, 23 und 24 wurden neben den 3D-Gewebesphäroiden auch 2D-Suspensionszellen untersucht. Pro Patient wurden drei bis zehn Gewebesphäroide mit je ca. 50.000 Zellen analysiert. 3D-Sphäroide und 2D-Suspensionszellen wurden von SpheroTec[®] mit RLT-Lysepuffer (Qiagen, Hilden) und 143 mM β -Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen) suspendiert, bei -80 °C eingefroren und auf Trockeneis unserem Labor bereitgestellt. Die Proben der Patienten 23 und 24 wurden in 150 μ l RLT-Puffer lysiert, alle anderen Sphäroide in 700 μ l RLT-Puffer. Jede Patientenprobe lag doppelt bzw. dreifach vor. Die Gewebepreparation, die Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität, sowie die Sphäroidgenerierung erfolgte bei SpheroTec[®] nach *Mayer et al. (2001)* und *Hoffmann et al. (2015)*. Nach makroskopischer Entfernung des nicht-tumorösen Anteils wurde das Tumorgewebe mechanisch und enzymatisch verdaut, um die extrazelluläre Matrix abzubauen und eine Einzelzellsuspension zu generieren. In dieser Einzelzellsuspension bleibt die ursprüngliche Zellzusammensetzung des Primärgewebes erhalten. Bei der anschließenden Sphäroidbildung aus der Einzelzellsuspension ist eine Zellvitalität von mindestens 80% erforderlich (*Gaedtke et al., 2007; Hoffmann et al., 2015*).

2.2. Zelllinien

Die Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 mit Überexpression von uPAR-del4/5 wurde als Monolayer kultiviert. Sie wurde als einzige Zelllinie ausschließlich in 2D-Kultur analysiert. Alle anderen Zelllinien wurden sowohl unter 2D- als auch unter 3D-Kulturbedingungen untersucht (Tab. 2). Die Zelllinien repräsentieren vier verschiedene Tumorentitäten: das Mamma-, Ovarial-, Magen- und das kolorektale Karzinom. Es wurden Probenpaare, bestehend aus 2D- und 3D-Zellmaterial, von jeweils zwei unterschiedlichen Zellpassagen analysiert, mit Ausnahme der Zelllinie N87 (einfache Ausführung) und HCC1143 (dreifache Ausführung). Jedes Probenpaar bestand aus ca. 150.000 Suspensionszellen und aus drei Sphäroiden mit 50.000 Zellen/Sphäroid. Die Sphäroidgenerierung erfolgte durch SpheroTec[®] nach der patentierten Liquid-Overlay-Technik (*Mayer et al., 2001; Hoffmann et al., 2015*).

Zelllinie	Primärtumor	Ursprung	Kultivierung		Referenz
			2D	3D	
MDA-MB-231 (MDA-MB-231 uPAR-del4/5, #2-6-12 lacZ) ¹⁾	Invasiv-duktales Mammakarzinom	Metastasierung (Pleuraerguss)	X		Cailleau et al., 1974
T47D ²⁾	Invasiv-duktales Mammakarzinom	Metastasierung (Pleuraerguss)	X	X	Keydar et al., 1979
SKBR3 ²⁾	Invasiv-duktales Mammakarzinom	Metastasierung (Pleuraerguss)	X	X	Engel und Young, 1978
HCC1143 ²⁾	Invasiv-duktales Mammakarzinom	Primärtumor	X	X	Neve et al., 2006
HCC70 ²⁾	Invasiv-duktales Mammakarzinom	Primärtumor	X	X	Neve et al., 2006
OVCAR-3 ²⁾	Adenokarzinom des Ovars	Metastasierung (Aszites)	X	X	Hamilton et al., 1983
OVMZ-6 ¹⁾	Adenokarzinom des Ovars	Metastasierung (Aszites)	X	X	Möbus et al., 1992
SKOV-3 ²⁾	Adenokarzinom des Ovars	Metastasierung (Aszites)	X	X	Fogh et al., 1977
Hs746T ²⁾	Adenokarzinom des Magens	Metastasierung (linke Extremität)	X	X	Smith et al., 1979 Mayer et al., 2001
N87 ²⁾	Adenokarzinom des Magens	Metastasierung (Leber)	X	X	Park et al., 1990 Mayer et al., 2001
CaCo-2 ²⁾	Adenokarzinom des Colons	Primärtumor	X	X	Fogh et al., 1977
HT29 ²⁾	Adenokarzinom des Colons	Primärtumor	X	X	Fogh et al., 1977
HCT116 ²⁾	kolorektales Adenokarzinom	Primärtumor	X	X	Brattain et al., 1983

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Zelllinien.

- 1) Klinische Forschergruppe der Frauenklinik, Technische Universität München, Klinikum rechts der Isar, Ismaninger Straße 22, 81675 München
2) SpheroTec[®] GmbH, Am Klopferspitz 19, 82152 Martinsried

Das Zellmaterial wurde in 700 µl RLT-Pufferlösung (Qiagen, Hilden), supplementiert mit 143 mM β-Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen), gemäß Herstellerprotokoll des RNeasy Micro Kits (Qiagen, Hilden, Cat.No.74004) lysiert. Die Zelllysate wurden bei -80 °C gelagert. Aus der Ovarialkarzinomzelllinie OVMZ-6 wurde in Zusammenarbeit mit dem Institute of Health and Biomedical Innovation (IHBI) der Queensland University of Technology (QUT), Brisbane cDNA analysiert. Die cDNA wurde sowohl aus Zellen nach Transfektion mit dem RSV-Kontrollvektor als auch aus Zellen mit Überexpression der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen 4, 5, 6 und 7 (KLK4-7) untersucht. Dazu wurde cDNA in zwei unabhängigen RNA-Präparationen aus Monolayer-

zellen und 3D-Sphäroiden gewonnen. Die Sphäroidbildung erfolgte dabei Hydrogel-Matrix-basiert nach *Loessner et al. (2010)*. Das methodische Vorgehen richtete sich nach *Loessner et al. (2012)*. Nach einem DNase Verdau (DNase I Amplification Grade, Sigma, Deisenhofen, Cat.No.18068-015) wurde aus jeder RNA-Präparation (TRIzol[®], Invitrogen, Karlsruhe, Cat.No.15596-018) 1 µg RNA in drei-facher Ausführung in 20 µl cDNA revers transkribiert (SuperScript III Reverse Transkriptase Kit, Invitrogen, Karlsruhe, Cat.No.18080-044). Insgesamt wurden 24 cDNA-Proben analysiert. Nach der Genexpressionsanalyse von zwei Referenzgenen wurde das Genexpressionsmuster ausgewählter Komponenten des Urokinase-Systems bestimmt.

2.3. Zellkultur

2.3.1. Kultivierung der Zelllinie MDA-MB-231 als Monolayerzellen

Die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 mit Überexpression von uPAR-del4/5 wurde unter sterilen Bedingungen bei 37 °C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Als Nährmedium wurde DMEM mit GlutaMax[®] (Gibco, Kalsruhe) und einem Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS, Gibco, Kalsruhe), 1% 1 M HEPES-Puffer (Gibco, Karlsruhe) und 1% Arginin-Asparagin-Lösung (Sigma, Deisenhofen) verwendet. Zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen wurde das Antibiotikum Genitcin G480 (Life Technologies, Darmstadt) in einer Konzentration von 0,5 g/l zugesetzt. Es wurden Zellkulturflaschen von BD Biosciences (Franklin Lakes, USA) verwendet. Das Nährmedium wurde alle zwei Tage gewechselt, das Umsetzen (Passagieren) der Zellen erfolgte alle zehn Tage.

Alle adhärent wachsenden Zellen wurden folgendermaßen in einer Laminar-Airflow Werkbank (Thermo Scientific, Wilmington, USA) passagiert. Nach mikroskopischer Beurteilung von Konfluenz und Zellmorphologie wurde das Kulturmedium vorsichtig abgesaugt und der Zellrasen einmalig mit PBS (Life Technologies, Darmstadt) gespült. Zum Ablösen der adhären Zellen wurden bei einer 75 cm²-Zellkulturflasche 2-4 ml einer 0,05% EDTA/PBS-Mischung (w/v) zugegeben (EDTA der Firma Biochrom, Berlin). Nach zehnminütiger Inkubation im Brutschrank bei 37 °C wurde unter leichtem Klopfen der Ablösevorgang unter dem Mikroskop kontrolliert. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt und für fünf Minuten bei 5000 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand zügig abgenommen, das Zellpellet in frischem Nährmedium resuspendiert und die Suspension zur weiteren Kultivierung anteilig in eine Kulturflasche überführt.

Für die Generierung von Verdünnungsreihen wurden auf 6-Well-Platten je 2×10^5 Zellen/Well in 2,5 ml Kulturmedium ausgesät. Nach 24-48 h war eine 70-80%ige Konfluenz erreicht und die Zellen wurden unter subkonfluenten Bedingungen geerntet. Zum Ablösen des Zellrasens wurde pro Well 1 ml 0,05% EDTA/PBS-Mischung verwendet. Die Zellsuspensionen von drei Wells wurden vereinigt und pelletiert. Nach der Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität (s. 2.3.2) wurden Verdünnungsreihen mit definierter Zellzahl generiert (s. 2.4).

2.3.2. Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität

Die Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität erfolgte nach der Trypanblau-Färbemethode. 10 μ l einer Zellsuspension in PBS wurden mit 90 μ l einer 0,5%igen Trypanblau-Lösung (Sigma, Deisenhofen) 1:10 (v/v) verdünnt. Die Zellen wurden lichtmikroskopisch in der Neubauer-Zählkammer (Marienfeld Superior, Lauda Königshofen) nach Herstellerangaben gezählt. Nur tote Zellen sind mit Trypanblau anfärbbar, da der Farbstoff aufgrund der defekten Zellmembran ins Zellinnere penetrieren kann. Die vitalen Zellen hingegen bleiben aufgrund der intakten Zellmembran ungefärbt und erscheinen unter dem Mikroskop transparent. Mäanderförmig wurden die ungefärbten vitalen Zellen in allen vier Quadranten der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Um Doppelzählungen an den Rändern zu vermeiden, wurden nur solche Zellen mitgezählt, die sich an oder auf dem linken und unteren Quadrantenrand befanden. Die Berechnung der Gesamtzellzahl (Zellzahl/ml) erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl aller 4 Quadrate} / 4 \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor (hier 10)}$$

2.4. Generierung von Verdünnungsreihen in 2D- und 3D-Zellsystemen

Die Intention bei der Generierung von Verdünnungsreihen mit unterschiedlichen Zellzahlen bestand darin, zuerst in zweidimensional kultivierten Zellen (Zelllinie MDA-MB-231) und anschließend in dreidimensionalen Sphäroiden (Zelllinie CaCo-2 und Hs746T) eine optimale (minimale) Zellzahl zu etablieren, aus der reproduzierbar und valide RNA isoliert und anschließend mit qPCR Genexpressionsanalysen durchgeführt werden können. Nach Angabe von SpheroTec[®] liegt die optimale Zellzahl pro

Sphäroid bei ca. 40.000-50.000. Der bei den Verdünnungsreihen ausgewählte Zellzahlbereich umfasste somit den von SpheroTec[®] angegebenen Richtwert. Aus MDA-MB-231-Zellen wurden zwei unabhängige Verdünnungsreihen erstellt (Tab. 3). Die beiden Verdünnungsreihen wurden mit MDA-MB-231 Zellen der Passage 18 und 19 durchgeführt. Die einzelnen Verdünnungen wurden für fünf Minuten bei 5.000 x g zentrifugiert und der Überstand anschließend vorsichtig abgesaugt. Die Zellpellets wurden für die RNA-Isolierung zügig in 350 µl RLT-Lysepuffer (Qiagen, Hilden), supplementiert mit 143 mM β-Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen), resuspendiert. Die Zelllysate wurden unmittelbar zur RNA-Extraktion verwendet bzw. bei -80 °C eingefroren.

Verdünnungsschritt	Zellzahl in 400 µl PBS	Zellzahl in 100 µl PBS	Pipettierschema
0	320.000	80.000	191 µl Zellsuspension ($1,7 \times 10^6$ Zellen/ml) + 209 µl PBS
1	160.000	40.000	200 µl 0) + 200 µl PBS
2	80.000	20.000	200 µl 1) + 200 µl PBS
3	40.000	10.000	200 µl 2) + 200 µl PBS
4	20.000	5.000	200 µl 3) + 200 µl PBS
5	10.000	2.500	200 µl 4) + 200 µl PBS

Tabelle 3: Generierung von Verdünnungsreihen mit MDA-MB-231 Zellen in 2D-Zellkultur. Bei einer Ausgangszellzahl von $1,7 \times 10^6$ Zellen/ml entsprechen 191 µl Zellsuspension verdünnt mit 209 µl PBS einer Zellzahl von 320.000 Zellen in 400 µl PBS. Gezeigt ist beispielhaft das Pipettierschema der ersten Verdünnungsreihe. Die zweite Verdünnungsreihe wurde nach demselben Schema pipettiert.

Aus 2D-Suspensionszellen und 3D-Sphäroiden der Kolonkarzinomzelllinie CaCo-2 und der Magenkarzinomzelllinie Hs746T wurden ebenfalls Verdünnungsreihen mit definierter Zellzahl hergestellt (Tab. 4).

Verdünnungs-schritt	Zellzahl in 700 µl RLT	Zellzahl in 350 µl RLT	Pipettierschema
0	150.000	75.000	150.000 Zellen / 700 µl RLT → 350 µl Zelllysät
1	75.000	37.500	75.000 Zellen / 700 µl RLT → 350 µl Zelllysät
2	37.500	18.750	37.500 Zellen / 700 µl RLT → 350 µl Zelllysät

Tabelle 4: Generierung von Verdünnungsreihen mit CaCo-2 und Hs746T Zellen in 2D-/3D-Zellkultur. Die Ausgangszellzahl liegt bei 150.000 in 700 µl RLT-Pufferlösung.

2.5. Extraktion der Gesamt-RNA

Aufgrund von vergleichsweise geringen Zellzahlen (≤ 500.000 Zellen) erfolgte die Extraktion der Gesamt-RNA mit dem RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Cat.No.74004), vollautomatisiert am QIAcube (Qiagen, Hilden) mit entsprechendem Zubehörmaterial (Sample Tubes RB 2 ml, Cat.No.990381; Rotor Adapters, Cat.No. 990394; Reagent Bottles, Cat.No.990393; Nuclease-free Water, Cat.No.129114; Disposable Filter-Tips: 1000 µl, Cat.No.990352 und 200 µl, Cat.No.990332). Die Auswahl fiel auf die QIAcube-Technologie, da zeitsparend und standardisiert gearbeitet werden konnte (maximale Probenkapazität $n=12$, Laufdauer 1 h). Es wurde nach dem Handbuch des RNeasy Micro Kits (2. Auflage, Dezember 2007) gearbeitet. Bei der Beladung und Vorbereitung des QIAcubes wurde nach dem Protokollblatt „QIAcube Protocol Sheet, RNeasy Micro Kit“ (Stand April 2010) vorgegangen.

Die Gesamt-RNA wurde aus allen unter 2.1.2 und 2.2 genannten Patientenproben und Zelllinien (ausgenommen OVMZ-6) mittels QIAcube extrahiert (Abb. 8). Die RNA-Extraktion aus OVMZ-6 Zellen erfolgte an der QUT in Brisbane im Rahmen des Kooperationsprojektes mit integriertem DNase Verdau (DNase I Amplification Grade, Sigma, Deisenhofen, Cat.No.18068-015) und TRIzol[®] (Invitrogen, Karlsruhe, Cat.No.15596-018) nach *Loessner et al. (2012)*.

Bei einem Gesamtvolumen von 700 µl Zellsuspension in RLT-Lysepuffer wurde das Volumen auf 2 x 350 µl halbiert, da die Gesamtkapazität des RNeasy Micro Kits auf ein Ausgangsvolumen von 350 µl determiniert war. Bei einem Ausgangsvolumen von 700 µl pro Probenansatz wurde somit zweimal separat RNA extrahiert. Alternativ wurde bei Patientenproben, die bei Probeneingang in 150 µl RLT lysiert waren, auf ein Gesamtvolumen von 350 µl RLT aufgefüllt.

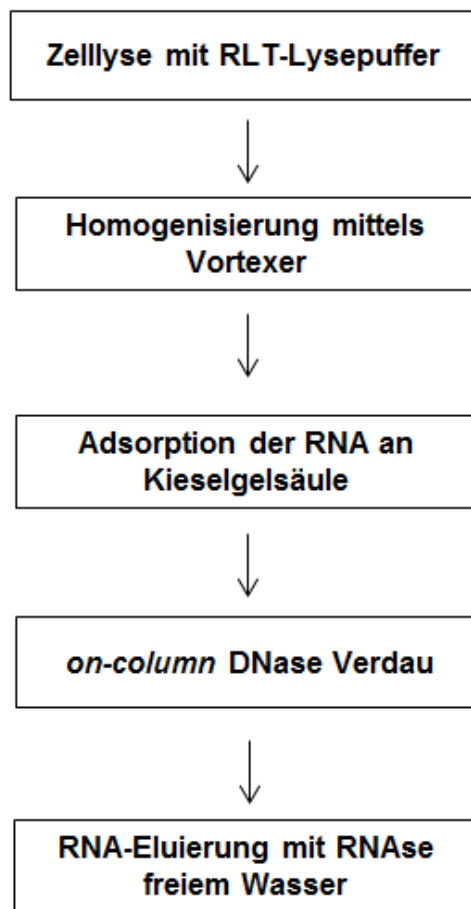


Abbildung 8: Extraktion der Gesamt-RNA.

Nach der Zellyse mit RLT-Lysepuffer wurden durch Vortexen die Zellysate homogenisiert. Die Adsorption der RNA an die Kieselgelsäulen erfolgt über polare Wechselwirkungen der RNA mit der Kieselgelmatrix. Mit einem *on-column* DNase Verdau (DNase Set, Qiagen, Hilden, Cat.No.79254) wurde an die Kieselgelsäulen gebundene genomische DNA eliminiert. Die Eluierung der Gesamt-RNA erfolgte mit RNase freiem Wasser. (Abbildung modifiziert nach *RNeasy Micro Handbuch*, 2. Auflage, Dezember 2007).

Mit der RLT-Pufferlösung erfolgte der Zellaufschluss. Dadurch wird die zytoplasmatische RNA einer Extraktion zugänglich. Durch die Zugabe von Guanidin-isothiocyanat (GITC), einem chaotropen Salz, werden RNasen, die einen RNA-Abbau bewirken könnten, inaktiviert. Eine zusätzliche Supplementierung mit β -Mercaptoethanol, einem weiteren RNase-Inhibitor, wird nach Herstellerangaben dann empfohlen, wenn es sich um RNase-reiche Zelllinien handelt. RNasen sind hochaktive und stabile Enzyme, die während des Lyseprozesses aus dem Zytoplasma freigesetzt werden oder durch externe Kontamination in den Probenansatz gelangen können. β -Mercaptoethanol denaturiert durch Reduktion von Disulfidbrücken irreversibel RNasen (Samadani et al., 2015). Im Zuge der RNA-Isolierung muss daher auf RNase-freie Umgebung geachtet werden.

Auch eine Kontamination mit genomischer DNA ist zu vermeiden, da diese unter Co-Amplifizierung von DNA-Fragmenten die sehr sensitive qPCR beeinträchtigen könnte. Um die RNA-Integrität nicht zu beeinflussen, wurde zudem auf Eis gearbeitet.

Voraussetzung für eine effektive Gewinnung der Gesamt-RNA nach der Zellyse mittels RLT-Pufferlösung ist eine effiziente Homogenisierung der Zellysate. Bei einer Zellzahl ≤ 100.000 ist nach Herstellerangaben ein sorgfältiges Durchmischen mittels Vortexer ohne zusätzliche mechanische Homogenisierung ausreichend. Zerstörte Zellmembranen, Zellorganellen sowie eine intakte genomische DNA lassen das Zellysat sehr viskos erscheinen und können eine vollständige RNA-Freisetzung ins Lysemedium erschweren. Nach der Homogenisierung wurden die einzelnen Reaktionsansätze in einem Ausgangsvolumen von 350 μl in den QIAcube überführt und die Gesamt-RNA wurde anschließend vollautomatisiert extrahiert. Aus einem Reaktionsansatz mit 350 μl erhielt man 15 μl RNA-Eluat. Die eluierte Gesamt-RNA wurde bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder nach der Bestimmung von Qualität und Quantität (s. 2.6) direkt zu cDNA transkribiert (s. 2.7).

Bei ausgewählten Patientenproben wurden dem RLT-Lysepuffer vor der Homogenisierung 5 μl einer Poly-A RNA (4 $\text{ng}/\mu\text{l}$), eine sogenannte *carrier* RNA, zugesetzt, um die RNA-Extraktionsmenge zu maximieren. Solche Trägersubstanzen sind Nukleinsäuren, die durch Förderung der Präzipitation von geringen RNA-Mengen die Bindungswahrscheinlichkeit an die Kieselgelsäulen erhöhen. Die niedrigen Konzentrationen an Träger-RNA haben keinen Einfluss auf weitere qPCR Analysen (*Shaw et al., 2009*).

2.6. Spektrophotometrische Qualitäts- und Quantitätsbestimmung der extrahierten RNA

Qualität und Quantität der extrahierten Gesamt-RNA wurden spektralphotometrisch mit dem NanoDrop 2000/2000c UV-Vis Spektralphotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) nach Herstellerangaben (User Manual, Version 1.0) bestimmt. Da qualitativ hochwertige RNA für zuverlässige Ergebnisse in der nachgeschalteten RT-PCR von entscheidender Bedeutung ist, wurde neben der Konzentrationsbestimmung auch die Reinheit der RNA untersucht. Für die einzelnen Messungen wurde 1,5 µl der extrahierten RNA eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde RNase-freies Wasser verwendet.

Die Lichtabsorption der Probenansätze wurde bei einer Wellenlänge von 230 nm, 260 nm und 280 nm gemessen. Das Absorptionsmaximum der RNA liegt bei 260 nm (A_{260}). Die absolute RNA-Konzentration [ng/µl] wurde vom Gerät nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz ermittelt.

Als Reinheitsparameter wurden die Quotienten der Absorption bei 260 nm (A_{260}) und 230 nm (A_{230}) (Ratio 260/230) sowie bei 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}) (Ratio 260/280) bestimmt. Aromatische Aminosäuren von Proteinen zeigen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm (A_{280}), sodass der Quotient $A_{260}/280$ (Ratio 260/280) eine mögliche Proteinkontamination anzeigt. Die Ratio 260/280 sollte für eine hohe RNA-Reinheit idealerweise bei 2,0 (1,8-2,1) liegen. Liegt der Wert unter 1,8, ist von einer Proteinkontamination auszugehen. Diese Proteinverunreinigungen könnten nachfolgende Experimente, v.a. reverse Transkription und RT-PCR, negativ beeinflussen. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm (A_{260}) und 230 nm (A_{230}) (Ratio 260/230) gibt den Grad der Verunreinigung mit organischen Verbindungen an. V.a. Phenole und chaotrope Salze (z.B. GITC) aus der RNA-Isolation absorbieren bei 230 nm. Der Quotient $A_{260}/230$ sollte bei guter RNA-Qualität idealerweise $> 1,8$ sein, denn auch diese organischen Verbindungen können mit der nachgeschalteten reversen Transkription interferieren.

2.7. Reverse Transkription der RNA zur cDNA-Synthese

Die Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kits (Life Technologies, Darmstadt, Cat.No.12328040) nach Herstellerangaben revers in cDNA (*complementary DNA*, komplementäre DNA) transkribiert. Die Synthese von cDNA ist Voraussetzung für eine Amplifizierung definierter RNA-Bereiche mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR), da RNA selbst nicht als Matrize für die in der PCR verwendete DNA-Polymerase geeignet ist. Tabelle 5 zeigt das verwendete Pipettierschema.

Komponente	Konzentration	Volumen
Gesamt-RNA	ca. 0,5 – 1,8 µg	9 µl
Random Hexamer Primers	50 ng/µl	1 µl
dNTP Mix ¹⁾	10 mM	2 µl
cDNA Synthesis Buffer ²⁾	5 x	4 µl
DTT ³⁾	0,1 M	1 µl
RNase Out [®] Ribonuklease Inhibitor	40 U/µl	1 µl
RNase freies Wasser ⁴⁾	-	1 µl
Cloned AMV Reverse Transkriptase	15 U/µl	1 µl
Gesamtvolumen		20 µl

Tabelle 5: Pipettierschema der cDNA-Synthese (Cloned AMV First-strand cDNA Synthesis Kit, Life Technologies, Darmstadt). ¹⁾ dNTP Mix: dATP, dGTP, dCTP, dTTP. ²⁾ cDNA Synthesis Buffer: 250 mM Trisacetat (pH 8,4), 375 mM Natriumacetat, 40 mM Magnesiumacetat, Stabilisator, 20 µl/ml BSA. ³⁾ DTT = 1,4-Dithiothreitol. ⁴⁾ RNase freies Wasser (Qiagen, Hilden).

Als RNA-abhängige DNA-Polymerase wurde *cloned avian myeloblastosis virus* Reverse Transkriptase verwendet, isoliert aus dem Retrovirus *avian myeloblastosis virus* (AMV). Die reverse Transkriptase transkribiert die vorliegende Einzelstrang-RNA in einzelsträngige cDNA. Zur Initiierung der cDNA-Synthese wurden Random Hexamer Primers (einzelsträngige 6-Basen-Oligonukleotide) eingesetzt. Die Bindung dieser Hexamere an die RNA erfolgt an beliebiger, komplementärer Bindungsstelle, wodurch die reverse Transkription an beliebiger Stelle auf der RNA beginnt und somit ein cDNA-Pool unterschiedlich langer cDNA-Fragmente entsteht. Abbildung 9 zeigt den Reaktionsablauf der cDNA-Synthese mit Temperaturprofil. Die generierte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

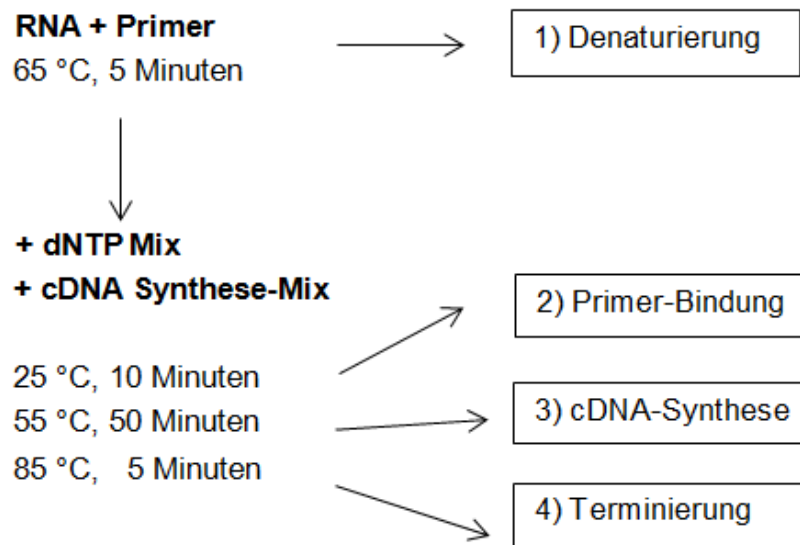


Abbildung 9: Reaktionsablauf der cDNA-Synthese mit Temperaturprofil.

- 1) Denaturierung von RNA- / Primerhybridisierungen, Inaktivierung von DNasen
- 2) Primer-Bindung
- 3) Ablauf der cDNA-Synthese bei 55 °C, was dem Temperaturoptimum (45-55 °C) der AMV-Reversen Transkriptase entspricht. cDNA Synthese-Mix: cDNA Synthesis Buffer, DTT, RNase Out (als RNase Inhibitor), RNase freies Wasser, Cloned AMV Reverse Transkriptase.
- 4) Terminierung der cDNA-Synthese durch Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase.

2.8. Expressionsanalyse von Referenzgenen und ausgewählten Zielgenen mittels quantitativer *real time* PCR

2.8.1. Allgemeines Prinzip der quantitativen *real time* PCR

In der qPCR werden Endpunkt-PCR und Echtzeit-PCR (*real time* PCR) unterschieden. In der sogenannten Endpunkt-PCR wird die Amplifikatmenge nach ca. 30-40 PCR-Zyklen ermittelt. Da die terminale DNA-Menge von einer Reihe von variablen Faktoren abhängt (z.B. Temperatur, Zeitfenster, Konzentration der Reaktionspartner, Aktivität der Polymerase, Kumulation von Inhibitoren), können die Versuchsergebnisse sehr stark variieren. Deshalb wird die Endpunkt-PCR in der Regel nicht mehr durchgeführt.

Dagegen liefert die *real time* PCR sensitive und reproduzierbare Ergebnisse, da bereits nach jedem PCR-Zyklus die neugebildeten DNA-Fragmente detektiert werden und in der exponentiellen Phase ein exakter Amplifikationsnachweis erfolgt. Nur in der exponentiellen Phase liegen optimale Reaktionsbedingungen für eine DNA-Verdopplung vor, sodass gerade dieser Reaktionsabschnitt valide und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Die Amplifikatmenge wird mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen bestimmt, deren Emissionen proportional zur Produktmenge zunehmen. Der sogenannte Ct-Wert (*cycle threshold*) beschreibt die Zyklusnummer, bei der das gemessene Fluoreszenzsignal einen definierten Fluoreszenz-Schwellenwert (Hintergrundfluoreszenz) überschreitet. Ausgehend vom Ct-Wert können Rückschlüsse auf die ursprüngliche DNA-Menge gezogen werden. Je größer die ursprüngliche DNA-Menge ist, desto früher kann der Fluoreszenz-Schwellenwert überschritten werden und desto niedriger ist der Ct-Wert. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden der quantitativen *real time* PCR angewandt. Die Genexpressionsanalyse von Referenzgenen erfolgte mit der TaqMan Methode, die einzelnen Zielgene wurden mittels LightCycler Methode in unserem Kooperationslabor in Dresden, dem Institut für Pathologie der Technischen Universität Dresden, untersucht. Aus logistischen Gründen und fehlendem Ausgangsmaterial für die Analyse der Zielgene mittels TaqMan Methode wurde auf die in Dresden verfügbare LightCycler Technologie zurückgegriffen. Die Informationen zu diesem Kapitel wurden dem *Methods and Application Guide: Introduction to Quantitative PCR* (Agilent Technologies, 2010) entnommen.

2.8.2. Expressionsanalyse von Referenzgenen zur cDNA-Qualitätsbestimmung mittels TaqMan Methode

2.8.2.1. Prinzip der TaqMan *real time* PCR

Im TaqMan Assay werden sequenzspezifische fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide verwendet, die an ihrem 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (z.B. 6-Carboxyfluorescein, Synonym: 6-FAM) und am 3'-Ende mit einem Quencher („Fluoreszenzlöscher“, z.B. 6-Carboxytetramethylrhodamin, Synonym: TAMRA-Quencher) verbunden sind (Kutyavin et al., 2000). Ebenso werden SYBR-Green Farbstoffe verwendet. Diese binden jedoch unspezifisch an neu synthetisierte DNA-Doppelstränge und ein spezifisches Fluoreszenzsignal entsteht erst am Ende der Elongationsphase nach Interkalation in die doppelsträngige DNA. Dahingegen binden TaqMan-Sonden genau wie die verwendeten Primer an spezifische Einzelstrang-DNA-Sequenzen (Abb. 10).

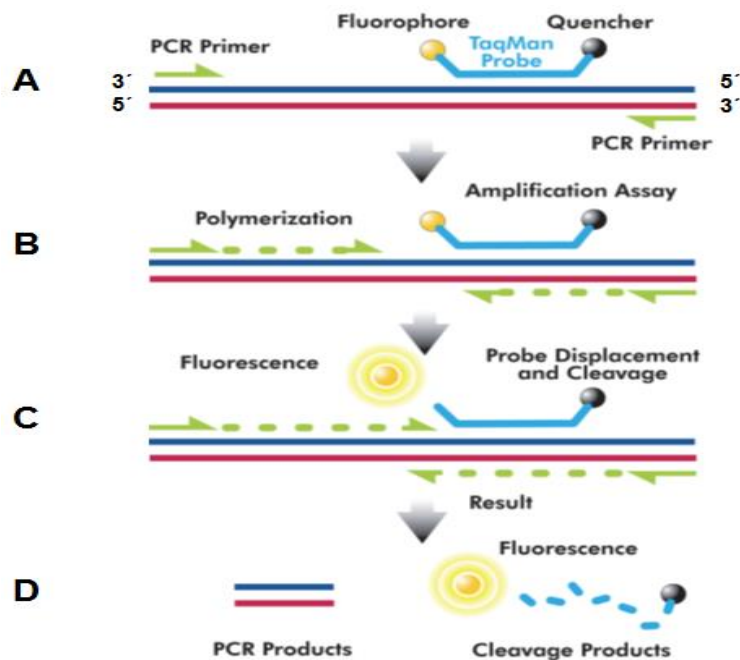


Abbildung 10: Prinzip der TaqMan Methode der quantitativen *real time* PCR.

- A) TaqMan-Sonden (*TaqMan Probes*) bestehen aus einem Fluorophor (Reporter-Fluoreszenzfarbstoff) am 5'-Ende und einem Quencher am 3'-Ende. Bei intakter Sonde und räumlicher Nähe von Quencher und Fluorophor kommt es zu einer Auslöschung (*Quenching*) des vom Fluorophor emittierten Fluoreszenzsignals durch den Quencher. Es kann somit kein Fluoreszenzsignal detektiert werden.
- B) Nach Hybridisierung der Sonde an eine spezifische Einzelstrang-DNA-Sequenz in Primer-Nähe erfolgt die DNA-Synthese mit Hilfe der Taq-Polymerase.
- C) Die Taq-Polymerase spaltet mit ihrer 5'-3'-Exonuklease-Aktivität die TaqMan-Sonde am 5'-Ende.
- D) Durch Hydrolyse und Spaltung der TaqMan-Sonde kommt es zu einer räumlichen Separation zwischen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und Quencher. Das Fluoreszenzsignal kann nun detektiert werden. Die Abbildung wurde dem *Methods and Application Guide: Introduction to Quantitative PCR* (Agilent Technologies, 2010) entnommen.

Bei den TaqMan-Sonden findet nach Hybridisierung an den DNA-Strang noch keine Fluoreszenzdetektion statt, da die Emission des Reporterfarbstoffes vom Quencher ausgelöscht wird. Während der Elongation katalysiert die Taq-Polymerase die hydrolytische Spaltung der Sonde. Erst dann kann das Fluoreszenzsignal detektiert werden, da der Quencher nicht mehr in unmittelbarer Nähe des Reporterfarbstoffes ist. Die TaqMan-Fluoreszenzfarbstoffe werden daher auch *hydrolysis probes* genannt, da das Fluoreszenzsignal erst nach Hydrolyse der Sonde entsteht und nicht bereits durch Hybridisierung der Farbstoffsonde an die DNA. Jedes freigesetzte Molekül des Reporterfarbstoffes repräsentiert einen neu synthetisierten DNA-Strang.

Somit kann über die Fluoreszenzmessung ein direkter Rückschluss auf die DNA-Quantität gezogen werden (*Bustin, 2000*). Falls nicht anders angegeben, wurden die Informationen zu diesem Kapitel aus dem *Methods and Application Guide: Introduction to Quantitative PCR (Agilent Technologies, 2010)* entnommen.

2.8.2.2. Versuchsdurchführung und Auswertung der TaqMan *real time* PCR

Die cDNA-Qualität wurde durch die Genexpressionsanalyse der beiden Referenzgene (Housekeeping Gene) HMBS (Hydroxymethylbilan-Synthase, Synonym: Porphobilinogen-Deaminase) und HPRT1 (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1) bestimmt. HMBS stellt ein Schlüsselenzym der Häm-Biosynthese dar und katalysiert die Polymerisation von Porphobilinogen in eine Porphyrin-Vorstufe. HPRT1 ist ein Enzym des Purinstoffwechsels und katalysiert Phosphorylierungsreaktionen von Purinbasen für deren Recycling-Weg.

Eine qualitativ hochwertige cDNA ist Voraussetzung für eine reproduzierbare Genexpressionsanalyse von Zielgenen. Referenzgene kodieren für Proteine des Zellstoffwechsels. Zum Nachweis einer qualitativ hochwertigen cDNA sollten die beiden Referenzgene unabhängig von der experimentellen Methode stabil in allen analysierten Zelllinien und Gewebeproben exprimiert werden (*Bustin, 2000; Jensen, 2012*). Nach *de Kok et al. (2005)* könnte anstelle der Expressionsanalyse von multiplen Referenzgenen auch die alleinige Analyse von HPRT1 als Goldstandard verwendet werden. Lediglich bei geringen Probenmengen ist die Verwendung von HPRT1 limitiert, da es im Vergleich zu anderen Referenzgenen (z.B. β -Aktin) relativ gering exprimiert wird.

Die Expressionsanalyse der genannten Referenzgene erfolgte nach der TaqMan Methode mit dem Stratagene PCR Cycler MX3005P (Agilent Technologies, Darmstadt, Deutschland) nach Herstellerangaben in 96-Well-Mikrotiterplatten (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Cat.No.710884). Es wurden Triplikate mit 4 μ l cDNA (1:5 verdünnt) pro Well pipettiert, mit cDNA der Zelllinie SKBR3 als Positivkontrolle (15 ng/ μ l). RNA (10 ng/ μ l) diente als Negativkontrolle, während als *no template control* (NTC) RNase freies Wasser verwendet wurde. HPRT1 und HMBS wurden immer gemeinsam in einer 96-Well-Platte gemessen. Die 96-Well-Mikrotiterplatten wurden mit einer Plastikfolie versiegelt und vor dem Reaktionsstart für eine Minute bei 1000 x g zentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen. Jede cDNA-Präparation wurde in ein bzw. zwei unabhängigen qPCR-Läufen analysiert. Das Pipettierschema des Reaktionsmixes zeigt Tabelle 6.

Komponente	Volumen
cDNA (in Triplets, Verdünnung 1:5)	4 µl
Assay on Demand Primer (HPRT1/HMBS) ¹⁾	1 µl
Brilliant II QPCR Master Mix with High ROX ²⁾	10 µl
RNase freies Wasser ³⁾	5 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 6: Pipettierschema der qPCR (TaqMan Methode) zur Genexpressionsanalyse von Referenzgenen. Für die Referenzgene HMBS und HPRT1 wurden jeweils getrennte Reaktionsansätze pipettiert. Die Bezugsquellen sind den Fußnoten zu entnehmen. ¹⁾ Applied Biosystems, Foster City, USA, Cat.No. 4351370, Assay-ID: Hs00609297_m1 (HMBS), Hs01003267_m1 (HPRT1). ²⁾ Agilent Technologies, Darmstadt, Deutschland, Cat.No.600805. ³⁾ Qiagen, Hilden. cDNA Proben wurden in Triplikaten in 20 µl Endvolumen pipettiert. Der Mastermix beinhaltet eine hitzestabile Taq-Polymerase, dNTPs und Magnesium. Die Durchführung erfolgte nach einer SOP der Klinischen Forschergruppe, Frauenklinik, TU München.

Als Reporter-Fluoreszenzfarbstoff wurde 6-FAM mit hochkonzentriertem ROX (5-Carboxy-Rhodamin-X) als passivem Referenzfarbstoff verwendet, dessen Fluoreszenzemission unabhängig von der Amplifikation konstant bleiben sollte. Da die Fluoreszenzintensität des Reporterfarbstoffes aufgrund von Pipettierungenauigkeiten oder Schwankungen von Geräteparametern (z.B. Lampenintensität) von Well zu Well variieren kann, wurde das Reporter-Fluoreszenzsignal gegen den Referenzfarbstoff normalisiert, um diese Abweichungen auszugleichen und die Datenpräzision zu erhöhen (R_n = normalisiertes Reportersignal).

Zu Beginn wurde bei 95 °C für zehn Minuten die Taq-Polymerase aktiviert (Prä-Denaturierung, Hot-Start Aktivierung). Die Taq-Polymerase ist bei Raumtemperatur inaktiv, wodurch in der Vorbereitungsphase eine Amplifizierung von unspezifischen Genprodukten verhindert wird. Anschließend wurden in einem zweistufigen Temperaturprofil 40 PCR-Zyklen durchlaufen. Nach 15 Sekunden DNA-Denaturierung bei 95 °C erfolgte bei 60 °C für eine Minute die Annealing- und Extensionsphase. Die optimale Arbeitstemperatur der Taq-Polymerase würde bei 72 °C liegen, allerdings können bei 60 °C die TaqMan-Sonden optimal an den DNA-Strang hybridisieren. Die Dauer eines Analyselaufes betrug 90 Minuten. Die Vorgehensweise erfolgte nach Herstellerangaben des Brilliant II QPCR Mastermix (Agilent Technologies, Darmstadt, Deutschland, Cat.No.600805).

Die Datenanalyse wurde mit der Software des Agilent MX3005P (MXPro-qPCR Software, Version 4.0, Stratagene, Agilent Technologies, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Ct-Werte wurden automatisch von der Software ermittelt. Für jeden einzelnen Assay wurde dabei eine adaptive Korrektur der Basislinie durchgeführt und ein amplifikationsbasierter Schwellenwert erstellt (Bereich 5-60%, Fluoreszenzwert gemittelt über alle Replikate). Zudem wurden die Ct-Werte automatisch gegen die Hintergrundfluoreszenz des Referenzfarbstoffes ROX normalisiert (*dRn, delta normalized reporter signal*). Die normalisierten Ct-Werte wurden in Microsoft Excel 2010 exportiert und aus den jeweiligen Triplikaten wurde der Mittelwert mit Standardabweichung berechnet. Sowohl in der Negativkontrolle als auch in der *no template control* sollte als interner Qualitätsparameter keine cDNA detektierbar sein (Ct-Wert > 40). Die Positivkontrolle sollte sich in einem Ct-Bereich von ca. 25-30 bewegen, analog der gemessenen Ct-Werte der Referenzgene. Mit dem Wissen, dass unter optimalen Reaktionsbedingungen der Anstieg um einen Ct-Wert eine vollständige Verdoppelung der cDNA bedeutet, sollten Ct-Werte aus identischen RNA-Präparationen möglichst geringe Abweichungen aufweisen.

Die Auswertung erfolgte nach der sogenannten Δ Ct-Methode. Es wurde die Differenz der Ct-Werte von HMBS und HPRT1 (Δ Ct^{HMBS-HPRT1}) gebildet und anschließend $2^{-\Delta$ Ct (HMBS-HPRT1)} berechnet (*Schmittgen und Livak, 2008; Jensen, 2012*). Die Fehlerfortführung bzw. der absolute Fehler F wurde nach folgender Formel berechnet:

$$y = \sqrt{\frac{s(\text{Referenzgen 1})^2 + s(\text{Referenzgen 2})^2}{2}}$$

$$F = (y \cdot 2^{\Delta \text{Ct}(\text{Referenzgen 1} - \text{Referenzgen 2})}) \cdot \ln 2$$

(*F = absoluter Fehler, s = Standardabweichung*)

2.8.3. Expressionsanalyse von ausgewählten Zielgenen mittels LightCycler Methode

2.8.3.1. Prinzip der LightCycler *real time* PCR

Die LightCycler Methode ist nach *Nitsche et al. (1999)* in Sensitivität und Spezifität mit der Taqman Methode vergleichbar. Die qPCR wird mit dem LightCycler Gerät (Roche Diagnostics, Mannheim) in kleinen Glaskapillaren durchgeführt, die sich in einem Karussell befinden und regelmäßig an einem Fluorometer vorbeigeführt werden. Die Proben werden in Glaskapillaren mit einem Fassungsvermögen von 5-20 µl gefüllt und anschließend im Karussell positioniert. Maximal 32 Proben können pro Lauf in weniger als 20 Minuten analysiert werden, da ein Amplifikationszyklus nur ca. 30 Sekunden dauert. Das Temperaturprofil wird mittels Luftkühlung erzeugt. Der Fluorometer emittiert in Abhängigkeit von den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen monochromatisches Licht einer bestimmten Wellenlänge. Dadurch werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und das von den Proben emittierte Fluoreszenzsignal wird anschließend in einem Photodetektor detektiert. Die Photodioden haben verschiedene Filtersysteme integriert, sodass unterschiedliche Wellenlängen erfasst werden können.

Im LightCycler-System kann mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gearbeitet werden. Neben den TaqMan-Sonden (*hydrolysis probes*) werden oft sogenannte duale Hybridisationsfarbstoffe verwendet (Abb. 11). Hierbei werden zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt. Diese sind an zwei einzelsträngige DNA-Oligonukleotide gekoppelt. Der Donor-Farbstoff ist Fluorescein und am 3'-Ende der ersten Sonde gebunden. Fluorescein emittiert nach Anregung grünes Licht. Der Akzeptorfarbstoff ist am 5'-Ende der zweiten DNA-Sonde gebunden. Der Akzeptorfarbstoff ist z.B. LightCycler Red 640. Die zweite DNA-Sonde ist am 3'-Ende phosphoryliert, um während des Annealingprozesses eine Extension durch die DNA-Polymerase zu vermeiden. Nach spezifischer Hybridisierung der beiden Sonden an das Amplikon kommt es zwischen beiden Fluorophoren zum Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) und zur Signaldetektion. Aufgrund einer höheren Temperatur in der Elongationsphase gehen beide Farbstoffsonden hier wieder in Lösung, da sie nicht mehr an die DNA hybridisieren können. Im Vergleich zu TaqMan-Sonden werden diese DNA-Sonden nicht degradiert. Durch räumliche Separation ist kein FRET und somit keine Signaldetektion mehr möglich. Die Informationen zu diesem Kapitel, soweit nicht anders angegeben, stammen aus *Bustin (2000)*.

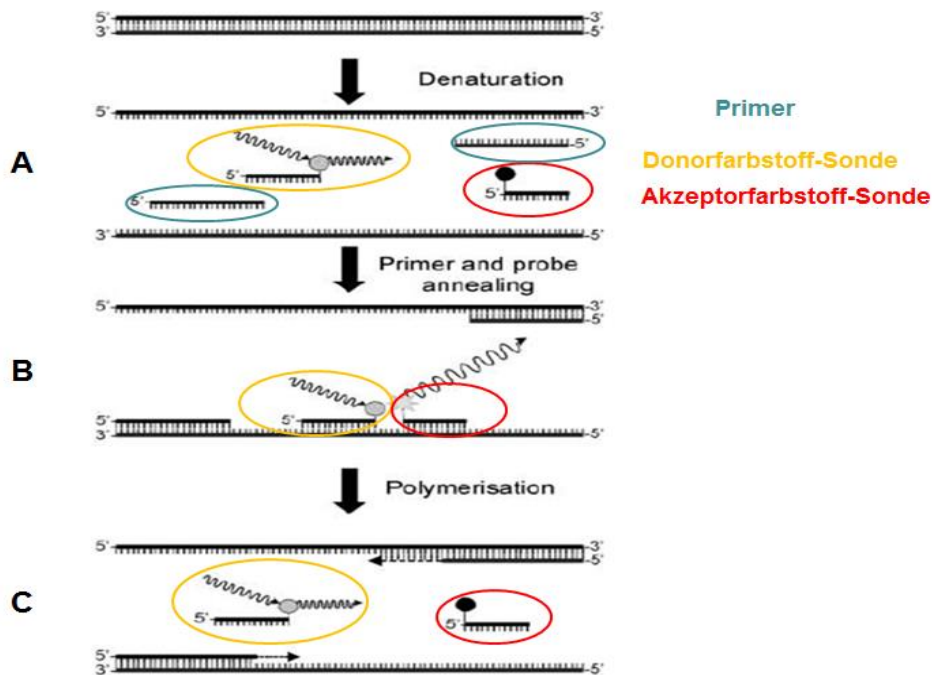


Abbildung 11: Prinzip der LightCycler Methode der quantitativen *real time* PCR mit dualen Hybridisationsfarbstoffen.

- A) Die verwendeten Hybridisationsfarbstoffe (Donor- und Akzeptorfarbstoff) sind gekoppelt an einzelsträngige DNA-Sonden. Während der DNA-Denaturierung bleiben beide Hybridisationsfarbstoffe in Lösung und werden räumlich separiert. Da wegen der räumlichen Separation das vom Donor emittierte Licht nicht auf den Akzeptor übertragen werden kann, findet kein Energietransfer im Sinne von FRET statt und es kann kein Fluoreszenzsignal detektiert werden. Als Fluorophore werden z.B. Fluorescein und LightCycler Red 640 verwendet.
- B) Während des Primer-Annealings hybridisieren beide Farbstoffsonden in enger räumlicher Nähe an spezifische Einzelstrang-DNA-Sequenzen. FRET kann nun stattfinden und ermöglicht eine Fluoreszenzdetektion.
- C) Während der Elongationsphase ist bei einer höheren Temperatur keine Hybridisierung der Farbstoffsonden an die DNA mehr möglich. Beide Farbstoffsonden gehen unverändert in Lösung und separieren sich. Aufgrund der Separierung ist kein FRET und somit auch keine Fluoreszenzdetektion mehr möglich. (Abbildung modifiziert nach *Bustin, 2000*).

2.8.3.2. Versuchsdurchführung und Auswertung der LightCycler *real time* PCR

Mittels LightCycler Technologie erfolgte die Genexpressionsanalyse der Zielgene uPA, uPAR, uPAR-del4/5, Rab31, KLK7 und des Referenzgenes TBP (*TATA-box binding protein*). Die Analyse wurde extern von unserem Kooperationslabor, dem Institut für Pathologie der Technischen Universität Dresden durchgeführt. Das

experimentelle Vorgehen basierte auf *Luther et al. (2003)*, *Schmidt et al. (2006)* und *Biermann et al. (2008)*. Es wurden LightCycler Fast Start DNA Master Hybridization Probes (Roche, Mannheim) verwendet, welche als Fluorophore Fluorescein und LightCycler Red 640 enthielten. Daneben kamen sequenzspezifische HPLC-gereinigte RT-PCR Primer (TIB Molbiol, Berlin) zur Anwendung. In jedem PCR-Assay wurden 2 µl der 1:6 verdünnten cDNA eingesetzt. Die Auswahl des Referenzgenes fiel auf TBP, da für die Untersuchungen mittels LightCycler nur mit TBP beschichtete Standardglaskapillaren zur Verfügung standen. Das Referenzgen TBP ist ein Transkriptionsfaktor, der zur Transkriptionsinitiation an spezifische DNA-Sequenzen, an die sogenannte TATA-Box, bindet und den Startpunkt für die RNA-Polymerase II markiert (*Kornberg, 2007*).

Jede RNA-Präparation wurde in zwei unabhängigen LightCycler-Läufen analysiert. Jeder LightCycler-Lauf bestand aus zwei unabhängigen Messeinheiten, in denen die absolute Molekülzahl der Zielgene ermittelt wurde. Aus den absoluten Molekülzahlen wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Der Mittelwert wurde anschließend als Stoffmenge in zmol angegeben. Die Stoffmenge des Zielgens wurde gegen die absolute Stoffmenge des Referenzgens TBP normalisiert (genannt Ratio Zielgen/TBP). In jedem LightCycler-Lauf wurde die Fehlerfortführung berechnet. Aus den relativen Molekülzahlen der zwei unabhängigen LightCycler-Läufe wurde wiederum der Mittelwert mit Standardabweichung berechnet. Dieser Mittelwert, angegeben als Ratio Zielgen/TBP, stellte das Ergebnis der jeweiligen Probe bzw. der jeweiligen RNA-Präparation dar. Bei Analysen aus mehreren unabhängigen Ansätzen wurde der Mittelwert mit Standardabweichung berechnet.

In jedem LightCycler-Lauf wurden zum Spezifitätsnachweis eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Durch Vermessung des Inhalts von neun Standardglaskapillaren (Roboscreen, Leipzig) wurde für jede Zielsequenz eine logarithmische Standardkurve generiert. Die Glaskapillaren waren mit definierten Molekülzahlen der Zielsequenz beschichtet. In der Standardkurve wurden Molekülzahlen von 10, 50, 500, 1.000, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000 und 1.000.000 abgebildet. Über die absolute Quantifizierung der mRNA-Menge (Molekülzahl in zmol) mittels Standardkurve wurde durch Normalisierung gegen das Referenzgen TBP eine relative Quantifizierung der Expressionshöhe erreicht.

Die Expressionshöhe der jeweiligen Zielgene wurde mit der LightCycler Software (Version 3.5, Roche Diagnostics, Mannheim) von den Kollegen in Dresden berechnet. Die Datenanalyse erfolgte nach *Luther et al. (2003)* und *Biermann et al. (2008)*. Für jede analysierte Probe wurde der Ct-Wert ermittelt und eine Standardkurve generiert. Auf der X-Achse wurde für ein bestimmtes Gen die logarithmische Molekülzahl aufgetragen, auf der Y-Achse der Ct-Wert. Über lineare

Regression wurde die Gleichung der Standardkurve ermittelt. Unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors wurde mittels Standardkurve die absolute Molekülzahl als Stoffmenge in zmol angegeben. Bei einer verdünnten Molekülzahl < 50 wurde die Probe ausgeschlossen und als „unter der Nachweisgrenze“ deklariert. Für eine relative Quantifizierung wurde die aus erster und zweiter Messung ermittelte Stoffmenge gegen die Transkriptmenge des Referenzgens normalisiert. Für jede RNA-Präparation wurde somit eine relative mRNA-Expressionshöhe bestimmt, bezeichnet als Ratio ($\text{zmol}_{\text{Zielgen}}/\text{zmol}_{\text{TBP}}$). Bei Analyseproben mit mehreren unabhängigen Ansätzen wurde aus den einzelnen Ratios der Mittelwert mit Standardabweichung berechnet, genannt Ratio (Zielgen/TBP). Die Normalisierung gegen ein konstitutiv exprimiertes Referenzgen ist Goldstandard in der Auswertung der quantitativen *real time* PCR, um experimentelle Variationen (z.B. Unterschiede in der eingesetzten Zellzahl oder Materialmenge, interindividuelle Expressionsunterschiede, unterschiedliche Effizienz der RNA-Isolierung bzw. cDNA-Synthese) zu nivellieren (Bustin, 2000).

Um die Genexpression der analysierten Zielgene in 2D- und 3D- Kulturbedingungen vergleichen zu können, wurde die Ratio aus 2D-Kulturbedingungen gegen die Ratio aus 3D-Kulturbedingungen normalisiert (genannt Ratio 2D/3D). Bei einem Wert $\leq 0,5$ bzw. $\geq 2,0$ wurde eine signifikante Expressionsänderung zwischen 2D und 3D definiert, während im Bereich 0,51 bis 1,99 keine eindeutigen Expressionsänderungen zwischen 2D und 3D anzunehmen waren. An dieser Stelle ist zu bemerken, dass es sich bei der Bezeichnung „signifikant“ nicht um eine statistische Signifikanz handelt. Die einzelnen Abbildungen wurden mit Hilfe von Microsoft Excel 2010 erstellt. Die Fehlerfortführung bzw. der absolute Fehler F wurde nach folgender Formel berechnet:

$$y = \sqrt{\frac{s(\text{Zielgen})^2 + s(\text{Referenzgen TBP})^2}{2}}$$

$$F = \frac{y}{100} \cdot \text{Ratio} \left(\frac{\text{Zielgen}}{\text{Referenzgen TBP}} \right)$$

(F = absoluter Fehler, s = Standardabweichung)

3. Ergebnisse

3.1. Bestimmung einer optimalen Zellzahl pro Sphäroid für reproduzierbare Genexpressionsanalysen

3.1.1. RNA-Isolierung und cDNA-Qualitätsbestimmung im 2D-Zellmodell: Analyse der Zelllinie MDA-MB-231

Nach Angabe von SpheroTec[®] können aus ca. 50.000 Zellen stabile Sphäroide gebildet werden. Mit Hilfe von Verdünnungsreihen wurde zuerst in 2D-, und anschließend in 3D-kultivierten Zelllinien die Zellzahl bestimmt, bei der eine reproduzierbare Expressionsanalyse von Referenzgenen möglich ist. Die Zelllinie MDA-MB-231 wurde ausschließlich im 2D-Zellmodell untersucht, da MDA-MB-231 Zellen nach Aussage von SpheroTec[®] mittels Liquid-Overlay-Technik keine Sphäroide bilden. In der uPAR-del4/5 überexprimierenden Zelllinie MDA-MB-231 wurden vor der RNA-Isolierung durch serielle Verdünnung von Zelllysaten zwei unabhängige Verdünnungsreihen generiert. Es wurden Zellzahlen von 80.000 bis 2.500 abgebildet. Die Ergebnisse der RNA-Isolierung aus der ersten Verdünnungsreihe waren in der zweiten Verdünnungsreihe reproduzierbar (Tab. 7). Bis zu einer Zellzahl von 20.000 halbierte sich bei jedem Verdünnungsschritt der RNA-Gehalt mit nahezu gleichbleibenden qualitativ hochwertigen Reinheitsparametern. Die Ratio 260/280 lag bei 80.000 bis 20.000 Zellen bei ~2,0 und auch die Ratio 260/230 bewegte sich im nahen Zielbereich von ~1,8. Bei Zellzahlen < 20.000 nahm sowohl die Ratio 260/280, als auch die Ratio 260/230 ab.

Zur Bestimmung der cDNA-Qualität wurde in den zwei unabhängigen Verdünnungsreihen die Expression des Referenzgenes HPRT1 untersucht. Tabelle 7 zeigt die Ct-Werte des ersten und zweiten PCR-Laufes, sowie den Ct-Mittelwert aus beiden PCR-Läufen mit Standardabweichung. Die Ergebnisse beider Läufe stimmen gut überein. Bis zu einer Reduzierung der Zellzahl auf 10.000 Zellen ist bei jedem Verdünnungsschritt ein Ct-Wert < 30 zu beobachten. Die Negativkontrolle und die *no template control* zeigten in keinem Lauf eine cDNA-Amplifikation und die mitgeführte Positivkontrolle bewegte sich im gleichen Ct-Bereich wie das Zielgen (hier nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte dargestellt werden, dass im 2D-Zellmodell bei Zellzahlen von 80.000 bis 10.000 eine reproduzierbare Expressionsanalyse des Referenzgenes HPRT1 möglich ist. Dementsprechend wurden nachfolgende Experimente mit Sphäroiden bestehend aus 50.000 Zellen durchgeführt.

Zellzahl	RNA [ng/μl]	260/280	260/230	RNA-Input für cDNA-Synthese [ng]	Ct _{HPRT1} (s) 1.Lauf	Ct _{HPRT1} (s) 2.Lauf	Ct _{HPRT1} (s) MW
80.000	108,24	2,05	1,90	974,16	25,84 (0,19)	25,65 (0,06)	25,75 (0,13)
40.000	69,68	2,05	1,74	627,12	25,27 (0,06)	25,22 (0,04)	25,25 (0,04)
20.000	28,40	1,84	0,90	255,60	27,50 (0,54)	27,19 (0,07)	27,35 (0,22)
10.000	16,00	1,87	0,68	144,00	29,73 (0,12)	29,38 (0,02)	29,56 (0,25)
5.000	6,24	1,60	0,21	56,16	36,57 (0,70)	35,42 (0,73)	36,00 (0,81)
2.500	8,80	1,73	0,16	79,20	36,03 (0,62)	35,60 (0,58)	35,82 (0,30)
80.000	122,00	1,94	1,28	1098,00	23,58 (0,08)	23,29 (0,03)	23,44 (0,21)
40.000	56,20	1,81	1,13	505,80	25,14 (0,13)	24,21 (0,08)	24,68 (0,66)
20.000	26,20	1,91	0,74	235,80	25,81 (0,13)	25,95 (0,02)	25,88 (0,10)
10.000	30,70	1,50	0,47	276,30	27,99 (0,17)	27,02 (0,06)	27,51 (0,69)
5.000	22,80	1,48	0,43	205,20	31,34 (0,21)	31,58 (0,13)	31,46 (0,17)
2.500	23,50	1,44	0,56	211,50	37,38 (0,13)	37,57 (2,10)	37,48 (0,13)

Tabelle 7: RNA-Isolierung und Expressionsanalyse von HPRT1 in zwei unabhängigen Verdünnungsreihen der Zelllinie MDA-MB-231 im 2D-Zellmodell. Bestimmung der isolierten Gesamt-RNA Menge in [ng/μl] und der RNA-Qualität anhand der Ratio 260/280 und 260/230. Angabe der für die cDNA-Synthese eingesetzten RNA-Menge in [ng], standardisiert auf 9 μl pro Reaktionsansatz. Bestimmung der cDNA-Qualität durch Expressionsanalyse des Referenzgenes HPRT1 mittels TaqMan Methode unter Angabe des Ct-Mittelwertes (MW) mit Standardabweichung (s). Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt.

3.1.2. RNA-Isolierung und cDNA-Qualitätsbestimmung im 2D- und 3D-Zellmodell: Analyse von Zelllinien unterschiedlicher Tumor-entität

Im nachfolgenden Experiment wurden Verdünnungsreihen im 3D-Zellmodell erstellt. Es sollte gezeigt werden, dass mit der ausgewählten Methode nicht nur im 2D-Zellmodell sondern auch aus Sphäroiden im niedrigen Zellzahlbereich qualitativ hochwertige RNA isoliert werden kann. Aus den Zelllinien Hs746T und CaCo-2 wurde durch serielle Verdünnung von Zelllysaten aus 2D- und 3D-kultivierten Zellen vor der RNA-Isolierung eine Verdünnungsreihe erstellt.

In der Zelllinie Hs746T war sowohl unter 2D- als auch unter 3D-Bedingungen in jedem Verdünnungsschritt eine Halbierung des RNA-Gehalts zu sehen, in der Zelllinie CaCo-2 war dies in 2D und 3D bis zu einer Zellzahl von 37.500 darstellbar (Tab. 8). Die Qualität der extrahierten RNA war bezogen auf die Ratio 260/280 bis 37.500 Zellen bei beiden Zelllinien im Zielbereich von ~2,0, wohingegen die Ratio 260/230 mit < 1,8 zu niedrig war.

Zelllinie	Kulturart	Zellzahl	RNA [ng/μl]	260/280	260/230
Hs746 T	2D	75.000	80,50	1,96	1,22
		37.500	39,70	1,91	0,57
		18.750	15,40	1,96	1,31
	3D	75.000	53,80	1,99	1,23
		37.500	25,30	1,93	0,60
		18.750	15,10	1,65	0,59
CaCo-2	2D	75.000	104,50	1,95	1,59
		37.500	49,40	2,00	1,33
		18.750	47,70	1,67	0,80
	3D	75.000	54,90	1,97	1,60
		37.500	28,10	1,93	0,42
		18.750	25,50	1,65	0,54

Tabelle 8: Qualitäts- und Quantitätsbestimmung der extrahierten Gesamt-RNA in Verdünnungsreihen der Zelllinien Hs746T und CaCo-2 im 2D-/3D-Zellmodell. Bestimmung der isolierten Gesamt-RNA Menge in [ng/μl] und der RNA-Qualität anhand der Ratio 260/280 und 260/230.

Zur Beurteilung der cDNA-Qualität wurde das Expressionsmuster von HMBS und HPRT1 bei 75.000 und 37.500 Zellen in zwei unabhängigen qPCR-Läufen bestimmt (Tab. 9). Sowohl unter 2D- als auch unter 3D-Kulturbedingungen wurden HMBS und HPRT1 in beiden Zelllinien in einem Ct-Bereich von 26 bis 33 exprimiert. Die Negativkontrolle und die *no template control* wurden mit Ct >40 detektiert und zeigten somit keine cDNA-Amplifikation. Die Positivkontrolle bewegte sich im gleichen Ct-Bereich wie die Referenzgene (hier nicht gezeigt). Zudem ist in Tabelle 9 zu sehen, dass die Art der Zellkultivierung (2D versus 3D) einen Einfluss auf die Expressionshöhe der Referenzgene haben kann. In Sphäroiden der Zelllinie Hs746T ist HMBS ca. dreifach höher exprimiert als HPRT1 ($MW 2^{\Delta Ct(HMBS-HPRT1)} 3,03$).

Zelllinie	Kulturart	Zellzahl	Ct _{HMBS} (s)	Ct _{HPRT1} (s)	$2^{\Delta Ct(HMBS-HPRT1)}$	MW ($2^{\Delta Ct(HMBS-HPRT1)}$) (s)
Hs746T	2D	75.000	26,39 (0,24)	26,20 (0,22)	1,15	1,49 (0,48)
		37.500	28,70 (0,11)	27,83 (0,04)	1,83	
	3D	75.000	31,78 (0,06)	30,02 (0,11)	3,40	3,03 (0,52)
		37.500	33,79 (0,28)	32,38 (0,21)	2,67	
CaCo2	2D	75.000	26,73 (0,39)	26,14 (0,02)	1,51	1,42 (0,12)
		37.500	27,31 (0,20)	26,90 (0,08)	1,33	
	3D	75.000	28,95 (0,62)	28,21 (0,08)	1,67	1,66 (0,02)
		37.500	30,65 (0,09)	29,93 (0,01)	1,65	

Tabelle 9: cDNA-Qualitätsbestimmung durch Expressionsanalyse von HMBS und HPRT1 (TaqMan Methode) in den Zelllinien Hs746T und CaCo-2 im 2D-/3D-Zellmodell. Verdünnungsreihen in 2D und 3D (75.000 bis 37.500 Zellen). Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach der ΔCt -Methode. Dargestellt ist das Ergebnis des zweiten unabhängigen PCR-Laufes mit Mittelwert (MW) und Standardabweichung (s).

Anhand dieser Verdünnungsreihen konnte dargestellt werden, dass auch im 3D-Zellmodell bei Zellzahlen von 75.000 bis 37.500 solide Ergebnisse in der RNA-Isolierung mit nachgeschalteter Expressionsanalyse von Referenzgenen erzielt werden können. Für alle nachfolgenden Analysen wurden somit Sphäroide à 50.000 Zellen verwendet. Im 3D-Zellmodell wurden jeweils 3 Sphäroide à 50.000 Zellen analysiert, im 2D-Zellmodell jeweils 150.000 Suspensionszellen. Unter Einbeziehung von natürlichen interindividuellen Schwankungen wurde für nachfolgende Experi-

mente nicht eine Zellzahl von 50.000, sondern ein etwas höherer Zellzahlbereich von 150.000 Zellen gewählt. Anschließend wurde in elf Zelllinien aus jeweils 150.000 Zellen, sowohl im 2D- als auch im 3D-Zellmodell, RNA isoliert, daraus cDNA synthetisiert und im Anschluss die Expressionsanalyse der Referenzgene HMBS und HPRT1 durchgeführt (Tab. 10, Abb. 12).

Tumorentität	Zelllinie	Kulturart	Gesamt-RNA [ng/µl]	260/280	260/230
MaCa	T47D	2D	72,85	1,98	1,07
		3D	68,70	2,02	1,32
	SKBR3	2D	73,15	1,93	1,23
		3D	116,60	1,98	1,79
	HCC1143	2D	84,70	1,97	1,40
		3D	56,87	1,93	1,52
	HCC70	2D	102,75	2,01	0,76
		3D	103,60	1,94	1,08
OvCa	OVCAR-3	2D	137,05	1,99	1,37
		3D	81,45	1,98	1,27
	SKOV-3	2D	68,95	1,80	0,98
		3D	29,90	1,77	0,80
MagenCa	Hs746T	2D	199,50	1,99	1,93
		3D	139,10	1,96	1,67
	N87	2D	98,40	1,93	1,33
		3D	96,60	2,09	1,67
ColonCa	CaCo-2	2D	54,70	1,96	1,31
		3D	32,50	1,90	1,26
	HT29	2D	76,50	1,94	1,28
		3D	90,15	1,95	1,13
	HCT116	2D	71,65	1,90	1,33
		3D	78,60	1,97	0,74

Tabelle 10: Qualitäts- und Quantitätsbestimmung der extrahierten Gesamt-RNA in Zelllinien unterschiedlicher Tumorentität. Analyse von elf Zelllinien vier verschiedener Tumorentitäten: Mammakarzinom (MaCa), Ovarialkarzinom (OvCa), Magenkarzinom (MagenCa) und Kolonkarzinom (ColonCa). Analyse von jeweils 150.000 Suspensionszellen (2D) bzw. 3 Sphäroiden à 50.000 Zellen (3D). Bestimmung der isolierten Gesamt-RNA Menge (30 µl RNA-Eluat) in [ng/µl] und der RNA-Qualität mittels Ratio 260/280 und 260/230.

Unter 2D- und 3D-Kulturbedingungen konnte aus allen Zelllinien in ausreichenden Absolutmengen RNA isoliert werden (Tab. 10). Die Ratio 260/280 lag im Zielbereich von 2,0, was eine gute RNA-Qualität implizierte. Die Werte der Ratio 260/230 waren bei fast allen untersuchten Zelllinien <1,8, was eine vermeintliche Verunreinigung mit organischen Verbindungen (z.B. GITC) anzeigte.

Die Expressionsmuster von HMBS und HPRT1 wurde in allen Zelllinien in zwei unabhängigen PCR-Läufen analysiert, wobei die Negativkontrolle und die *no template control* in allen Läufen mit Ct >40 detektiert wurden. Die Positivkontrollen befanden sich im gleichen Ct-Bereich wie die Referenzgene. Die Expressionsmuster von HMBS und HPRT1 sind beispielhaft in vier ausgewählten Zelllinien gezeigt (Abb. 12). In allen Zelllinien stellte sich in beiden unabhängigen Probenpaaren ein vergleichbares Expressionsmuster dar. In Sphäroiden der Zelllinie HCT116 wird HMBS im Verhältnis zu HPRT1 um mindestens das 16-fache höher exprimiert (Abb. 12D).

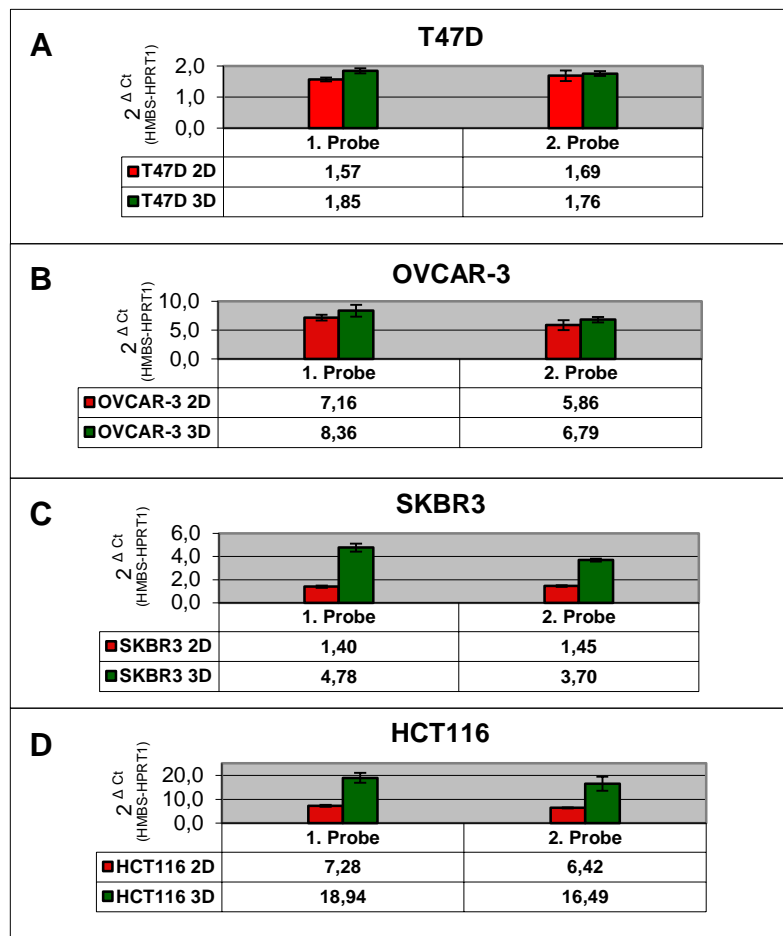


Abbildung 12: Expressionsanalyse von HMBS und HPRT1 in den Zelllinien T47D, OVCAR-3, SKBR3 und HCT116 im 2D- und 3D-Zellmodell. Analyse von zwei unabhängigen Probenpaaren der Zelllinien T47D (A), OVCAR-3 (B), SKBR3 (C) und HCT116 (D) im 2D-/3D-Vergleich, ausgewertet nach der Δ Ct-Methode (mit Fehlerfortführung). Darstellung der relativen Expression von HMBS bezogen auf HPRT1 im ersten PCR-Lauf.

3.1.3. RNA-Isolierung aus Tumorgewebe unterschiedlicher Entität

Das Ergebnis der RNA-Isolierung aus Patientengewebe (Ovarialkarzinom, kolorektales Karzinom) ist in nachfolgender Tabelle gezeigt (Tab. 11).

Patienten-ID	Tumor-Entität	Kulturart	Gesamt-Zellzahl	RLT-Lysepuffer	RNA [ng/µl]	260/280	260/230
1	CRC	3D	150.000	700 µl	5,80	1,60	0,33
2	OvCa	3D	150.000	700 µl	13,40	1,75	0,41
3	CRC	3D	150.000	700 µl	5,00	1,59	0,13
4	OvCa	3D	150.000	700 µl	7,20	1,62	0,04
5	OvCa	3D	150.000	700 µl	2,60	1,71	0,09
6	CRC	3D	150.000	700 µl	8,40	1,91	0,29
7	OvCa	3D	150.000	700 µl	3,20	1,52	0,13
8	OvCa	3D	150.000	700 µl	2,70	1,66	0,37
9	CRC	3D	150.000	700 µl	5,20	1,65	0,31
10	OvCa	3D	150.000	700 µl	4,30	1,42	0,28
11	CRC	3D	150.000	700 µl	3,70	1,28	0,19
12	OvCa	3D	200.000	700 µl	12,90	1,52	0,21
13	OvCa	3D	300.000	700 µl	4,30	1,81	0,04
14	CRC	3D	300.000	700 µl	15,10	1,56	0,42
15	CRC	3D	300.000	700 µl	11,60	1,59	0,50
16	OvCa	3D	300.000	700 µl	4,70	1,68	0,17
17	OvCa	3D	300.000	700 µl	11,00	1,73	0,43
18	OvCa	3D	300.000	700 µl	15,30	1,56	0,31
19	CRC	3D	300.000	700 µl	7,00	1,96	0,97
20	CRC	3D	350.000	700 µl	2,90	1,34	0,17
21	OvCa	3D	400.000	700 µl	10,80	1,80	0,57
22	OvCa	2D	500.000	700 µl	18,90	1,77	0,46
		3D	500.000	700 µl	5,20	1,70	0,54
23	OvCa	2D	150.000	150 µl	23,70	1,56	0,66
		3D	150.000	150 µl	8,70	1,73	0,53
24	OvCa	2D	150.000	150 µl	64,00	1,42	0,64
		3D	150.000	150 µl	18,30	1,46	0,47

Tabelle 11: Qualitäts- und Quantitätsbestimmung der extrahierten Gesamt-RNA in Tumorgewebe unterschiedlicher Entität. Bestimmung der isolierten Gesamt-RNA Menge [ng/µl] und der RNA-Qualität (Ratio 260/280, Ratio 260/230). Analyse von Gewebesphäroiden und 2D-Suspensionszellen unterschiedlicher Gesamtzellzahl. Ovarialkarzinom (OvCa), kolorektales Karzinom (CRC).

Unter Variation von Gesamtzellzahl und Menge des zugesetzten RLT-Lysepuffers wurde in allen Sphäroiden eine geringe RNA-Ausbeute erzielt (<18 ng/µl), kombiniert mit einer schlechten RNA-Qualität (Ratio 260/280 <2,0; Ratio 260/230 <1,8). Bei ausgewählten Gewebeproben (Patienten-ID 22, 23, 24) wurden neben Sphäroiden auch 2D-Suspensionszellen analysiert. Bei 2D-Suspensionszellen lag die Menge der

extrahierten RNA in [ng/μl] um mindestens das Dreifache höher als in den entsprechenden Sphäroiden. Insgesamt konnte somit für das verwendete Patientengewebe keine optimale Ausgangszellzahl etabliert werden, die eine qualitativ hochwertige RNA-Isolierung ermöglichte. Aufgrund der geringen Ausbeute in der RNA-Extraktion und der schlechten RNA-Qualität wurde diese RNA nicht in cDNA umgeschrieben und es wurde in der vorliegenden Dissertation darauf verzichtet, eine Expressionsanalyse von Zielgenen in Sphäroiden aus Patientengewebe durchzuführen. Der Fokus der Arbeit wurde auf die Expressionsanalyse der ausgewählten Zielgene in Zelllinien abgeleiteten 2D- und 3D-Kulturen gelegt.

3.2. Genexpressionsanalyse von Komponenten des Urokinase-Systems

3.2.1. Expressionsmuster ausgewählter Zielgene in der Zelllinie MDA-MB-231 im 2D-Zellmodell

In den RNA-Präparationen der Verdünnungsreihen der Zelllinie MDA-MB-231 (80.000 bis 2.500 Zellen) wurde die Genexpression exemplarisch von PAI-1 und Rab31 bestimmt (Abb. 13). Jeder Verdünnungsschritt kann unabhängig von der Zellzahl als eigenständige Präparation betrachtet werden, da die Zielgenexpression gegen die Expression des Referenzgenes TBP normalisiert wurde. Folglich sollten in jeder Verdünnungsstufe gleiche Ratios nachweisbar sein.

Bei PAI-1 zeigte sich bei 80.000 und 40.000 Zellen eine annähernd gleiche Expression (Abb. 13A). In den Verdünnungsstufen von 20.000 und 10.000 Zellen nahm die Ratio unter Zunahme der Standardabweichung ab. Bei Rab31 hingegen konnte in allen vier Verdünnungsstufen (80.000 bis 10.000 Zellen) eine ähnliche Ratio erzielt werden, allerdings auf einem niedrigeren Expressionsniveau als bei PAI-1 (Abb. 13B). In den Verdünnungsstufen von 20.000 und 10.000 Zellen kam es aber auch bei Rab31 zu einer Zunahme der Standardabweichung. Die Analyse der Präparation aus 5.000 und 2.500 Zellen ist in Abbildung 13 nicht dargestellt, da das verwendete Referenzgen TBP in beiden Fällen unter der Nachweisgrenze lag. Anhand der Expressionsmuster für PAI-1 und Rab31 konnte gezeigt werden, dass in einem Bereich von 80.000 bis 40.000 Zellen im 2D-Zellmodell effektive Genexpressionsmuster generiert werden können.

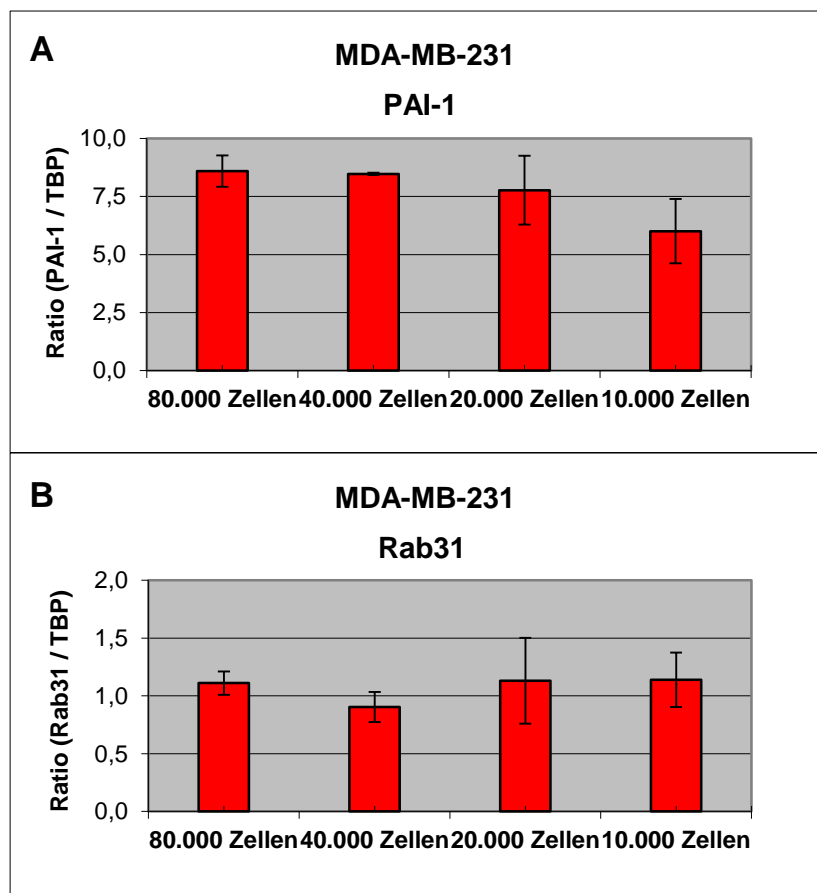


Abbildung 13: Expressionsmuster von PAI-1 und Rab31 in der Zelllinie MDA-MB-231 im 2D-Zellmodell. Relative Expression der Zielgene PAI-1 (A) und Rab31 (B) in der Zelllinie MDA-MB-231, normalisiert gegen das Referenzgen TBP. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Verdünnungsreihen (80.000 - 10.000 Zellen) mit Standardabweichung.

3.2.2. Expressionsmuster ausgewählter Zielgene in Zelllinien unterschiedlicher Tumorentität im 2D- und 3D-Zellmodell

3.2.2.1. Expressionsmuster in ausgewählten Verdünnungsreihen

In den aus 2D- und 3D-Zellkultur hergestellten Verdünnungsreihen der Zelllinien CaCo-2 und Hs746T wurde die Genexpression von PAI-1, uPA und Rab31 bestimmt. Eine signifikante Expressionserhöhung in 2D wurde bei einer Ratio 2D/3D von $\geq 2,0$ definiert, eine signifikante Expressionserhöhung in 3D bei einer Ratio 2D/3D $\leq 0,5$.

In der Zelllinie CaCo-2 (Abb. 14) wurde PAI-1 mit einer Ratio 2D/3D von 0,49 in 75.000 Zellen und 0,47 in 37.500 Zellen in 3D signifikant höher exprimiert als in 2D. Bei 18.750 Zellen konnte bei PAI-1 im Gegensatz zu den anderen Verdünnungsstufen kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen 2D und 3D nachgewiesen werden (Ratio 2D/3D: 1,04). uPA war bei 18.750 Zellen in 2D signifikant höher exprimiert als in 3D (Ratio 2D/3D: 2,10). In den Verdünnungsstufen mit 75.000 und 37.500 Zellen zeigte sich bei uPA kein eindeutiger Expressionsunterschied zwischen 2D und 3D. Rab31 wurde in allen drei Verdünnungsstufen bei fast deckungsgleichen Ratios 2D/3D im 3D-Zellmodell signifikant überexprimiert.

In der Zelllinie Hs746T (Abb. 15) war bei PAI-1 in den Verdünnungsstufen mit 75.000 und 37.500 Zellen kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen 2D und 3D zu erkennen, wohingegen bei 18.750 Zellen PAI-1 in 3D signifikant überexprimiert war (Ratio 2D/3D: 0,39). Die Expression von uPA war in allen drei Verdünnungsstufen zwischen 2D und 3D nicht signifikant unterschiedlich. Bei Rab31 stellte sich wie in der Zelllinie CaCo-2 in allen drei Verdünnungsstufen eine signifikante Überexpression in 3D dar.

Zusammenfassend konnte anhand der generierten Expressionsmuster von PAI-1, uPA und Rab31 gezeigt werden, dass, analog zu den Expressionsanalysen der Referenzgene HMBS und HPRT1, mittels LightCycler Technologie in einem Bereich von 75.000 bis 37.500 Zellen sowohl in 2D- als auch in 3D-Zellkultur zuverlässige Genexpressionsanalysen von verschiedenen Zielgenen durchgeführt werden können. RNA-Präparationen aus 18.750 Zellen hingegen liefern variable und nicht valide Expressionsergebnisse.

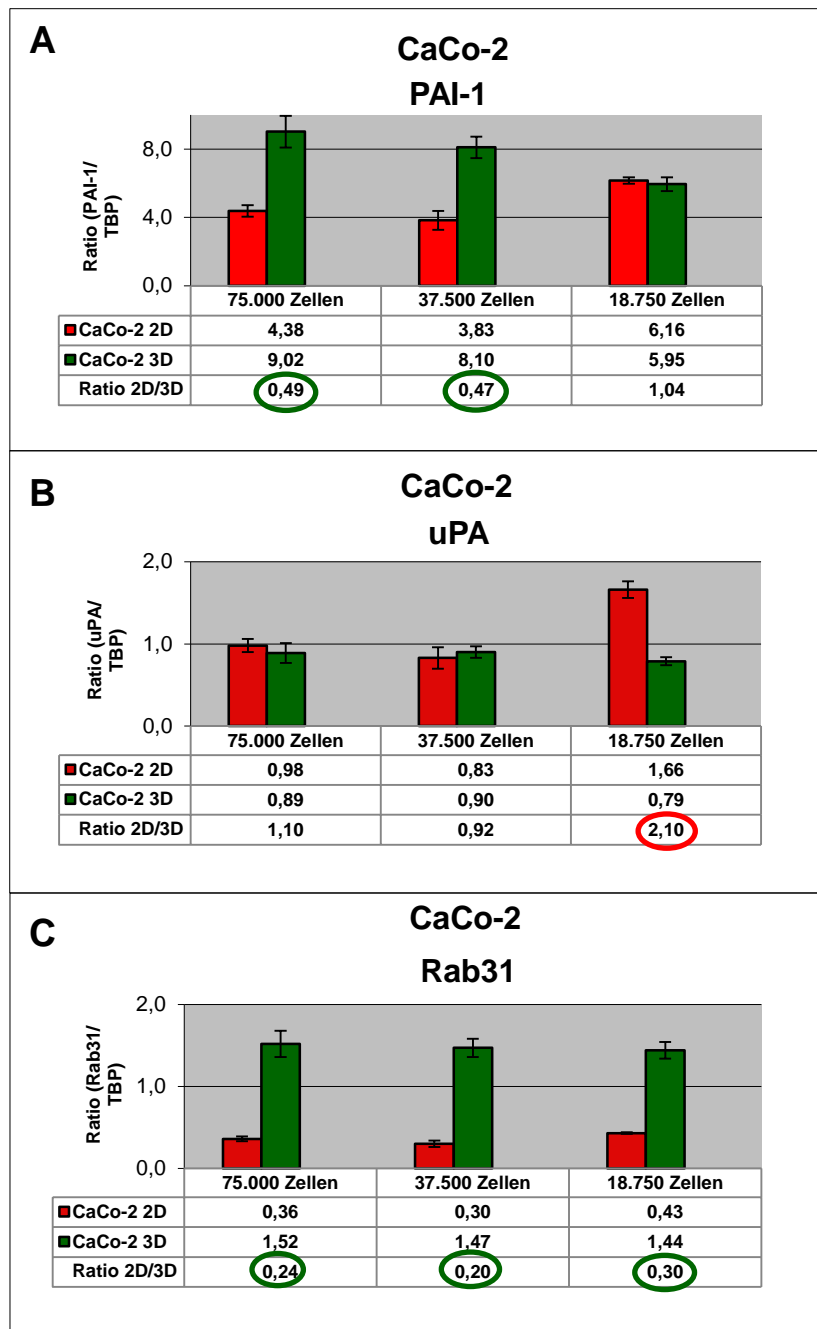


Abbildung 14: Expressionsmuster von PAI-1, uPA und Rab31 in einer Verdünnungsreihe der Zelllinie CaCo-2 im 2D- und 3D-Zellmodell. Darstellung der relativen Expression (Ratio Zielgen/TBP) von PAI-1 (A), uPA (B) und Rab31 (C) mit Fehlerfortführung in 2D und 3D. Farbliche Markierung der Ratio 2D/3D $\geq 2,0$ (roter Kreis) und $\leq 0,5$ (grüner Kreis) als Zeichen einer signifikanten Expressionsänderung zwischen 2D und 3D.

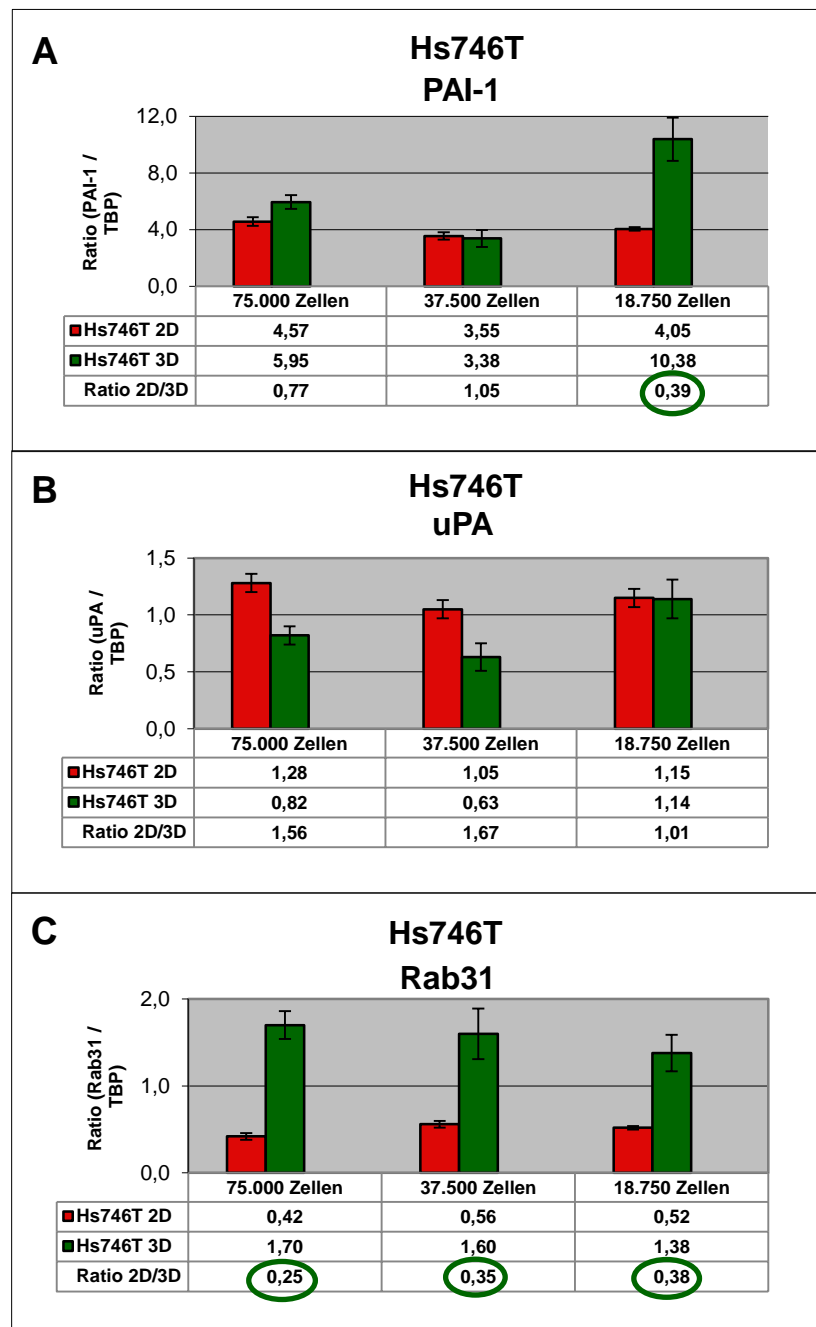


Abbildung 15: Expressionsmuster von PAI-1, uPA und Rab31 in einer Verdünnungsreihe der Zelllinie Hs746T im 2D- und 3D-Zellmodell. Darstellung der relativen Expression (Ratio Zielgen/TBP) von PAI-1 (A), uPA (B) und Rab31 (C) mit Fehlerfortführung in 2D und 3D. Farbliche Markierung der Ratio 2D/3D $\geq 2,0$ (roter Kreis) und $\leq 0,5$ (grüner Kreis) als Zeichen einer signifikanten Expressionsänderung zwischen 2D und 3D.

3.2.2.2. Expressionsmuster einzelner Zelllinien

In elf Zelllinien vier verschiedener Tumorentitäten (Mamma-, Ovarial-, Magen- und kolorektalem Karzinom) wurden auf mRNA-Ebene aus 2D-Monolayerzellen und Sphäroiden sechs Biomarker (PAI-1, uPA, uPAR, uPAR-del4/5, Rab31, KLK7) quantifiziert. Jede Zelllinie, ausgenommen N87 und HCC1143, wurde in zwei unabhängigen Probenpaaren analysiert. Von den Zelllinien CaCo-2 und Hs746T wurde das erste Probenpaar zur Generierung von Verdünnungsreihen verwendet, sodass in der Auswertung nur das zweite unabhängige Probenpaar berücksichtigt wurde. Die analysierten Zelllinien sind nach Tumorentität aufgeschlüsselt. Die Intention in dieser Darstellung lag darin, im Genexpressionsmuster der ausgewählten Zelllinien möglicherweise tumorspezifische Tendenzen erkennen zu können. Gezeigt ist das individuelle Expressionsmuster der analysierten Zielgene in vier Mammakarzinomzelllinien (T74D, SKBR3, HCC1143, HCC70), in zwei Ovarialkarzinomzelllinien (OVCAR-3, SKOV-3), in zwei Magenkarzinomzelllinien (Hs746T, N87), sowie in drei Kolonkarzinomzelllinien (CaCo-2, HT29, HCT116) (Abb. 16, 17, 18, 19).

Im Mammakarzinom (Abb. 16) war in der Zelllinie T47D bei keinem Biomarker ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen 2D- und 3D-Zellmodell darzustellen, wobei uPA, uPAR-del4/5, Rab31 und KLK7 nicht exprimiert wurden. In der Zelllinie SKBR3 ist PAI-1 in 2D signifikant höher exprimiert als in 3D. uPAR und Rab31 zeigten keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen 2D und 3D. uPA, uPAR-del4/5 und KLK7 wurden nicht exprimiert. In der Zelllinie HCC1143 ist uPAR in 3D signifikant höher exprimiert, wobei uPAR-del4/5 und KLK7 ebenso nicht exprimiert wurden. Die Faktoren PAI-1, uPA und Rab31 wurden im 2D- und 3D-Zellmodell annähernd gleich exprimiert. In der Zelllinie HCC70 ist keiner der analysierten Biomarker signifikant überexprimiert, wobei PAI-1 und uPAR-del4/5 nicht exprimiert wurden.

In den beiden Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR-3 und SKOV-3 (Abb. 17) wurde uPAR in 3D signifikant höher exprimiert als in 2D. In der Zelllinie OVCAR-3 ist zudem KLK7 in 3D signifikant überexprimiert, in der Zelllinie SKOV-3 Rab31. In der Zelllinie SKOV-3 ist uPA in 2D signifikant überexprimiert. PAI-1 und uPAR-del4/5 werden in keiner der analysierten Ovarialkarzinomzelllinien exprimiert, zusätzlich zeigte KLK-7 in der Zelllinie SKOV-3 keine Expression.

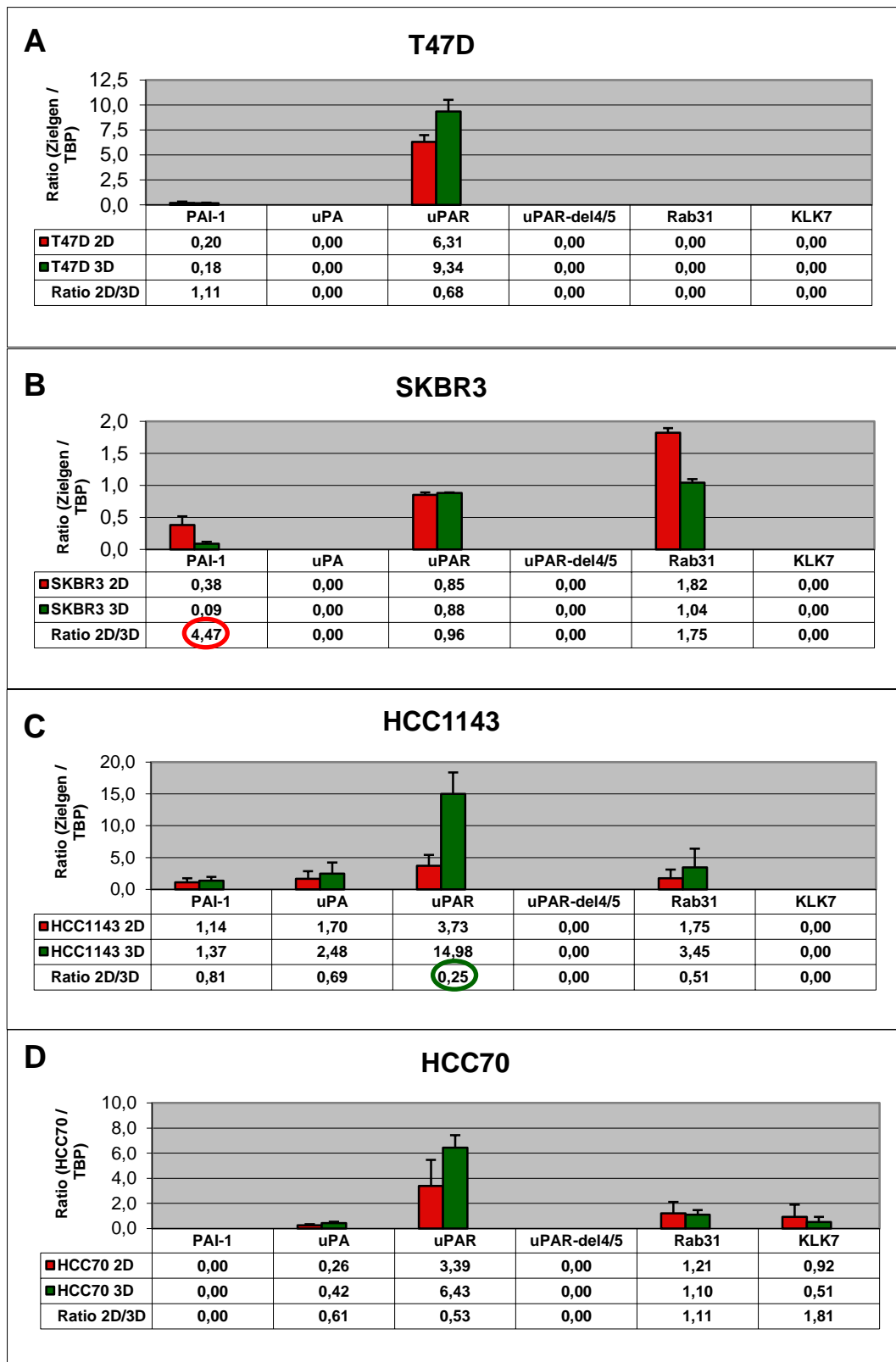


Abbildung 16: Expressionsmuster von PAI-1, uPA, uPAR, uPAR-del4/5, Rab31 und KLK7 in vier Mammakarzinomzelllinien im 2D- und 3D-Zellmodell. Relative Expression (Ratio Zielgen/TBP) mit Standardabweichung und Ratio 2D/3D in den Zelllinien T47D (A), SKBR3 (B), HCC1143 (C) und HCC70 (D). Farbliche Markierung der Ratio 2D/3D $\geq 2,0$ (roter Kreis) und $\leq 0,5$ (grüner Kreis) als Zeichen einer signifikanten Expressionsänderung zwischen 2D und 3D.

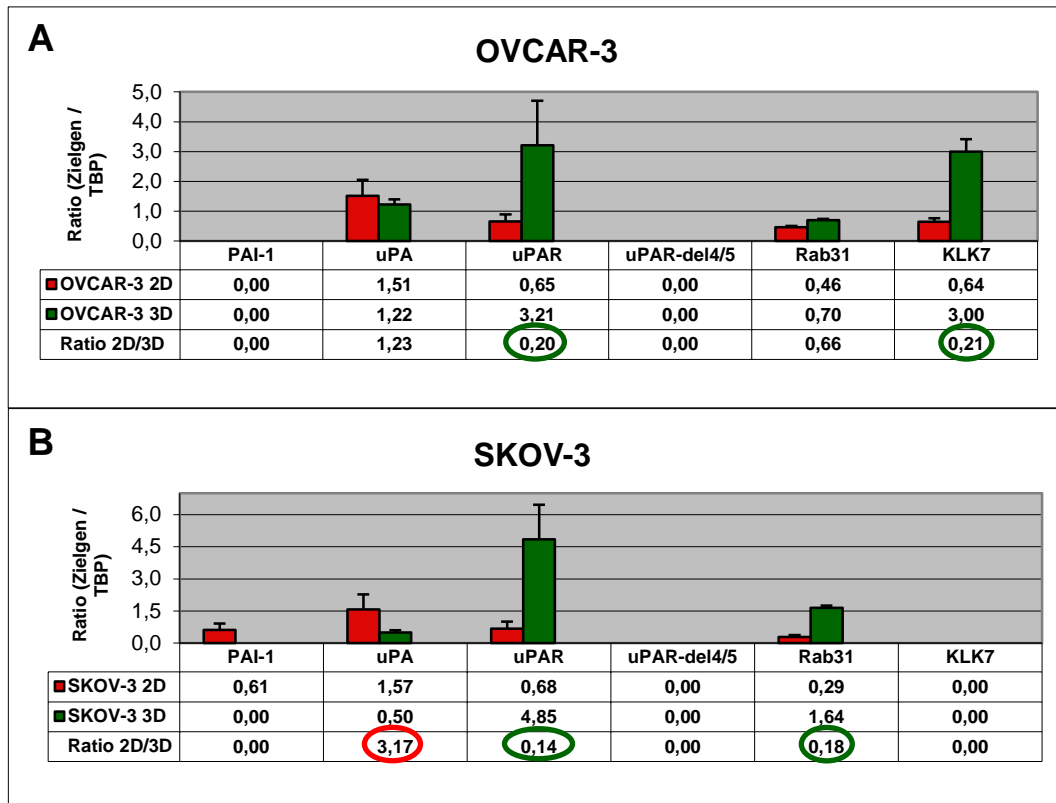


Abbildung 17: Expressionsmuster von PAI-1, uPA, uPAR, uPAR-del4/5, Rab31 und KLK7 in zwei Ovarialkarzinomzelllinien im 2D- und 3D-Zellmodell. Relative Expression (Ratio Zielgen/TBP) mit Standardabweichung und Ratio 2D/3D in den Zelllinien OVCAR-3 (A) und SKOV-3 (B). Farbliche Markierung der Ratio 2D/3D $\geq 2,0$ (roter Kreis) und $\leq 0,5$ (grüner Kreis) als Zeichen einer signifikanten Expressionsänderung zwischen 2D und 3D.

In der Magenkarzinomzelllinie Hs746T ist ausschließlich Rab31 in 3D signifikant höher exprimiert als in 2D, alle anderen Biomarker zeigten keine signifikanten Expressionsunterschiede oder wurden nicht exprimiert (uPAR-del4/5, KLK7) (Abb. 18A). In den mit Hs746T-Zellen durchgeführten Verdünnungsreihen wurde PAI-1 bei 18.750 Zellen in 3D signifikant überexprimiert (Abb. 15A). Dieses Ergebnis konnte in der zweiten unabhängigen Probe nicht wiederholt werden. In der zweiten unabhängigen Probe der Zelllinie Hs746T stellte sich bei PAI-1 mit einer Ratio 2D/3D von 0,72 kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen 2D und 3D dar (Abb. 18A). Allerdings konnte die in allen Verdünnungsstufen gezeigte signifikante 3D-Überexpression von Rab31 (Abb. 15C) in der zweiten unabhängigen Probe von Hs746T bestätigt werden (Abb. 18A). In der Zelllinie N87 sind PAI-1, uPAR und KLK7 in 3D signifikant überexprimiert (Abb. 18B).

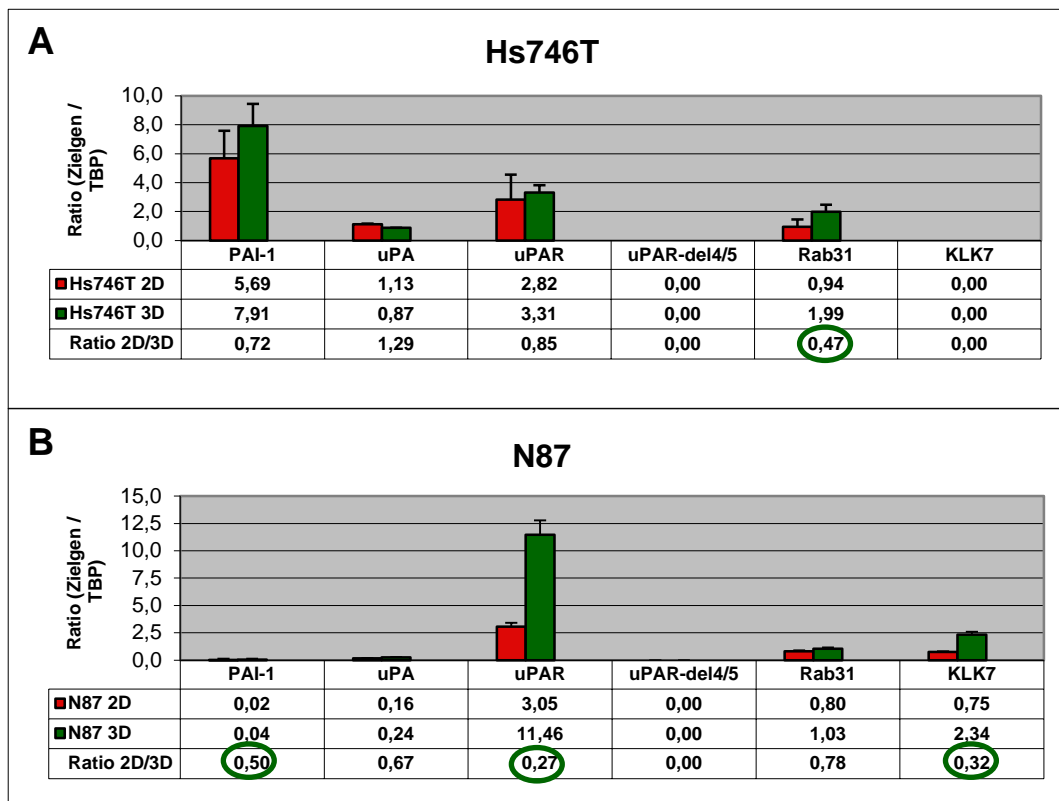


Abbildung 18: Expressionsmuster von PAI-1, uPA, uPAR, uPAR-del4/5, Rab31 und KLK7 in zwei Magenkarzinomzelllinien im 2D- und 3D-Zellmodell. Relative Expression (Ratio Zielgen/TBP) mit Standardabweichung und Ratio 2D/3D in den Zelllinien Hs746T (A) und N87 (B). Farbliche Markierung der Ratio 2D/3D $\geq 2,0$ (roter Kreis) und $\leq 0,5$ (grüner Kreis) als Zeichen einer signifikanten Expressionsänderung zwischen 2D und 3D.

In den Kolonkarzinomzelllinien (Abb. 19) CaCo-2 und HT29 ist PAI-1 in 3D signifikant höher exprimiert als in 2D. uPAR zeigte in den Zelllinien CaCo-2 und HCT116 eine Überexpression in 3D. Rab31 war in den Zelllinien CaCo-2 und HCT116 im 3D-Zellmodell signifikant überexprimiert. Die in der Zelllinie CaCo-2 dargestellte signifikante Überexpression von PAI-1 und Rab31 im 3D-Zellmodell (Abb. 19A) konnte auch in der mit CaCo-2 Zellen durchgeführten Verdünnungsreihe gezeigt werden (Abb. 14).

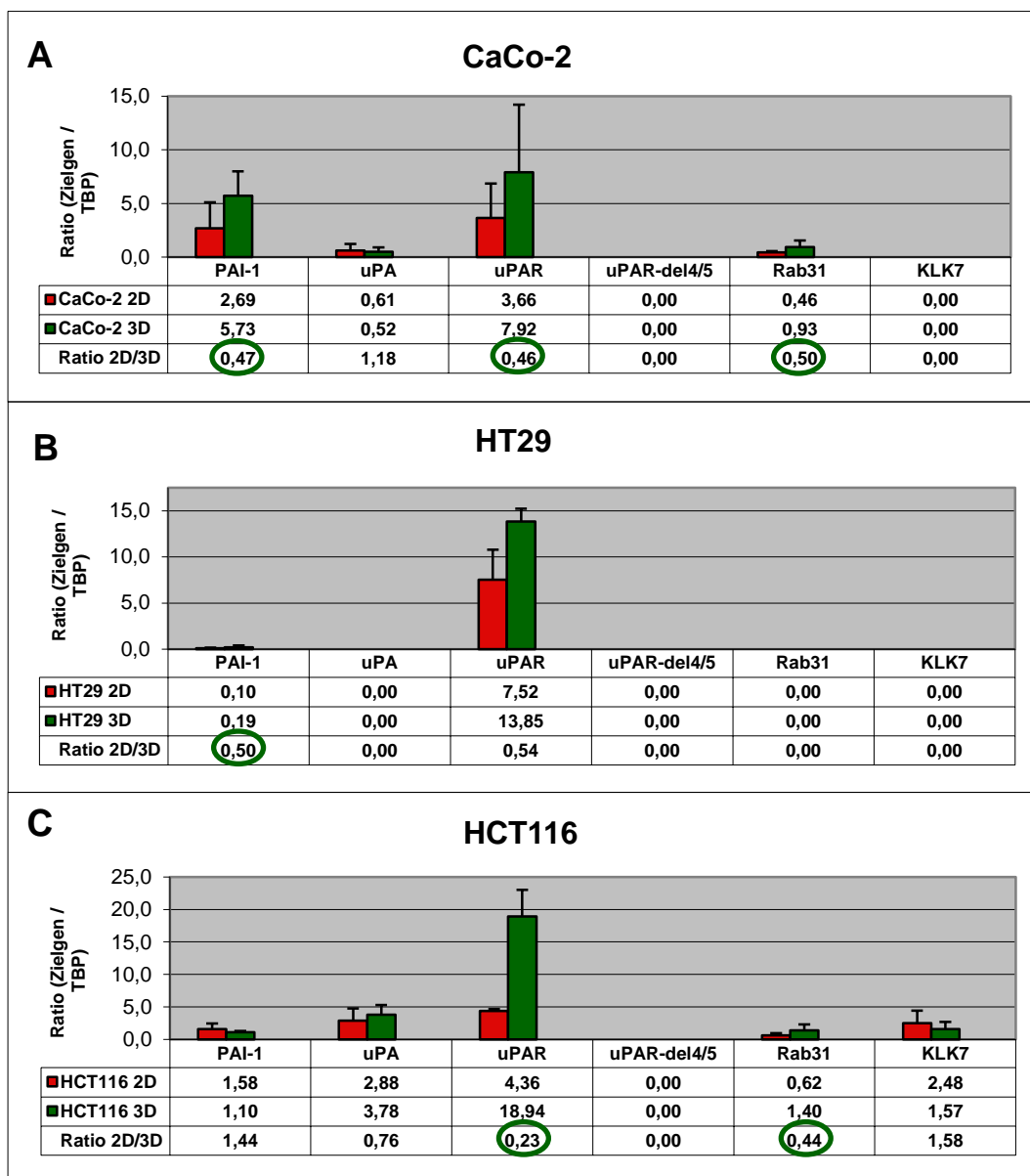


Abbildung 19: Expressionsmuster von PAI-1, uPA, uPAR, uPAR-del4/5, Rab31 und KLK7 in drei Kolonkarzinomzelllinien im 2D- und 3D-Zellmodell. Relative Expression (Ratio Zielgen/TBP) mit Standardabweichung und Ratio 2D/3D in den Zelllinien CaCo-2 (A), HT29 (B) und HCT116 (C). Farbliche Markierung der Ratio 2D/3D $\geq 2,0$ (roter Kreis) und $\leq 0,5$ (grüner Kreis) als Zeichen einer signifikanten Expressionsänderung zwischen 2D und 3D.

3.2.2.3. Expressionsmuster der einzelnen Zielgene

Zusammenfassend (Abb. 20) war in 15 Fällen eine signifikante Überexpression im 3D-Zellmodell darzustellen, wobei uPAR der am häufigsten (in 6 von 11 Zelllinien) überexprimierte Faktor war. Lediglich in zwei Fällen (PAI-1 in SKBR3, uPA in SKOV-3) kam es zu einer signifikanten Expressionserhöhung im 2D-Zellmodell. PAI-1 war in drei Zelllinien signifikant überexprimiert (N87, CaCo-2, HT29). Das Zielgen Rab31 stellte sich in vier von elf Zelllinien im 3D-Zellmodell signifikant überexprimiert dar (SKOV-3, Hs746T, CaCo-2, HCT116). KLK7 war insgesamt in nur vier Zelllinien exprimiert, davon in den beiden Zelllinien OVCA-3 und N87 in 3D signifikant überexprimiert. Bei uPA waren die geringsten Expressionsunterschiede zwischen 2D und 3D zu erkennen. Eine Expression von uPAR-del4/5 konnte in keiner Zelllinie nachgewiesen werden.

3.2.2.4. Darstellung der Reproduzierbarkeit

Die Expressionsanalyse von PAI-1, uPA, uPAR, uPAR-del4/5, Rab31 und KLK7 wurde in zwei unabhängigen Probenpaaren durchgeführt, ausgenommen N87 (einfache Ausführung) und HCC1143 (dreifache Ausführung). Aus den jeweiligen Ergebnissen wurde eine mittlere relative Expressionshöhe berechnet. In diesem Kapitel ist anhand zwei ausgewählter Zelllinien (SKBR3, HCC1143) gezeigt, dass in den einzelnen Probenpaaren, analysiert in unabhängigen LightCycler Läufen, ein reproduzierbares Expressionsmuster generiert werden konnte.

In der Mammakarzinomzelllinie SKBR3 (Abb. 21) wurde im Vergleich zur ersten Probe in der zweiten Probe eine nahezu identische quantitative Expressionshöhe erreicht, zusammen mit einer niedrigen Standardabweichung. Der Vergleich der Ratio 2D/3D der ersten und zweiten Probe mit dem Mittelwert aus erster und zweiter Probe ergab ebenso nahezu identische Werte, was eine sehr gute Reproduzierbarkeit der beiden Proben bestätigte. In der Mammakarzinomzelllinie HCC1143 (Abb. 22) konnte sogar in drei unabhängigen Probenpaaren ein nahezu identisches Expressionsmuster dargestellt werden. Der Vergleich der Ratio 2D/3D der einzelnen Proben mit dem Mittelwert aus allen drei Proben ergab auch hier eine nahezu identische Expressionshöhe, was eine sehr gute Reproduzierbarkeit der einzelnen Proben widerspiegelte.

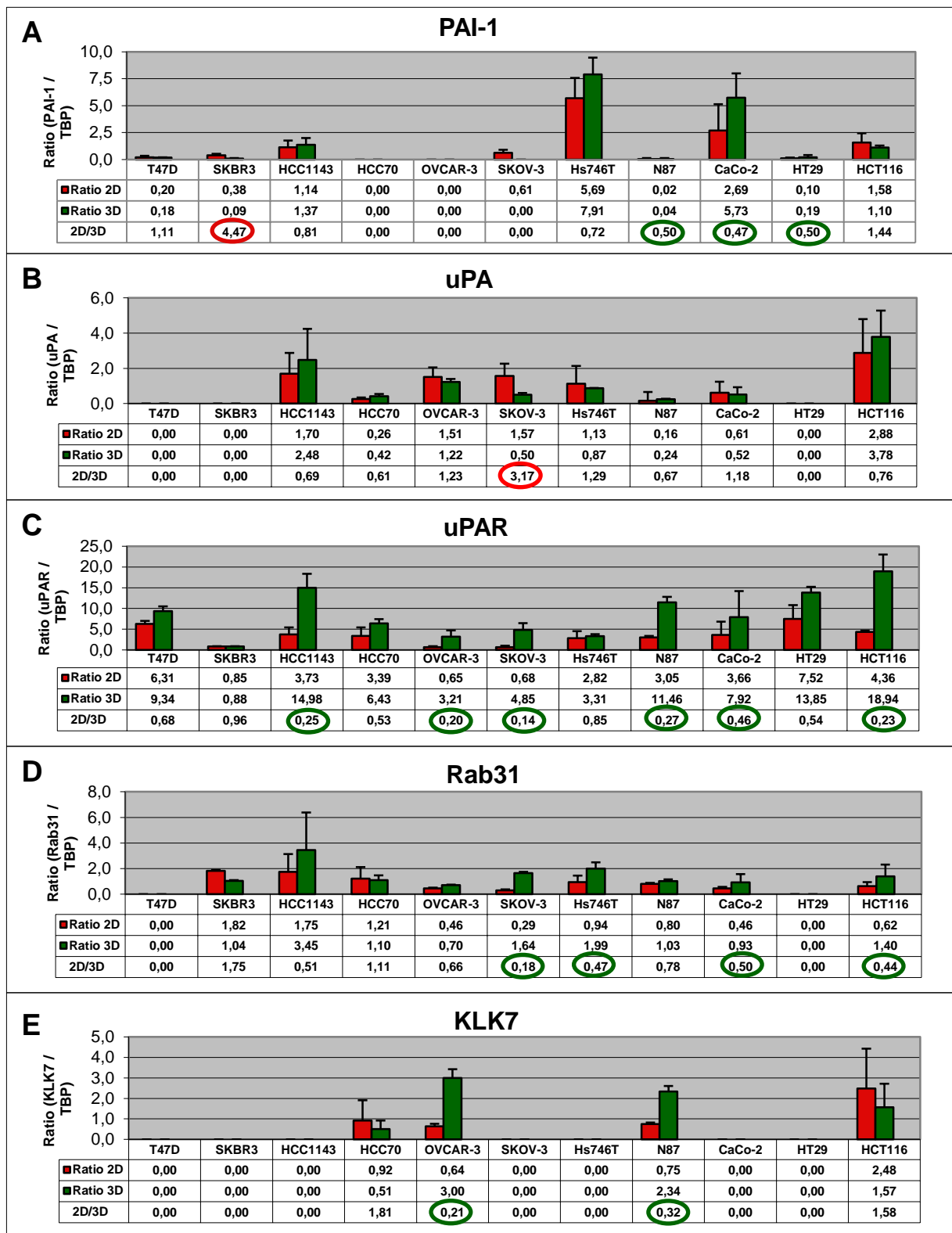


Abbildung 20: Expressionsmuster von PAI-1, uPA, uPAR, Rab31 und KLK7 in elf Zelllinien unterschiedlicher Tumorentität im 2D- und 3D-Zellmodell. Relative Expression von PAI-1 (A), uPA (B), uPAR (C), Rab31 (D) und KLK7 (E) mit Standardabweichung (Hs746T, N87, CaCo-2 mit Fehlerfortführung). Farbliche Markierung der Ratio 2D/3D $\geq 2,0$ (roter Kreis) und $\leq 0,5$ (grüner Kreis) als Zeichen einer signifikanten Expressionsänderung zwischen 2D und 3D. Mammakarzinom: T47D, SKBR3, HCC1143, HCC70; Ovarialkarzinom: OVCAR-3, SKOV-3; Magenkarzinom: Hs746T, N87; Kolonkarzinom: CaCo-2, HT29, HCT116.

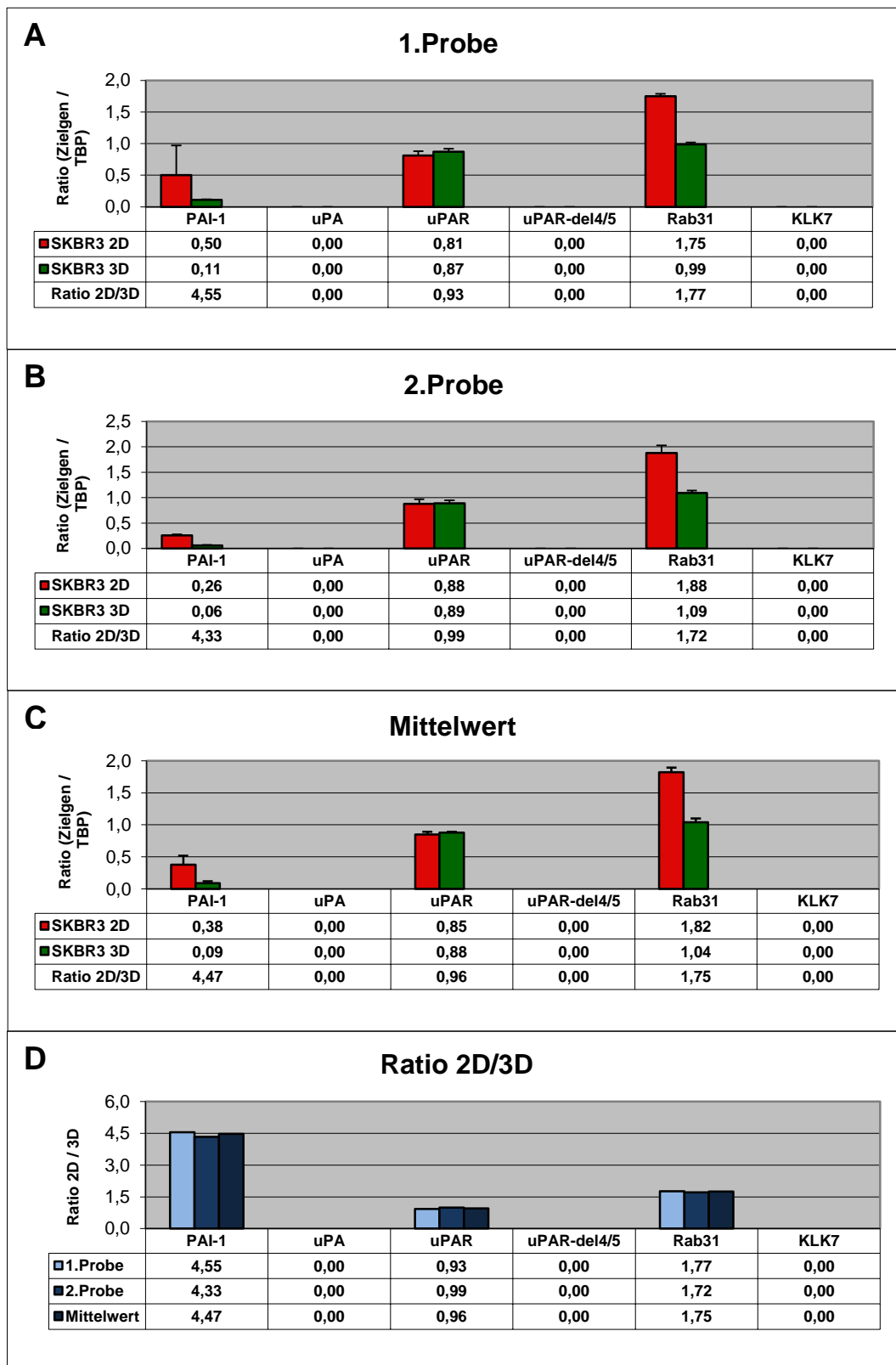


Abbildung 21: Darstellung der Reproduzierbarkeit des Expressionsmusters in zwei unabhängigen Proben der Mammakarzinomzelllinie SKBR3. Relatives Expressionsmuster der ersten (A) und zweiten (B) unabhängigen Probe mit Fehlerfortführung und Mittelwert aus erster und zweiter Probe (C). Ratio 2D/3D der ersten Probe, der zweiten Probe und des Mittelwertes aus beiden unabhängigen Probenpaaren (D).

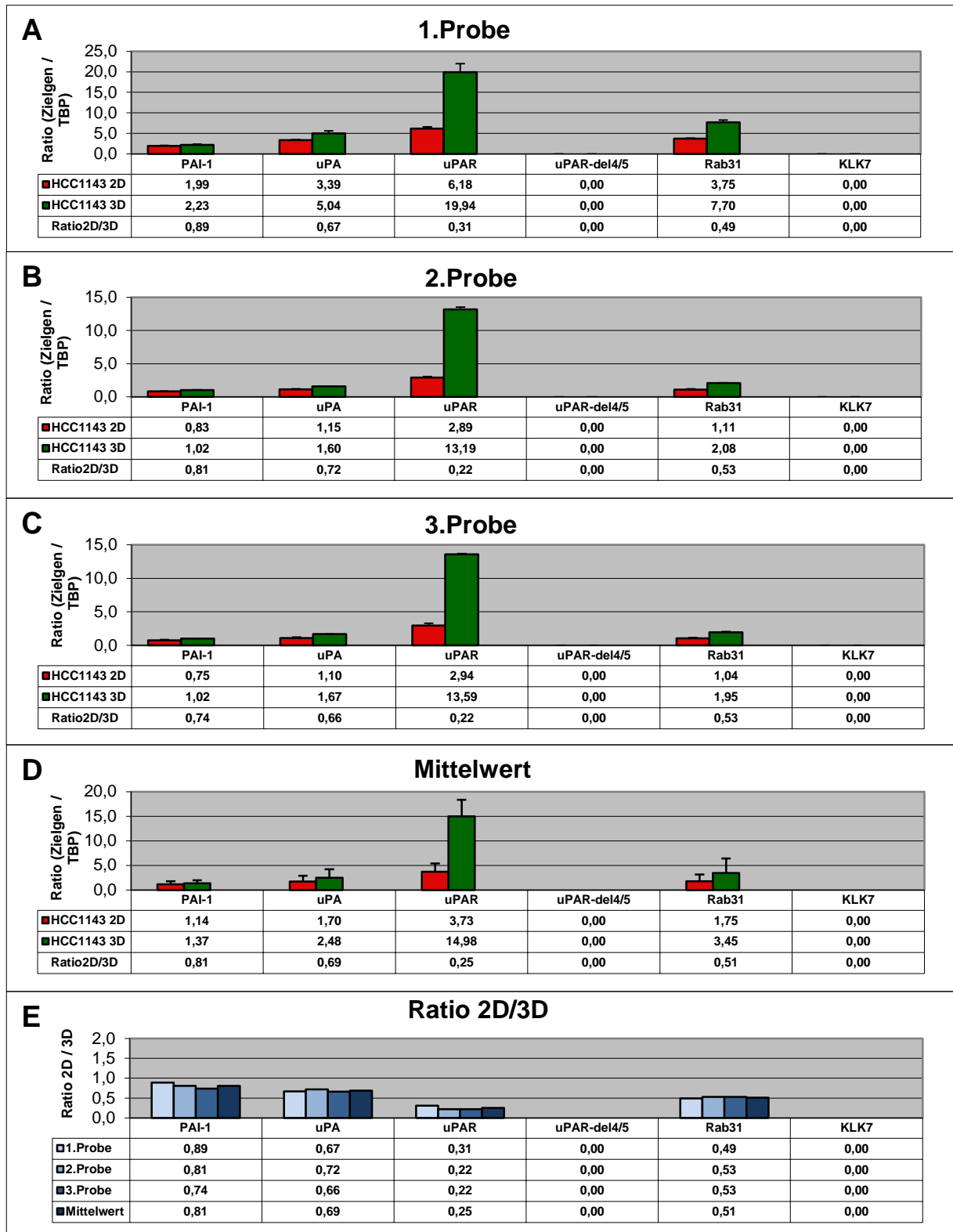


Abbildung 22: Darstellung der Reproduzierbarkeit des Expressionsmusters in drei unabhängigen Proben der Mammakarzinomzelllinie HCC1143. Relatives Expressionsmuster der ersten (A), der zweiten (B) und der dritten (C) unabhängigen Probe mit Fehlerfortführung und Mittelwert aus allen drei Proben (D). Ratio 2D/3D der ersten, der zweiten und der dritten Probe sowie des Mittelwertes aus allen drei unabhängigen Probenpaaren (E).

3.3. Kooperationsprojekt mit dem Institute of Health and Biomedical Innovation, Brisbane

In Zusammenarbeit mit Frau Daniela Loessner (Institute of Health and Biomedical Innovation (IHBI) in Brisbane) wurde cDNA aus der Ovarialkarzinomzelllinie OVMZ-6 zur Verfügung gestellt. Am IHBI wurde zum einen RNA aus KLK4-7 überexprimierenden OVMZ-6 Zellen generiert und anschließend in cDNA transkribiert. Zum anderen wurde cDNA aus OVMZ-6 Zellen mit Überexpression der RSV-Vektorkontrolle zur Verfügung gestellt. cDNA wurde sowohl von KLK4-7, als auch von RSV-überexprimierenden Zellen aus 2D- und 3D-Zellkultur hergestellt. Die 3D-Zellkultivierung wurde im Partnerlabor in Brisbane Hydrogelmatrix-basiert durchgeführt.

Im Vergleich zu untransfizierten OVMZ-6 Zellen wurde in KLK4-7 überexprimierenden OVMZ-6 Zellen eine erhöhte Zellproliferationsrate und eine erhöhte Tumorzellinvasion beschrieben (Prezas *et al.*, 2006; Loessner *et al.*, 2013). Bei der Tumorzellinvasion und Metastasierung spielen auch Komponenten des Urokinase-Systems eine wichtige Rolle. Deshalb wurde in diesem Projekt evaluiert, ob eine Überexpression von KLK4-7 einen Einfluss auf das Expressionsmuster von PAI-1, uPA, uPAR, uPAR-del4/5 und Rab31 hat. Zudem wurde in diesem Projekt untersucht, ob sich zwischen 2D- und 3D-kultivierten Zellen Unterschiede im Expressionsmuster der ausgewählten Zielgene (PAI-1, uPA, uPAR, uPAR-del4/5, Rab31) zeigen.

3.3.1. Expressionsanalyse von Referenzgenen

Mittels qPCR (TaqMan Methode) wurde zur Qualitätsbestimmung der erhaltenen cDNA, analog zu dem von SpheroTec[®] verwendetem Probenmaterial, die Expression der Referenzgene HMBS und HPRT1 in zwei unabhängigen PCR-Läufen bestimmt (Tab. 12). Von jeder Gruppe wurde cDNA aus zwei unabhängigen RNA-Präparationen analysiert. Die Negativkontrolle und die *no template control* wurden mit Ct > 40 detektiert und lagen somit außerhalb der Nachweisgrenze. Die mitgeführte Positivkontrolle bewegte sich im gleichen Ct-Bereich wie die Referenzgene.

In Monolayerzellen werden die beiden Referenzgene in der RSV-Vektorkontrolle und in KLK4-7 überexprimierenden OVMZ-6 Zellen nahezu identisch exprimiert (Tab. 12). Sphäroide von RSV-Kontrollzellen zeigen einen Mittelwert von 2,46, was impliziert, dass im 3D-Zellmodell das Referenzgen HMBS im Verhältnis zu HPRT1 um mindestens den Faktor zwei höher exprimiert wird. Bei KLK4-7 überexprimierenden Sphäroiden verhält es sich ähnlich (Mittelwert 2,16). Zusammenfassend ist hier in der

Vektorkontrolle und in KLK4-7 überexprimierenden OVMZ-6 Zellen zu sehen, dass die Art der Zellkultivierung die Expression von Referenzgenen beeinflussen kann. Dieses Ergebnis präsentiert sich ähnlich zu den Resultaten aus den Zelllinien CaCo-2 und Hs746T, deren Sphäroide in Liquid-Overlay-Technik generiert wurden (Tab. 9).

OVMZ-6	RNA-Präparation	Ct _{HMBS} (s)	Ct _{HPRT1} (s)	$2^{\Delta Ct (HMBS-HPRT1)}$	MW ($2^{\Delta Ct (HMBS-HPRT1)}$) (s)
RSV 2D	1	28,90 (0,07)	28,78 (0,10)	1,09	1,03 (0,08)
	2	28,40 (0,09)	28,45 (0,20)	0,97	
KLK4-7 2D	1	28,74 (0,11)	28,41 (0,16)	1,26	1,12 (0,21)
	2	28,86 (0,15)	28,91 (0,02)	0,97	
RSV 3D	1	30,58 (0,10)	29,14 (0,11)	2,71	2,46 (0,36)
	2	29,75 (0,13)	28,61 (0,07)	2,20	
KLK4-7 3D	1	31,00 (0,17)	29,64 (0,12)	2,56	2,16 (0,57)
	2	30,74 (0,14)	29,94 (0,07)	1,75	

Tabelle 12: Expressionsanalyse von HMBS und HPRT1 in RSV-Vektorkontrolle und KLK4-7 überexprimierenden OVMZ-6 Zellen im 2D- und 3D-Zellmodell. Die Expressionsanalysen wurden in Triplets durchgeführt. Dargestellt ist das Ergebnis des zweiten unabhängigen PCR-Laufes mit Ct-Mittelwert und Standardabweichung (s), ausgewertet nach der ΔCt -Methode.

3.3.2. Expressionsanalyse von Komponenten des Urokinase-Systems

Die Expression von PAI-1, uPA, uPAR, uPAR-del4/5 und Rab31 wurde in RSV-Vektorkontrollzellen und in KLK4-7 überexprimierenden Zellen bestimmt (Abb. 23). PAI-1 wird im 2D-Zellmodell in KLK4-7 überexprimierenden OVMZ-6 Zellen signifikant höher exprimiert als in der RSV-Vektorkontrolle (2D Ratio RSV/KLK4-7 0,46). In Sphäroiden ist dieser Expressionsunterschied noch größer (3D Ratio RSV/KLK4-7 0,11). Bei uPA und Rab31 sind im 2D- und 3D-Zellmodell im Vergleich von RSV-Vektorkontrolle und KLK4-7 überexprimierenden Zellen keine signifikanten Expressionsunterschiede zu erkennen. uPA wird insgesamt, sowohl im 2D- als auch im 3D-Zellmodell, auf einem höheren Niveau exprimiert als die anderen Zielgene, was die relativen Ratios der Zielgene bezogen auf TBP zeigen. uPAR zeigt im 2D-Zellmodell zwischen RSV-Kontrollzellen und KLK4-7 überexprimierenden Zellen keinen signifikanten Expressionsunterschied. In Sphäroiden hingegen ist uPAR in KLK4-7 überexprimierenden Zellen signifikant höher exprimiert als in den Kontrollzellen (3D Ratio RSV/KLK4-7 0,39). uPAR-del4/5 war in keinem Probenansatz exprimiert.

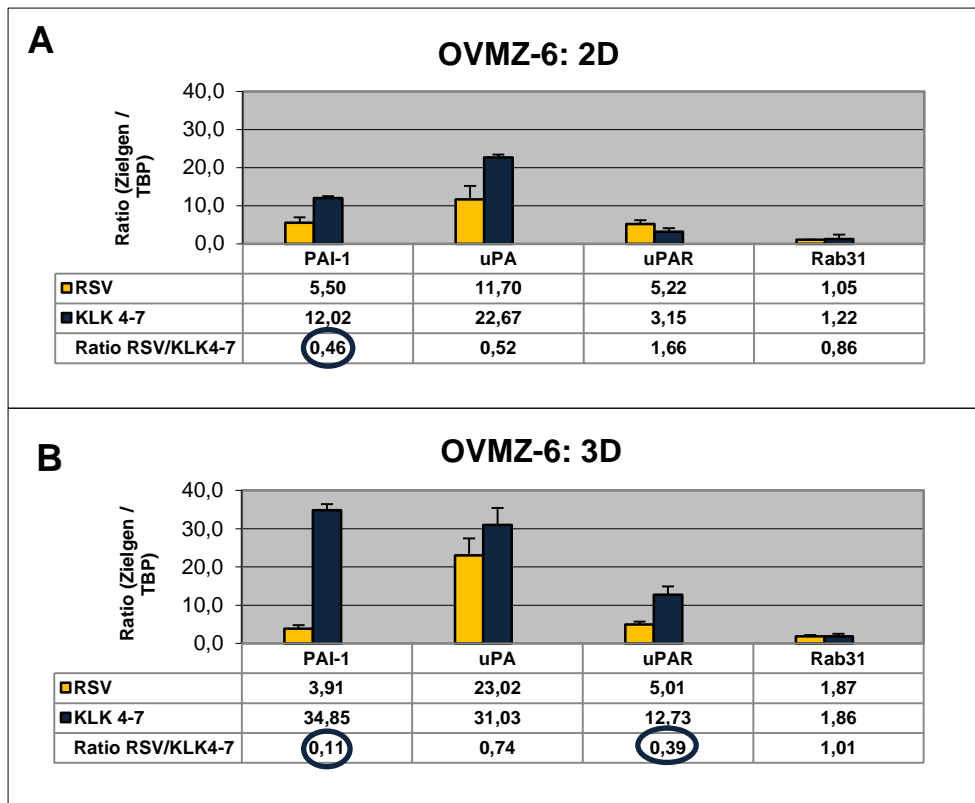


Abbildung 23: Expressionsmuster von PAI-1, uPA, uPAR und Rab31 in RSV-Vektorkontrolle und KLK4-7 überexprimierenden OVMZ-6 Zellen im 2D- und 3D-Zellmodell. Relative Zielgenexpression mit Standardabweichung und Ratio RSV/KLK4-7. Ratio RSV/KLK4-7 $\leq 0,5$ entspricht einer signifikanten Expressionserhöhung in KLK4-7 überexprimierenden Zellen (blaue Markierung).

Im direkten Vergleich von 2D- und 3D-Zellkultur (Tab. 13) war in der RSV-Vektorkontrolle bei keinem Biomarker ein signifikanter Expressionsunterschied zu erkennen. Dagegen war in KLK4-7 überexprimierenden OVMZ-6 Zellen bei PAI-1 und uPAR eine signifikante Überexpression in 3D nachzuweisen. In KLK4-7 überexprimierenden 3D-Zellen ist die Expressionshöhe von PAI-1 bzw. uPAR um mehr als den Faktor zwei höher als in 2D-Zellen (PAI-1 Ratio 2D/3D 0,34; uPAR Ratio 2D/3D 0,25). Bei uPA und Rab31 waren in KLK4-7 überexprimierenden OVMZ-6 Zellen keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen 2D und 3D darstellbar.

Biomarker	Kulturart	RSV	KLK 4-7
PAI-1 / TBP	2D	5,50	12,02
	3D	3,91	34,85
	2D/3D	1,41	0,34
	x-fach	1,41	2,90
uPA / TBP	2D	11,70	22,67
	3D	23,02	31,03
	2D/3D	0,51	0,73
	x-fach	1,97	1,37
uPAR / TBP	2D	5,22	3,15
	3D	5,01	12,73
	2D/3D	1,04	0,25
	x-fach	1,04	4,04
Rab31 / TBP	2D	1,05	1,22
	3D	1,87	1,86
	2D/3D	0,56	0,66
	x-fach	1,78	1,52

Tabelle 13: Expressionsmuster von PAI-1, uPA, uPAR und Rab31 in RSV-Vektorkontrolle und KLK4-7 überexprimierenden OVMZ-6 Zellen im Vergleich von 2D- und 3D-Zellmodell. Relative Zielgenexpression (Zielgen/TBP) in 2D- und 3D-Zellkultur mit Angabe der Ratio 2D/3D. Der Wert „x-fach“ zeigt an, um welchen Zahlenwert sich die Expression zwischen 2D und 3D unterscheidet. Ratio 2D/3D \leq 0,5 entspricht einer signifikanten Expressionserhöhung in 3D (blaue Markierung).

3.4. Die SpheroNeo-Studie: Ergebnisse der *in vitro* Wirkstofftestung am Sphäroid-Mikrotumormodell

Die SpheroNeo-Studie (*spheroids for the prediction of neoadjuvant chemotherapy*) wurde als prospektive, nicht-interventionelle Kohortenstudie konzipiert, zur Vorhersage des Effektes der medikamentösen Tumortherapie am multizellulären Sphäroidmodell bei neoadjuvant behandelten Mammakarzinompatienten (offizieller Studientitel nach der Studiensynopse). Über Feinnadelbiopsien wurde aus der Brust Tumorgewebe für die histopathologische Diagnostik und für die SpheroNeo-Studie gewonnen. Nach einem enzymatischen Gewebeerweichung und nach der Bestimmung der Zellviabilität mittels Trypanblau-Färbung wurden aus der verbliebenen Zellsuspension nach der Liquid-Overlay-Technik 3D-Gewebesphäroide generiert. Dabei wurden alle im Patientengewebe vorhandenen Zelltypen beibehalten. Die dreidimensionalen Zellaggregate wurden nach 48h mit einer ausgewählten Kombination an Chemotherapeutika für weitere 96h in *peak plasma concentration* (PPC) behandelt. Die PPC bezeichnet dabei die in der klinischen Situation als maximaler Plasmawirkspiegel erachtete Wirkstoffkonzentration. Die Auswahl der Chemotherapeutika richtete sich nach den Empfehlungen des behandelnden Arztes bzw. war identisch zu dem zum Biopsiezeitpunkt geplanten klinischen Therapievorhaben. Nach 96h Therapiedauer wurde die verbliebene metabolische Zellaktivität mittels CellTiter-Glo[®] Luminescent, Cell Viability Assay (Promega, Mannheim) bestimmt. Nach acht Tagen waren die Ergebnisse der *in vitro* Wirkstofftestung verfügbar.

Da es sich um eine nicht-interventionelle Studie handelte, hatten die Ergebnisse des *in vitro* SpheroTests keinen Einfluss auf das weitere Behandlungsregime des individuellen Patienten. Zum statistischen Nachweis einer Prädiktivität des Therapieansprechens wurde das Ergebnis der *in vitro* Wirkstofftestung mit dem klinischen Therapieergebnis verglichen. Nach Abschluss einer mehrzyklischen neoadjuvanten Chemotherapie (primäre systemische Therapie, PST) erfolgte eine operative Tumorentfernung. Aus dem operativ gewonnenen Gewebematerial wurde der histopathologische Remissionsgrad bestimmt. Dieser stellte das klinische Therapieergebnis dar. Eine pathologische Komplettremission (pCR, *pathological complete response*) wurde als ypT0, ypN0 (d.h. kein Nachweis vitaler Tumorzellen in Brust und Axilla) definiert. Basierend auf diesem klinischen Befund wurde die Prädiktivität des Sphäroidmodells statistisch evaluiert. Die aufgeführten inhaltlichen Aspekte zur SpheroNeo-Studie wurden aus *Halfter et al. (2015)* entnommen.

Von Oktober 2009 bis September 2012 wurden in 13 deutschlandweiten Brustzentren 202 Patienten rekrutiert, wovon 78 Patienten in die Studie eingeschlossen werden konnten (Halfter et al., 2015). An der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar wurden von Mai 2010 bis Juni 2012 27 Mammakarzinompatienten im Rahmen der SpheroNeo-Studie rekrutiert. Neben dem Mitwirken bei der Patientenrekrutierung und dem Probenversand wurde im Rahmen meiner Dissertation die Follow-up-Dokumentation der an der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar rekrutierten Patienten durchgeführt. Von den 27 am Klinikum rechts der Isar rekrutierten Patienten wurden fünf Patienten in die Studie inkludiert. Demnach waren 22 Patienten nach definierten Ein- und Ausschlusskriterien nicht für die Studie geeignet. Der größte Anteil der Patienten wurde wegen klinischer Kriterien ausgeschlossen (z.B. keine neoadjuvante Chemotherapie erhalten, klinisches Therapieschema nicht identisch zur *in vitro* Therapie, vorangegangenes malignes Tumorgeschehen). Zu den labor-technischen Ausschlusskriterien zählte das Vorliegen nicht ausreichend vitaler Tumorzellen, v.a. wenn nekrotisches Gewebe in der Stanze erfasst wurde. In diesem Kapitel werden ausschließlich Daten und Therapieergebnisse von Patienten gezeigt, die an der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar rekrutiert, aber nicht in die Studie eingeschlossen wurden, da in der Publikation der SpheroNeo-Studie keine individuelle, nach Rekrutierungszentrum aufgeschlüsselte Ergebnisdarstellung erfolgte (Halfter et al., 2015).

Von den insgesamt 22 ausgeschlossenen Patienten wurde das Tumorgewebe von 17 Patienten für weitere Forschungszwecke dennoch *in vitro* behandelt (Tab. 14). Fünf Patientenproben konnten nicht *in vitro* therapiert werden, meist wegen mangelnder Verfügbarkeit von ausreichend vitalem Tumorgewebe. Für eine erfolgreiche Sphäroidbildung ist nach Angabe von SpheroTec[®] u.a. eine Zellvitalität von mindestens 70% erforderlich. Die Anzahl der generierten Sphäroide stellte den limitierenden Faktor für die Therapietestung dar. Je mehr Sphäroide gebildet werden konnten, desto breiter konnte die Therapieauswahl getroffen werden. Die Leitlinientherapie des Mammakarzinoms im neoadjuvanten Bereich stellt eine Kombination aus einem Anthrazyklin und einem Taxan dar, in Kombination mit Trastuzumab (Herceptin[®]) bei HER2-Positivität (S3-Leitlinie, Juli 2012). Zur klinischen Anwendung kommt hierbei meist eine Kombination aus Epirubicin/Cyclophosphamid und Docetaxel (EC+D) in 6-8 Therapiezyklen mit einer Gesamtdauer von 18-24 Wochen. Dieses Therapie-schema wurde folglich auch *in vitro* vorrangig angewandt.

Patienten-ID	Geburts-jahr	verwertbare Gewebemenge in Stanze (mg)	Zellvitalität (%)	Zellzahl / Sphäroid	Anzahl der Sphäroide	getestete Therapien (PPC)
1	1937	153,9	90,5	6.175	7	EC, D, D+H
2	1958	180,0	95,0	42.750	2	EC
3	1959	68,9	92,8	44.000	4	EC
4	1944	37,9	94,3	37.250	4	EC
5	1939	27,7	90,1	50.000	2	EC
6	1965	15,7	93,6	29.000	2	EC
7	1960	18,2	91,5	35.250	4	EC
8	1972	353,4	63,8	55.500	6	EC, D
9	1955	78,4	66,7	29.531	6	EC+D; EC+D+H
10	1955	54,4	n.a.	13.000	4	EC+D
11	1968	44,0	92,3	30.000	6	EC, D
12	1951	136,5	84,8	20.000	15	EC, D, EC+H, D+H
13	1969	293,0	78,4	27.000	9	EC, D
14	1969	170,7	85,0	10.000	6	FEC, TCH
15	1971	70,5	82,4	24.000	6	EC, D
16	1969	42,4	75,5	18.500	6	EC, D
17	1948	54,8	87,0	3.295	4	EC

Tabelle 14: Charakteristik der im Rahmen der SpheroNeo-Studie rekrutierten, aber exkludierten Patientenproben. Die verwertbare Gewebemenge in der Stanzbiopsie wurde nach makroskopischer Entfernung von nicht-tumorösem Fett- und Bindegewebe bestimmt. Zellvitalität und Zellzahl wurden mit der Trypanblau-Färbemethode ermittelt. Die Therapietestung erfolgte unter Einsatz standardisierter Wirkstoffkonzentrationen (PPC) nach Herstellerangaben. E: Epirubicin, C: Cyclophosphamid, D: Docetaxel, H: Herceptin® (Trastuzumab), F: 5-Fluoruracil, TCH: Taxotere®/Carboplatin/ Herceptin®. Dargestellt sind die Daten von 17 an der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar rekrutierten, aber exkludierten Patientenproben.

Bei den *in vitro* behandelten Gewebeproben diente die metabolische Zellaktivität nach Behandlungsende als Maß für das Ansprechen auf die getesteten Chemotherapeutika (Tab. 15). Je höher die metabolische Zellaktivität nach Abschluss der *in vitro* Therapie war, desto schlechter war das Ansprechen auf die Chemotherapeutika. Werte der metabolischen Zellaktivität über 100% geben an, dass die Zellen unter der *in vitro* Therapie sogar stimuliert wurden und sie nach der Behandlung eine höhere Zellaktivität aufwiesen als die Negativkontrolle. Alle Ergebnisse wurden auf eine nicht chemotherapierte Negativkontrolle (reines Lösungsmittel) bezogen, um etwaige Einflüsse des Lösungsmittels auf das Zellverhalten zu nivellieren. Angelehnt an die Leitlinienempfehlung wurden die Sphäroide am häufigsten mit der Kombination Epirubicin/Cyclophosphamid (EC) behandelt, gefolgt von einer Monotherapie mit Docetaxel (D). Insgesamt zeigten die Sphäroide ein sehr individuelles und inhomogenes Ansprechen auf die Chemotherapeutika.

Patienten-ID	Metabolische Zellaktivität nach 96h-Therapietestung (% Lösungsmittelkontrolle)						
	EC	D	D + H	ECD	ECH	EC + D + H	TCH
1	99,20	100,48	99,84				
2	99,37						
3	80,58						
4	100,80						
5	94,01						
6	3,17						
7	3,68						
8	90,41	103,86					
9				104,38		105,63	
10				25,00			
11	72,56	145,60					
12	59,48	107,52	89,95		52,19		
13	112,20	125,39					
14							45,52
15	50,37	95,58					
16	6,26	94,15					
17	11,69						

Tabelle 15: Ergebnisse der *in vitro* Wirkstofftestung am Sphäroid-Mikrotumormodell von 17 im Rahmen der SpheroNeo-Studie rekrutierten, aber exkludierten Brustkrebspatienten. Angabe der metabolischen Zellaktivität nach 96h Behandlungsdauer in % zur Negativkontrolle (CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay, Promega, Fitchburg, USA). Als Negativkontrolle wurde reines Lösungsmittel ohne Chemotherapiezusätze verwendet. E: Epirubicin, C: Cyclophosphamid, D: Docetaxel, H: Herceptin[®], F: 5-Fluoruracil, TCH: Taxotere[®]/Carboplatin/Herceptin[®]. Die blauen Felder stellen nicht durchgeführte Wirkstofftestungen dar.

Das Ansprechen auf die Kombination von Epirubicin und Cyclophosphamid (EC) war sehr unterschiedlich (Abb. 24A). Von insgesamt 14 mit EC getesteten Patientenproben zeigten vier Proben (Patienten-ID 6, 7, 16, 17) ein sehr positives Ansprechen mit einer metabolischen Zellaktivität unter 12% nach Therapieende, während sieben Patientenproben eine metabolische Restaktivität von über 80% aufwiesen. Drei Gewebeproben (Patienten-ID 11, 12, 15) lagen im mittleren Bereich zwischen 50% und 73% metabolischer Zellaktivität. In der Monotherapie mit Docetaxel war bei sieben getesteten Gewebeproben eine breite Therapieresistenz mit metabolischer Zellaktivität > 94% nach Behandlungsende zu erkennen (Abb. 24B). Mit der 3-er Kombination EC+D wurden nur zwei Patientenproben behandelt. Patientenprobe 9 wies nach der Behandlung mit EC+D eine metabolische Zellaktivität von 104% auf, Patientenprobe 10 eine metabolische Zellaktivität von 25% (Tab. 15).

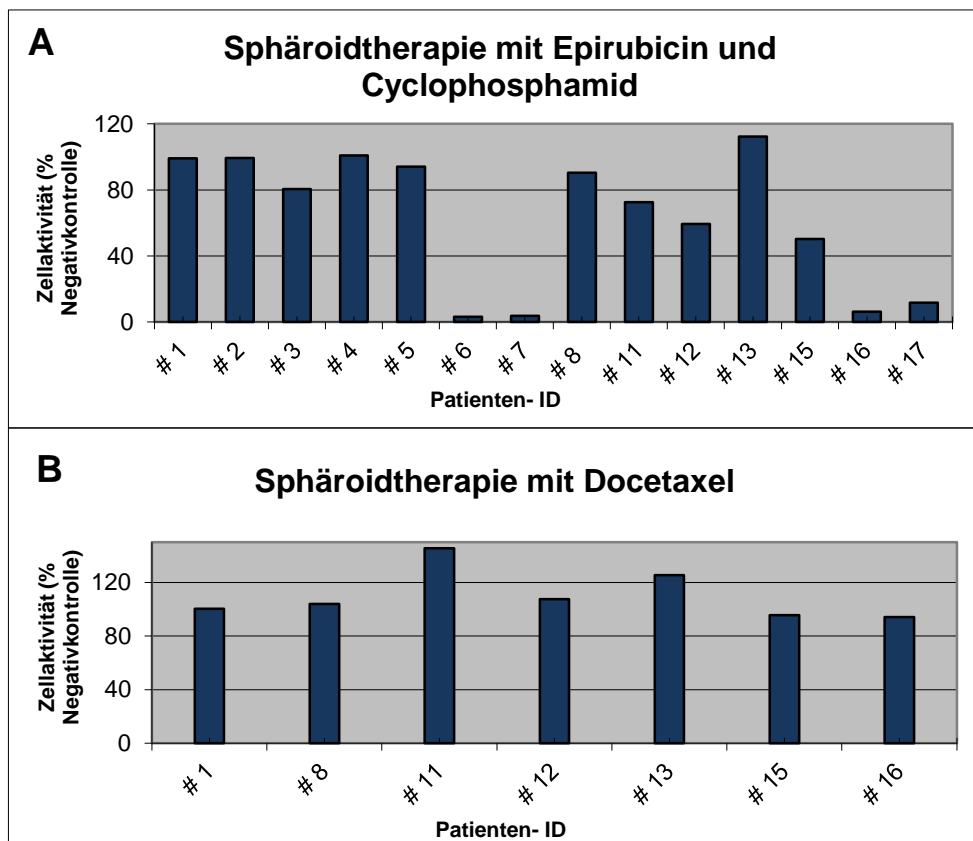


Abbildung 24: Selektion effizienter Therapieoptionen im Sphäroid-Mikrotumormodell. *In vitro* Sphäroidtherapie mit Epirubicin/Cyclophosphamid (A) bzw. Docetaxel (B) in PPC. Metabolische Zellaktivität nach 96h Behandlungsdauer in % zur Negativkontrolle.

Die Gewebeprobe von Patienten-ID 12 zeigte ein sehr unterschiedliches Ansprechen auf die getesteten Chemotherapeutika (Abb. 25). Die Therapie mit EC ergab ein mittleres Therapieansprechen (metabolische Zellaktivität 59%). Durch die Kombinationsbehandlung mit Herceptin[®] (ECH) verbesserte sich das Therapieansprechen nicht wesentlich (metabolische Zellaktivität 52%). Die Monotherapie mit Docetaxel zeigte ein sehr schlechtes Therapieansprechen (metabolische Zellaktivität 108%). Durch Kombination von Docetaxel mit Herceptin[®] (D+H) konnte auch hier kein verbessertes Therapieansprechen erreicht werden (metabolische Zellaktivität 90%). Histopathologisch war die Patientin HER2 negativ. Eine Kombinationsbehandlung mit EC+D wurde nicht getestet.

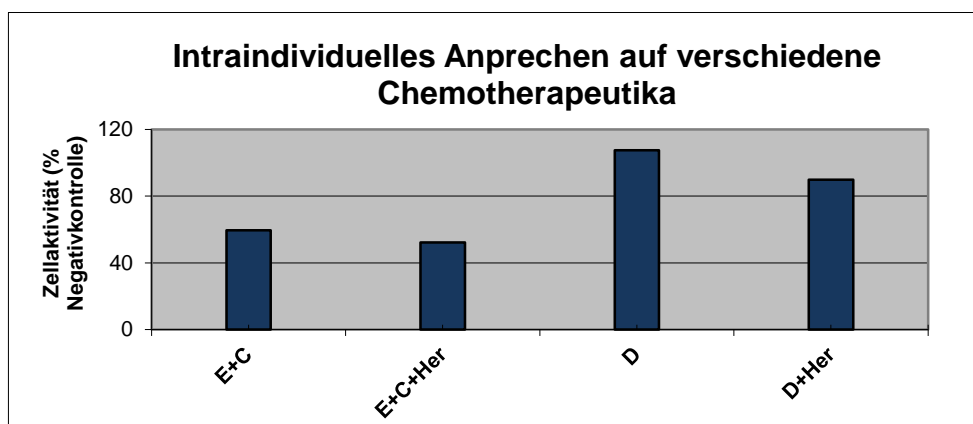


Abbildung 25: Intraindividuelles Ansprechen von Gewebesphäroiden auf verschiedene Chemotherapeutika. *In vitro* Sphäroidtherapie von Gewebeproben der Patienten-ID 12 mit verschiedenen Chemotherapeutika in PPC (E: Epirubicin, C: Cyclophosphamid, D: Docetaxel, Her: Herceptin[®]). Metabolische Zellaktivität nach 96h Behandlungsdauer in % zur Negativkontrolle.

Der HER2-Inhibitor Trastuzumab (Herceptin[®]) wurde *in vitro* in Kombinationstherapien eingesetzt, analog zum Vorgehen in der klinischen Praxis. Eine Therapie mit Trastuzumab wird bei positivem HER2-Status empfohlen. Bei zwei Patientenproben (Patienten-ID 1, 9) konnte im SpheroTest durch Kombinationstherapie mit Trastuzumab im Vergleich zur Monotherapie kein verbessertes Therapieansprechen erreicht werden (Abb. 26). Beide Patienten waren HER2 negativ, sodass das Ergebnis des SpheroTests mit dem histopathologischen Befund übereinstimmte. Leider konnte in dem kleinen Patientenkollektiv der *in vitro* Effekt von Trastuzumab nicht getestet werden, da alle behandelten Gewebeproben histologisch HER2 negativ waren.

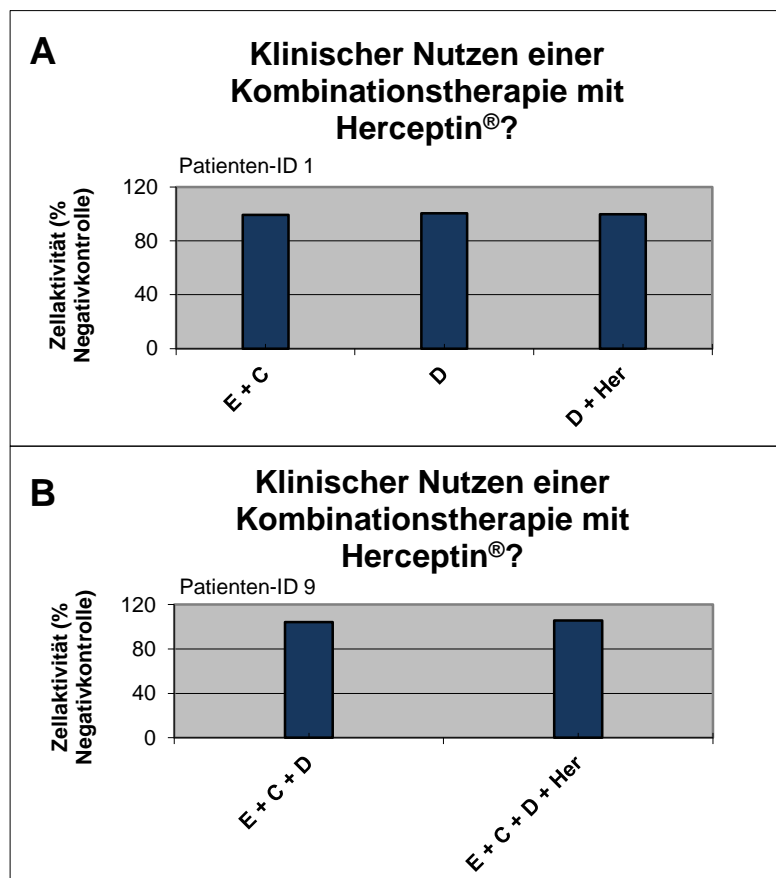


Abbildung 26: *In vitro* Sphäroidtherapie mit Trastuzumab (Herceptin®). *In vitro* Sphäroidtherapie von Gewebeproben der Patienten-ID 1 (A) und 9 (B) mit verschiedenen Chemotherapeutika in PPC (E: Epirubicin, C: Cyclophosphamid, D: Docetaxel, Her: Herceptin®). Metabolische Zellaktivität nach 96h Behandlungsdauer in % zur Negativkontrolle.

4. Diskussion

4.1. RNA-Isolierung und Expressionsanalyse von Referenzgenen

Multizelluläre Sphäroide sind dreidimensionale Zellaggregate, die anhand charakteristischer Eigenschaften die *in vivo* Tumorbiologie reflektieren sollen. Die Komplexität und Heterogenität sowie die zelluläre und humorale Zusammensetzung des Tumorzell-Mikromilieus können in der klassischen zweidimensionalen Zellkultur nicht zufriedenstellend wiedergegeben werden. Durch die räumliche (3D) Anordnung der Zellverbände im Sphäroid entsteht ein dem *in vivo* Tumor ähnlicher schichtartiger Aufbau aus Tumorzellsubpopulationen in unterschiedlichen Zellzyklusstadien. Sphäroide sind variabel in ihrer Zellzusammensetzung. Sie können aus verschiedenen Zelltypen, z.B. Fibroblasten, primären Tumorzellen oder Tumorzelllinien, bestehen. In Gewebesphäroiden, bestehend aus malignem Tumorgewebe, sind neben Tumorzellen auch diverse Stromazellen zu finden (*Hoffmann et al., 2015; Halfter et al., 2016; Halfter und Mayer, 2017*).

3D-Sphäroide können auf unterschiedliche Weise hergestellt werden. Der Großteil der in dieser Arbeit verwendeten Sphäroide wurde mit der Liquid-Overlay-Technik generiert. In der Liquid-Overlay-Technik formen Zellen unter Aufhebung von adhäsiven Umgebungsbedingungen spontan dreidimensionale Zellaggregate unterschiedlicher Morphologie. Im Kooperationsprojekt mit dem IHBI (Institute of Health and Biomedical Innovation) in Brisbane wurden die Sphäroide mittels biomimetischen PEG-Hydrogelmatrices hergestellt. Bei der Sphäroidgenerierung bleibt die ursprüngliche Zellzusammensetzung erhalten, sodass Gewebesphäroide die *in vivo* Tumorarchitektur mit Differenzierungsgrad und spezifischem Chemoresistenzmuster ziemlich genau widerspiegeln können (*Halfter et al., 2015; Halfter und Mayer, 2017*). Die räumliche und funktionelle Organisation des Tumorzell-Mikromilieus kann die Signaltransduktion beeinflussen und somit auf die Genexpression und das individuelle Zellverhalten stark modulierend wirken. Dieses sogenannte *tumor microenvironment* beeinflusst auch das Expressionsmuster bestimmter Protease-Systeme (z.B. Urokinase-System, System der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen) (*Mason und Joyce, 2011; Mekkawy et al., 2014*).

Voraussetzung für die Generierung aussagekräftiger Expressionsprofile mittels qPCR im 2D- und 3D-Zellmodell ist eine effektive und qualitativ hochwertige RNA-Isolierung. Die RNA-Isolierung aus einer relativ geringen Zellzahl setzt ein präzises

Arbeiten voraus, zumal RNA im Vergleich zu genomischer DNA sehr leicht durch ubiquitär vorhandene RNasen abgebaut werden kann. Die Effizienz der RNA-Isolierung ergibt sich sowohl aus der absoluten RNA-Gesamtausbeute als auch der Reinheit der Präparation (Ratio 260/280, Ratio 260/230). Von der gewonnenen Gesamt-RNA (mRNA, tRNA, rRNA, miRNA) beträgt der Anteil der mRNA nur 1-5% (Qiagen, 2013-15). Den größten Anteil in einer RNA-Präparation stellen tRNA und rRNA dar. Die Gesamt-RNA-Menge hängt zudem vom Zelltypus und der Genaktivität ab. Jedes Gen, das aktuell transkribiert wird, ist auch in Form von mRNA nachweisbar.

Pro Zelle kann mit einer durchschnittlichen Gesamt-RNA-Menge von 10-30 pg gerechnet werden, was einer Anzahl von etwa 360.000 mRNA-Molekülen entspricht (Qiagen, 2013-15). In den im 2D-Zellmodell generierten Verdünnungsreihen der Zelllinie MDA-MB-231 wurde aus 80.000 Zellen eine durchschnittliche RNA-Gesamtausbeute von 3,5 µg erzielt (Tab. 7). Ausgehend von einer Gesamt-RNA-Menge von 20 pg pro Zelle würde sich bei 80.000 Zellen ein Zielbereich von 1,6 µg Gesamt-RNA ergeben. Das vorliegende Ergebnis lag somit über dem erwarteten Zielbereich. Auch die RNA-Isolation aus verschiedenen Verdünnungsstufen der Zelllinien CaCo-2 und Hs746T lag im erwarteten Zielbereich (Tab. 8). Im 3D-Zellmodell wurde aus 75.000 CaCo-2 Zellen eine Gesamt-RNA-Menge von 1,7 µg isoliert, der errechnete Zielbereich liegt bei dieser Zellzahl bei 1,5 µg Gesamt-RNA. In der Zelllinie Hs746T verhielt es sich ähnlich. Insgesamt wurden bei diesen RNA-Präparationen durchaus zufriedenstellende RNA-Gesamtausbeuten erreicht. In den Zelllinienexperimenten wurden im 2D- und 3D-Zellmodell jeweils 150.000 Zellen eingesetzt, was bei einem RNA-Gehalt von 20 pg pro Zelle einem Zielbereich von 3 µg Gesamt-RNA entspricht. In den bei elf Zelllinien durchgeführten RNA-Isolierungen ergab sich eine Gesamt-RNA-Menge von 0,9–6 µg, was mit dem Zielbereich übereinstimmte (Tab. 10).

Neben der RNA-Absolutmenge ist v.a. die Qualität der extrahierten RNA von Bedeutung. Diese wird bestimmt durch das Verhältnis der Lichtabsorption bei 260 nm und 280 nm (Ratio 260/280) bezüglich Proteinverunreinigungen und durch das Verhältnis der Lichtabsorption bei 260 nm und 230 nm (Ratio 260/230) bezüglich organischer Kontamination. Verunreinigungen beeinflussen negativ nachfolgende Prozesse der cDNA-Synthese bzw. der qPCR. Während die Ratio 260/280 in den Zellexperimenten im Zielbereich von ca. 2,0 als Zeichen geringer Proteinkontamination lag, war die Ratio 260/230 annähernd konstant unter dem Zielwert von 1,8 (Tab. 7, 8, 10). Dies deutet auf eine Verunreinigung mit organischen Substanzen hin, die im Prozess der RNA-Isolierung eingesetzt werden (z.B. Phenole, GITC) und im Wellenlängenbereich von 230 nm ihr Absorptionsmaximum aufweisen.

Guanidinisothiocyanat (GITC) ist ein hochkonzentrierter Bestandteil des zur Zellyse verwendeten RLT-Puffers. Analysen von Qiagen zeigen, dass bereits bei GITC-Konzentrationen $> 0,1$ mM die Ratio 260/230 stark abnimmt. Die nachgeschaltete *real time* PCR wird aber erst bei GITC-Konzentrationen von > 100 mM negativ beeinflusst (*Ahlfen von und Schlumpberger, Qiagen Gene Expression Newsletter Issue 15/10*). Daneben muss beachtet werden, dass die Ratio 260/230 auch von der Gesamt-RNA-Menge abhängt. Bei Verwendung geringer Zellzahlen mit entsprechend niedriger RNA-Ausbeute würde der Einsatz einer konstanten Menge RLT-Lysepuffer mit gleichbleibender GITC-Konzentration einen starken Abfall der Ratio 260/230 erklären. Somit ist zusammenfassend, trotz niedriger Ratio 260/230, die erzielte Qualität der RNA, isoliert aus vergleichsweise wenigen Zellen, als gut einzustufen. Die Konzentration von GITC im RLT-Lysepuffer wird von der Firma Qiagen nicht angegeben. Da allerdings erst ab einem Konzentrationsbereich von > 100 mM negative Einflüsse auf die qPCR zu erwarten sind und der vermutete Kontaminationsgrad deutlich < 100 mM war, war bei ausreichender RNA-Gesamtmenge mit keinen Beeinträchtigungen der Genexpressionsanalysen zu rechnen (*Ahlfen von und Schlumpberger, Qiagen Gene Expression Newsletter Issue 15/10*).

Anders verhielt es sich bei der RNA-Extraktion aus Tumorgewebe (Tab. 11). Bei Tumorsphäroiden, bestehend aus 150.000 bis 500.000 Zellen, konnte bei 150.000 Zellen eine maximale RNA-Ausbeute von 18,30 ng/ μ l erzielt werden (Tab. 11, Patienten-ID 24). In Sphäroiden bestehend aus 500.000 Zellen wurde weniger RNA isoliert als aus 150.000 Zellen. Ausgehend von einer Gesamt-RNA-Menge von 20 pg pro Zelle würde sich bei 150.000 Zellen ein Zielbereich von 3 μ g Gesamt-RNA ergeben (*Qiagen, 2013-15*). Bei einer RNA-Eluatmenge von 30 μ l ergab sich eine RNA-Gesamtausbeute von 0,6 μ g, was deutlich unter dem erwarteten Zielbereich von 3 μ g liegt (Tab. 11, Patienten-ID 24). Außerdem lag die Ratio 260/230 nicht im definierten Zielbereich von 1,8. Da bei niedrigem RNA-Gehalt eine mögliche GITC-Kontamination stärkeren Einfluss auf die Ratio 260/230 hat, wurde zur Minimierung des GITC-Einflusses die RLT-Puffermenge von 700 μ l auf 150 μ l reduziert. Dies hatte jedoch keinen bedeutenden Effekt. Um die RNA-Ausbeute zu steigern, wurde einigen Proben *carrier* RNA zugesetzt (Daten nicht gezeigt), jedoch ohne nachweisbaren Erfolg. Auch eine manuelle Aufarbeitung der Sphäroide konnte die RNA-Gesamtausbeute nicht erhöhen. Abschließend konnte das Problem der RNA-Isolierung aus Gewebesphäroiden nicht geklärt werden. Hierfür sind weiterführende Optimierungsversuche notwendig.

Die aus Tumorgewebe gewonnenen 2D-Suspensionszellen lieferten eine mehr als dreifach höhere RNA-Gesamtausbeute als die Gewebesphäroide bei gleicher Zellzahl (Tab. 11, Patienten-ID 22, 23, 24). Dies könnte bedeuten, dass im Gegensatz zu 2D-Suspensionszellen in 3D-Gewebesphäroiden RNA vermehrt durch RNasen

abgebaut wird. Zudem deutet es darauf hin, dass 3D-Zellkomplexe eine andere Biologie aufweisen als 2D-Monolayerzellen. Erst kürzlich wurde beschrieben, dass Sphäroide aus dem kolorektalen Karzinom unterschiedlicher Zellzusammensetzung (Zelliniensphäroide, Zelliniensphäroide co-kultiviert mit Fibroblasten und heterotypische Tumorgewebesphäroide) *in vitro* ein sehr unterschiedliches Ansprechen auf verschiedene Chemotherapeutika zeigen (Hoffmann et al., 2015). Zelliniensphäroide wiesen hierbei eine höhere Chemoresistenz auf als Gewebesphäroide. Dementsprechend könnte sich auch die RNA-Isolierung aus Gewebesphäroiden anders verhalten als aus Zelliniensphäroiden. Eventuell sind in Zelliniensphäroiden weniger RNasen enthalten bzw. bieten unter Abwesenheit von RNasen ein „RNA-protektives“ Mikromilieu. Zudem könnte die Zellzusammensetzung der Gewebesphäroide entscheidend sein, da im Gegensatz zu Zelliniensphäroiden, welche ausschließlich aus Tumorzellen bestehen, in Gewebesphäroiden auch Stromazellen (z.B. Fibroblasten, Adipozyten, Endothelzellen, Immunzellen) vorhanden sind, die ebenso unterschiedliche RNA-Mengen enthalten. Auch wäre eine Induktion von RNasen durch Stromazellen möglich. Um tumorspezifische Charakteristika auszuschließen, sollten nachfolgende Analysen neben dem Ovarial- und kolorektalen Karzinom weitere Tumorentitäten berücksichtigen. Zudem wäre in weiteren Experimenten zu untersuchen, welchen Einfluss die Art des Sphäroidmodells auf die Effizienz der RNA-Isolierung aus Gewebesphäroiden hat.

In der Expressionsanalyse der Referenzgene HMBS und HPRT1 wurde im 2D- und 3D-Zellmodell generell eine gute cDNA-Qualität erzielt. In Sphäroiden der Zelllinien Hs746T und HCT116 konnten beispielhaft deutliche relative Expressionsunterschiede zwischen HMBS und HPRT1 gezeigt werden, was auf entscheidende biologische Unterschiede zwischen dem 2D- und 3D-Zellmodell hindeutet (Tab. 9, Abb. 12).

Hinsichtlich der erzielten Ct-Werte ist anzumerken, dass bei der *real time* PCR bereits minimale Abweichungen in der eingesetzten Zellzahl eine unterschiedliche Effizienz der RNA-Isolierung, der cDNA-Synthese bzw. der qPCR bewirken. Ebenso haben Pipettierungenauigkeiten einen starken Einfluss auf das Ergebnis des Ct-Wertes. So ist auch der nahezu identische Ct-Wert bei einer Präparation von 80.000 und 40.000 Zellen in der ersten Verdünnungsreihe der Zelllinie MDA-MB-231 erklärbar (Tab. 7). Die Versuchsplanung sollte immer eine adäquate Zahl an Replikaten enthalten und die Ergebnisse sollten in mindestens zwei unabhängigen Wiederholungsexperimenten bestätigt werden. Dies wurde im Zuge der Versuchsdurchführung weitestgehend beachtet.

4.2. Expressionsanalyse von Komponenten des Urokinase-Systems im Sphäroid-Mikrotumormodell

Das Urokinase-System ist eines der am besten untersuchten Protease-Systeme im menschlichen Organismus, sowohl im physiologischen als auch im tumorpathologischen Kontext. Bei einer Vielzahl von Tumorentitäten, insbesondere bei gynäkologischen Tumoren wie dem Mamma- und Ovarialkarzinom, korrelieren erhöhte mRNA- bzw. Proteinwerte, u.a. von uPA und PAI-1, mit einer schlechten Krankheitsprognose. In zahlreichen Untersuchungen wurde der Einfluss des Urokinase-Systems auf Tumorzellinvasion, Proliferation und Metastasierung bestätigt. Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag darin, zu untersuchen, ob bei ausgewählten Faktoren des Urokinase-Systems Expressionsunterschiede zwischen 2D-Monolayerzellen und 3D-Sphäroiden identifizierbar sind. Das Expressionsmuster von uPA, PAI-1, uPAR, uPAR-del4/5, Rab31 und KLK7 als Mitglied der Kallikrein-ähnlichen Peptidasen wurde in elf Zelllinien vier verschiedener Tumorentitäten (Mammakarzinom: T47D, SKBR3, HCC1143, HCC70; Ovarialkarzinom: OVCAR-3, SKOV-3; Magenkarzinom: Hs746T, N87; kolorektales Karzinom: CaCo-2, HT29, HCT114) im Vergleich von 2D- und 3D-Zellmodell bestimmt.

Die sechs analysierten Zielgene uPA, PAI-1, uPAR, uPAR-del4/5, Rab31 und KLK7 zeigten in insgesamt 15 Fällen in 3D-Sphäroiden eine signifikant höhere Expression als in 2D-Monolayerzellen (Abb. 20). uPAR war von den analysierten Zielgenen das am häufigste in 3D signifikant überexprimierte Zielgen (in 6 von 11 Zelllinien), gefolgt von Rab31 in vier von elf Zelllinien, PAI-1 in drei von elf Zelllinien und KLK7 in zwei von elf Zelllinien. Lediglich in zwei Fällen (PAI-1 in SKBR3-Zellen, uPA in SKOV-3-Zellen) war eine signifikant höhere Expression in 2D-Monolayerzellen zu erkennen. uPAR-del4/5 wurde weder im 2D- noch im 3D-Zellmodell in einer der elf Zelllinien exprimiert. Dies wurde bereits von *Luther et al. (2003)* im Rahmen der Etablierung von hochsensitiven LightCycler Assays zur quantitativen Bestimmung von uPAR-del4/5 in einigen Mammakarzinomzelllinien (u.a. T47D und MCF-7) festgestellt. Bei Rab31 war in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von *Grismayer et al. (2012)* in allen analysierten Zelllinien, sowohl im 2D- als auch im 3D-Zellmodell, eine sehr niedrige Expressionshöhe zu beobachten. uPAR wurde von allen Zielgenen am stärksten exprimiert.

uPAR ist ein membranständiges Polypeptid, das u.a. über die Interaktion mit uPA am *Remodeling* der extrazellulären Matrix beteiligt ist. Dadurch spielt uPAR eine zentrale Rolle in der Tumorzellproliferation und Migration. Das sogenannte Tumor-Mikromilieu, dessen wichtiger Bestandteil das uPA-System ist, wird ausschließlich in 3D-

Zellmodellen hinreichend dargestellt (*Antoni et al., 2015*). Das uPA-System ist ein vorrangig extrazelluläres Protease-System. Dadurch könnte erklärbar sein, dass viele Faktoren des uPA-Systems im 3D-Zellmodell höher exprimiert werden als in 2D-Monolayerzellen. Monolayerzellen können aufgrund ihrer Wachstumsbedingungen auf flacher, zweidimensionaler Plastikoberfläche das extrazelluläre Milieu nicht ausreichend imitieren. Zudem ist in zweidimensional wachsenden Zellen nur 50% der Zelloberfläche dem Kulturmedium exponiert, während die restlichen 50% an die Zellkulturflasche fixiert sind und dem natürlichen interzellulären Kontakt entzogen sind (*Antoni et al., 2015*). Dreidimensional wachsende Zellen exponieren annähernd 100% ihrer Zelloberfläche dem umgebenden Tumor-Mikromilieu und können so, ähnlich dem *in vivo* Geschehen, mit anderen Zellen und der extrazellulären Matrix in Kontakt treten (*Antoni et al., 2015*). Dieser Aspekt könnte u.a. zur erhöhten Expression des zellmembranständigen uPA-Rezeptors in Sphäroiden beitragen.

In der einschlägigen Literatur sind bisher keine Daten zur mRNA-Expressionsanalyse von Komponenten des Urokinase-Systems in 3D-Zellmodellen hinterlegt. Mehrfach wurde allerdings beschrieben, dass das Zellverhalten und die Genexpression durch den Einsatz von 3D-Sphäroiden modifiziert werden kann (*Hutmacher et al., 2010; Loessner et al., 2010; Antoni et al., 2015*). In diesem Zusammenhang wurde z.B. von *Bellis et al. (2013)* nachgewiesen, dass dreidimensional wachsende Zellen im Vergleich zu 2D-Zellmodellen über verschiedene extrazelluläre Interaktionen mit Stromazellen und der extrazellulären Matrix intrazelluläre Signaltransduktionswege modulieren können, woraus eine zwischen 2D- und 3D-Zellmodellen abweichende Genexpression von Transkriptionsfaktoren (p53, Smad 3/4, SP1) resultierte.

Im Rahmen von Experimenten zur Bestimmung der Inhibition von Tumorinvasion und Metastasierung durch das synthetische *small molecule* WX-UK1, einem 3-Amidinophenylalanin basierten uPA-Inhibitor, wurde die Antigenexpression von uPAR in Zelliniensphäroiden und Monolayerzellen bestimmt (*Ertongur et al., 2004*). Hier zeigte sich sowohl in Zelliniensphäroiden als auch in Monolayerzellen in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie eine unterschiedlich hohe Antigenexpression von uPAR. Je höher sowohl im 2D- als auch im 3D-Zellmodell die uPAR-Antigenexpression war, desto höher war gleichzeitig die Invasionskapazität, welche durch Zugabe von WX-UK1 reduziert werden konnte. Zudem wurde in diesem Experiment dargestellt, dass die uPAR-Antigenexpression, sowohl in 2D- als auch in 3D-Zellmodellen, von der verwendeten Zelllinie abhängig war (*Ertongur et al., 2004*). Ähnlich sollte es sich folglich auch mit der Genexpression verhalten. Jede kommerziell erhältliche Zelllinie weist unterschiedliche tumorbiologische Charakteristika auf. Die Zelllinien unterscheiden sich je nach Ursprung in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit, Morphologie und Invasivität. Zudem weisen die einzelnen Zelllinien eine unterschiedliche Proteinexpression (z.B. p53) und ein abweichendes Rezeptormuster

(z.B. EGF, HER2, Hormonrezeptorstatus) auf ihrer Zelloberfläche auf. Die elf analysierten Zelllinien bilden somit ein sehr breites Spektrum an individuellen tumorbiologischen Eigenschaften ab, sodass sich die einzelnen Zelllinien nur eingeschränkt miteinander vergleichen lassen können. Unter diesem Gesichtspunkt sind sicherlich auch die in den verschiedenen Zellliniensphäroiden generierten sehr heterogenen Expressionsprofile der einzelnen Zielgene zu betrachten.

Weiterhin zeigte sich in den durchgeführten Expressionsanalysen kein tumorspezifisches Expressionsmuster. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde die Chemosensitivität von Sphäroiden, generiert aus Tumorgewebe (Kolonkarzinom), mit der Chemosensitivität von Zellliniensphäroiden und Zellliniensphäroiden, kokultiviert mit Fibroblasten, untersucht (*Hoffmann et al., 2015*). Die fünf verwendeten Zelllinien waren Kolonkarzinomzelllinien (CaCo-2, DLD-1, Colo205, HT29, HCT116). Selbst bei den Zellliniensphäroiden, die alle einem Tumortyp entstammten (Kolonkarzinom), zeigte sich ein sehr heterogenes Ansprechen auf die Chemotherapeutika 5-Fluorouracil und Oxaliplatin bzw. Irinotecan. Dies deutet auf ein sehr heterogenes tumorbiologisches Verhalten innerhalb einer Gruppe von Zelllinien derselben Tumorentität hin, was sicherlich auch auf Genexpressionsanalysen zutreffend ist.

Zukünftige Experimente sollten neben dem Vergleich von 2D- und 3D-Zellmodellen auch die Zellzusammensetzung beachten. Zellliniensphäroide scheinen ein anderes tumorbiologisches Verhalten aufzuweisen als z.B. Sphäroide, co-kultiviert mit Fibroblasten, bzw. Gewebesphäroide. Für die bestmögliche Imitation des *in vivo* Tumorgeschehens eignen sich sicherlich Sphäroide, generiert aus Tumorgewebe, da sie die ursprüngliche Tumorarchitektur am besten widerspiegeln. Zudem wäre in weiteren Experimenten das Genexpressionsmuster von Komponenten des Urokinase-Systems vergleichend in verschiedenen Sphäroid-Modellen zu untersuchen. In drei Mammakarzinomzelllinien (MCF-7, MDA-MB-231, SKBR3) wurden erst kürzlich 46 unterschiedliche Protokolle zur Sphäroidgenerierung analysiert, darunter die Hanging-Drop-Methode und die Liquid-Overlay-Methode (*Froehlich et al., 2016*). Während MCF-7 Zellen nahezu unter allen Bedingungen Sphäroide formten, haben MDA-MB-231 Zellen nur in der Liquid-Overlay-Technik unter Zusatz von 3,5% Matrigel Sphäroide gebildet. SKBR3 Zellen formten unter den in dieser Studie angewandten Bedingungen keine Sphäroide (*Froehlich et al., 2016*). Beispielhaft ist in dieser Studie zu sehen, dass jede Zelllinie aufgrund unterschiedlicher tumorbiologischer Charakteristika ein anderes Verhalten in der Sphäroidbildung zeigt. Dieses individuelle Verhalten einer einzelnen Zelllinie hinsichtlich der Sphäroidbildung könnte auch auf Expressionsanalysen übertragbar sein.

4.3. Kooperationsprojekt mit dem Institute of Health and Biomedical Innovation, Brisbane

2010 wurde von Loessner und Mitarbeiter gezeigt, dass 3D-Sphäroide aus OVMZ-6 Zellen im Vergleich zu 2D-Monolayerzellen eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Paclitaxel aufweisen (Loessner et al., 2010). Nach einer Paclitaxelbehandlung konnte in 3D-Sphäroiden eine Zellvitalität von 40-60% nachgewiesen werden, während in 2D-Monolayerzellen nach Paclitaxelbehandlung eine Zellvitalität von 20% zu finden waren (Loessner et al., 2010). In einer nachfolgenden Untersuchung im 2D-Zellmodell wurde im Vergleich zu Vektorkontrollzellen eine erhöhte Paclitaxelresistenz in KLK4-7 überexprimierenden OVMZ-6 Zellen beobachtet (Loessner et al., 2012). Bereits ein Jahr später konnte in KLK4-7 überexprimierenden Sphäroiden (im Vergleich zu KLK4-7 überexprimierenden OVMZ-6 Monolayerzellen) eine erhöhte Paclitaxelresistenz nachgewiesen werden (Loessner et al., 2013). Paclitaxel wird nach wie vor in der Chemotherapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms eingesetzt. Im Ovarialkarzinom sind nach Loessner et al. (2013) 12 der insgesamt 15 bekannten KLKs hochreguliert. Von diesen 12 hochregulierten KLKs sind KLK4-7 mit einer schlechten Krankheitsprognose verbunden. Erhöhte Serumspiegel von KLK4-7 sind mit einem reduzierten Ansprechen auf Paclitaxel verbunden (Loessner et al., 2013). KLK4-7 könnte sich somit möglicherweise als potenter diagnostischer Indikator und prognostischer Biomarker im fortgeschrittenen Ovarialkarzinom etablieren (Loessner et al., 2013).

KLK4-7 co-transfizierte OVMZ-6 Zellen bilden eingebettet in einer biomimetischen 3D-Hydrogelmatrix größere Sphäroide als 3D-Vektorkontrollzellen (Loessner et al., 2013). Zusätzlich weisen KLK4-7 co-transfizierte Sphäroide im Vergleich zur 3D-Vektorkontrolle eine erhöhte Proliferation und ein gesteigertes Invasionspotential auf (Loessner et al., 2013). Die Autoren vermuten, dass eine erhöhte KLK4-7 Expression in Sphäroiden über ein Zusammenspiel mit Integrinen und der MAP-Kinase Signalkaskade das maligne Tumorverhalten in Richtung Zellproliferation und Invasion lenken könnte (Loessner et al., 2013). Im Zusammenhang mit Tumorinvasion und Tumorprogression spielt neben den Kallikrein-ähnlichen Peptidasen auch das Urokinase-System eine wichtige Rolle. Im Rahmen dieses Kooperationsprojektes wurde untersucht, ob eine Überexpression von KLK4-7 die Expression von Komponenten des uPA-Systems beeinflusst.

Auf mRNA Ebene konnte in den durchgeführten Genexpressionsanalysen in KLK4-7 überexprimierenden OVMZ-6 Zellen im Vergleich zur Vektorkontrolle bei PAI-1 und uPAR eine signifikant höhere Expression gezeigt werden, bei PAI-1 in 2D- Mono-

layerzellen und 3D-Sphäroiden, bei uPAR nur in 3D-Sphäroiden (Abb. 23). Die Expression von uPA und Rab31 blieb unbeeinflusst von einer KLK4-7 Überexpression (Abb. 23). Analog zu den Genexpressionsanalysen aus den Liquid-Overlay-Sphäroiden war uPAR-del4/5 weder im 2D- und 3D-Zellmodell, noch in KLK4-7 überexprimierenden OVMZ-6 Zellen bzw. RSV-Vektorkontrollzellen exprimiert. Rab31 wurde auf einem sehr niedrigen Niveau exprimiert und scheint daher unabhängig von der KLK4-7 Überexpression zu sein. Da ein enger tumorbiologischer Zusammenhang von Rab31 und uPAR-del4/5 vermutet wird, könnte eine niedrige Rab31 Expression auch mit einer niedrigen bis fehlenden Expression von uPAR-del4/5 zusammenhängen (Grismayer et al., 2012; Chua und Tang, 2015).

In der Literatur gibt es bisher keine Untersuchungen zur Genexpression von Komponenten des Urokinase-Systems in KLK4-7 überexprimierenden Sphäroiden. In den hier durchgeführten Experimenten ist zu erkennen, dass in Sphäroiden mit einer KLK4-7 Überexpression einzelne Faktoren des Urokinase-Systems höher exprimiert sind als in 2D-Vektorkontrollzellen. Dies wäre u.a. vereinbar mit dem Aspekt, dass das extrazelluläre Tumor-Mikromilieu in 3D-Sphäroiden besser dargestellt wird als in 2D-Monolayerzellen, zumal das Urokinase-System ein vorwiegend extrazelluläres Protease-System ist. Ob eine KLK4-7 Überexpression die Genexpression von Komponenten des Urokinase-Systems beeinflusst, könnte zudem durch den Einsatz von Hemmstoffen gegen KLK4, 5, 6 und 7 evaluiert werden. Unter Verwendung von spezifischen KLK4-7 Inhibitoren könnte getestet werden, ob sich hierdurch die Expression von beispielsweise PAI-1 und uPAR verändert, denn gerade diese beiden Faktoren scheinen in den hier durchgeführten Expressionsanalysen von einer KLK4-7 Überexpression beeinflusst zu sein. Die Kallikrein-ähnlichen Peptidasen stellen eine interessante molekulare Zielstruktur in der Entwicklung spezifischer Therapien dar. Gerade im Prostatakarzinom und bei verschiedenen Hauterkrankungen sind KLKs Gegenstand der Entwicklung KLK-basierter Therapien (Avgeris und Scorilas, 2016).

Um die Ergebnisse des verwendeten matrixbasierten Sphäroidmodells hinsichtlich der Übertragbarkeit auf das *in vivo* Tumorgeschehen bewerten zu können, wäre ein Vergleich von verschiedenen Sphäroidtechnologien interessant. In zukünftigen Untersuchungen könnten z.B. Sphäroide aus KLK4-7 co-transfizierten OVMZ-6 Zellen untersucht werden, die nach der Liquid-Overlay-Technik gebildet wurden. Weiterhin wäre zu evaluieren, ob eine gleichzeitige Überexpression von KLK4-7 und PAI-1 bzw. uPAR einen additiven Effekt auf Tumorpheriferation bzw. Tumordinvasion und Chemosensitivität hinsichtlich Paclitaxel hat.

4.4. Die SpheroNeo-Studie: Etablierung des Sphäroid-Mikrotumormodells als Prädiktor für das Ansprechen einer medikamentösen Tumortherapie im Mammakarzinom?

In der medikamentösen Therapie des Mammakarzinoms sind aktuell verschiedene Kombinationstherapien zugelassen (Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Aktualisierung 2012). Neoadjuvant werden Kombinationen mit Epirubicin/Cyclophosphamid (EC) und Docetaxel (D) sowie das FEC-Schema mit 5-Fluorouracil, Epirubicin und Cyclophosphamid angewandt. Eine gezielte Patientenstratifizierung zur Auswahl des individuell effektivsten Behandlungsregimes stellt nach wie vor eine große Herausforderung in der Therapie des Mammakarzinoms dar. Nach Abschluss einer mehrzyklischen neoadjuvanten Chemotherapie (primäre systemische Therapie, PST) erfolgt eine operative Tumor-entfernung. Aus dem operativ gewonnenen Gewebematerial wird der histopathologische Remissionsgrad bestimmt, welcher das klinische Therapieergebnis der neoadjuvanten Chemotherapie darstellt. Trotz der in vielen Studien getesteten Therapievariationen (unterschiedliche Auswahl von Chemotherapeutika, Anwendung in Mono- oder Kombinationstherapien, Dosismodulierungen) blieb die Rate der pathologischen Komplettremissionen (pCR) in den letzten Jahren bei einem konstant niedrigen Prozentsatz von 20-30% (Halfter et al., 2015). Die pCR gilt beim Mammakarzinom als zuverlässiger Surrogatmarker für ein progressionsfreies Überleben und für das Gesamtüberleben (Halfter et al., 2015). Bei HER2-positiven Mammakarzinompatienten konnte mit einer Kombination aus klassischer Chemotherapie und dem monoklonalen anti-HER2 Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) die pCR auf bis zu 66,7% angehoben werden (Halfter et al., 2015). Jedoch sind insgesamt nur etwa 20-25% der neudiagnostizierten Mammakarzinompatienten HER2 positiv. Von dieser Subpopulation wiederum zeigen 40-50% eine Resistenz auf die zielgerichtete Trastuzumabtherapie, sowohl in der Mono- als auch in der Kombinationstherapie mit Taxanen (Pohlmann et al., 2009; Gschwantler-Kaulich et al., 2017). Um die Therapieerfolge nicht nur bei HER2-positiven Patienten, sondern auch in den übrigen 75-80% der Mammakarzinompatienten zu maximieren, bedarf es neuer diagnostischer Tools, die unter Angabe der effektivsten Therapieoption treffsicher und individuell den Therapieerfolg einer klassischen Chemo- und/oder anti-HER2-Therapie voraus-sagen können.

In der SpheroNeo-Studie (*spheroids for the prediction of neoadjuvant chemotherapy*) wurde mittels aus Brustkrebsgewebe generierten Sphäroiden, auch Sphäroid-Mikrotumormodell genannt, die Prädiktivität für das Ansprechen einer neoadjuvanten

Chemotherapie untersucht (Halfter et al., 2015). Tabelle 16 zeigt die klinisch-pathologischen Charakteristika der SpheroNeo-Kohorte (n=78).

Bis auf zwei Patienten erhielten alle Studienteilnehmer eine Taxan-basierte Chemotherapie, kombiniert mit einem Anthrazyklin oder Carboplatin. Alle HER2-positiven Patienten wurden zusätzlich mit Trastuzumab therapiert (21,3%). Von 78 Studientpatienten erreichten 22 (28,2%) eine pathologische Komplettremission. Dieser Prozentsatz entspricht den Ergebnissen aus vorherigen Studien, in denen Patienten ebenso eine Anthrazyklin/Taxan-basierte Kombinationstherapie erhielten (Halfter et al., 2015). Wie erwartet war die pCR-Rate bei jüngeren Patienten sowie bei Patienten mit negativem Hormonrezeptor-Status und positivem HER2-Status höher. Eine Therapieunterbrechung, Dosisreduktion bzw. Veränderung des Therapieplans wurde als Non-Adhärenz bezeichnet. Dies war bei 18 von 78 Studienteilnehmern der Fall und resultierte in einer niedrigeren pCR-Rate (Tab. 16). Aus den Gewebeproben wurden unmittelbar nach der Gewinnung in Liquid-Overlay-Technik Sphäroide geformt. Aufgrund der Heterogenität des Patientengewebes variierten die Tumorsphäroide sehr stark in Größe und Morphologie. Die Sphäroidgröße und Morphologie waren abhängig von der Zellzahl pro Sphäroid und der Zellzusammensetzung. Die Sphäroidmorphologie wurde als *compact*, *intermediate* oder *loose* definiert und war, ausgenommen des Tumor-Gradings, unabhängig von klinischen Parametern wie cT-Stadium, Alter des Patienten, Lymphknotenstatus, Hormonrezeptor- bzw. HER2-Status. Das Tumor-Grading hingegen war signifikant mit der Ausbildung von spezifischen Sphäroidmorphologien assoziiert ($p = 0.009$). Höhergradige Tumore tendierten zur Ausbildung von weniger kompakten Sphäroiden, während niedriggradige Tumore kompaktere Zellaggregate formten (Halfter et al., 2015).

In vitro zeigte sich im Sphäroidmodell bei den Patienten mit pCR ein durchschnittliches Zellüberleben von 21,8% versus 63,8% bei Patienten mit non-pCR. Zur Vorhersage der pathologischen Komplettremission durch das Sphäroidmodell wurde die Fläche unter der ROC-Kurve (*receiver operating characteristic curve*, Grenzwertoptimierungskurve) bestimmt. Diese lag für das *in vitro* Zellüberleben bei 0,86 (95% Konfidenzintervall: 0,77-0,96), verglichen mit 0,80 (95% Konfidenzintervall: 0,70-0,90) für ein Kombinationsmodell unter Berücksichtigung von Alter, Hormon- und HER2-Rezeptorstatus. Ohne Berücksichtigung von klinischen Parametern konnte das Sphäroid-Mikrotumormodell demnach ein *in vivo* Therapieansprechen mit einer Wahrscheinlichkeit von 86% vorhersagen (Halfter et al., 2015).

Characteristics	All Patients		pCR				P
	n	%	Yes		No		
	n	%	n	%	n	%	
All Patients	78	100	22	28.2	56	71.8	
Age at diagnosis, years							.207
≤50	43	55.1	15	34.9	28	65.1	
>50	35	44.9	7	20.0	28	80.0	
Mean	51	21 - 78	46	21 - 65	53	25 - 78	.029
Range							
Tumor stage							.779
cT1/T2	56	72.7	16	28.6	40	71.4	
cT3/4	21	27.3	5	23.8	16	76.2	
Not documented	1	-					
Nodal status							1.000
cN+	42	54.5	12	28.6	30	71.4	
cN-	35	45.5	10	28.6	25	71.4	
Not documented	1	-					
Grading							.123
G1/2	41	53.9	8	19.5	33	80.5	
G3	35	46.1	13	37.1	22	62.9	
Not documented	2	-					
Histologic type							.449
Invasive ductal/other	70	89.7	21	30.0	49	70.0	
Invasive lobular	8	10.0	1	12.5	7	87.5	
HR status							.001
ER+/PR+	39	52.0	4	10.3	35	89.7	
ER+/PR-/Unknown	10	13.3	7	70.0	3	30.0	
ER-/unknown/PR+	2	2.7	1	50.0	1	50.0	
ER-/PR-	24	32.0	9	37.5	15	62.5	
Not documented	3	-					
HER2 status							.001
Negative	59	78.7	11	18.6	48	81.4	
Positive	16	21.3	10	62.5	6	37.5	
Not documented	3	-					
Drug Therapy							.001
AC → T	57	71.8	11	19.3	46	80.7	
AC → TH	9	11.5	8	88.9	1	11.1	
TCbH	7	9.0	2	28.6	5	71.4	
AC → TCb	3	3.8	1	33.3	2	66.7	
AC	2	3.6	0	0.0	2	100.0	
Treatment adherence							.018
Yes	60	76.9	21	35.0	39	65.0	
No	18	23.1	1	5.6	17	94.4	

Tabelle 16: Klinisch-pathologische Charakteristika der SpheroNeo-Kohorte (n=78) mit Angabe der pCR-Raten. pCR: pathologische Komplettremission, HR: Hormonrezeptor, ER: Estrogen-Rezeptor, PR: Progesteron-Rezeptor, HER2: *human epidermal growth factor receptor 2*, A: Anthrazyklin, C: Cyclophosphamid, T: Taxan (Paclitaxel oder Docetaxel), H: Herceptin® (Trastuzumab), Cb: Carboplatin (aus Halfter et al., 2015).

Bei einem definiertem Cut-off von 35% Zellüberlebensrate konnte, bezogen auf die tatsächliche pCR-Rate, das Sphäroid-Mikrotumormodell eine Sensitivität von 95,5% (95% Konfidenzintervall: 0,86-1,00) und eine Spezifität von 80,4% (95% Konfidenzintervall: 0,70-0,91) erreichen. Anhand dieser Ergebnisse hat sich das Sphäroid-Mikrotumormodell als sensitiver und spezifischer Prädiktor einer pathologischen Komplettremission nach neoadjuvanter Chemotherapie im Mammakarzinom erwiesen. Das Sphäroidmodell scheint zudem nicht nur prädiktiv, sondern auch selektiv für die Auswahl von effektiven Therapieoptionen zu sein (Halfter et al., 2015).

In der vorliegenden Arbeit wurden Ergebnisse der *in vitro* Wirkstofftestung von Patientenproben gezeigt, die an der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar rekrutiert, aber nicht in die SpheroNeo-Studie eingeschlossen wurden. Die Gewebesphäroide der 17 exkludierten Mammakarzinompatienten zeigten insgesamt ein sehr inhomogenes Ansprechen auf die verwendeten Chemotherapeutika (Tab. 15). Bereits in diesem kleinen Patientenkollektiv (n=17) lässt sich ein sehr individuelles Ansprechen auf die Leitlinientherapie mit Epirubicin und Cyclophosphamid erkennen (Abb. 24A). Die Monotherapie mit Docetaxel zeigte bei insgesamt sieben behandelten Gewebeproben eine breite Therapieresistenz (Abb. 24B). Weder bei den mit Epirubicin/Cyclophosphamid noch mit Docetaxel behandelten Patientenproben wurde eine Kombinationsbehandlung von Epirubicin/Cyclophosphamid und Docetaxel durchgeführt. Hierbei hätten etwaige additive Effekte von Epirubicin/Cyclophosphamid und Docetaxel beurteilt werden können. Aufgrund von Gewebemangel konnten keine weiteren Therapien getestet werden. Ein häufiges Ausschlusskriterium war auch in der SpheroNeo-Studie das Vorhandensein von zu wenig Tumormaterial bzw. vitalen Tumorzellen in der Stanzbiopsie. Dadurch konnte nur eine minimale Anzahl an Sphäroiden generiert werden, die folglich meist nur eine Wirkstofftestung erlaubten. Um mindestens drei verschiedene Kombinationstherapien testen zu können waren vier Gewebebiopsien mit einem Durchschnittsgewicht von 89,6 mg (10,5-353,4 mg) erforderlich. Bei lediglich sechs von 78 eingeschlossenen Patientenproben konnte mehr als eine Therapiekombination getestet werden (Halfter et al., 2015). Wie auch in der SpheroNeo-Studie beobachtet, ist das sehr unterschiedliche intra- und interindividuelle Ansprechen auf verschiedene Chemotherapeutika in dem hier gezeigten exkludierten Patientenkollektiv mitunter auf die bestehende *in vivo* Tumorerheterogenität zurückzuführen. Gerade in diesem Zusammenhang ist es umso wichtiger ein präklinisches *in vitro* Testmodell zu etablieren, das das Ansprechen einer Chemotherapie bereits *in vitro* bestmöglich vorhersagen kann. Dadurch könnten überflüssige und nebenwirkungsreiche Therapien vermieden werden.

In der SpheroNeo-Studie konnte zudem bestätigt werden, dass das Brustkrebs-Sphäroidmodell auch eine Prädiktivität hinsichtlich des Ansprechens einer Kombinationstherapie mit Trastuzumab zeigt. Die Ergebnisse der *in vitro* Wirkstofftestung

mit Trastuzumab waren mit dem histopathologischen HER2-Status vereinbar. Zeigte die *in vitro* Kombinationstherapie mit Trastuzumab keinen zusätzlichen Nutzen, so wiesen die Gewebeproben auch einen negativen HER2-Status auf (n=5) (Halfter et al., 2015). In dem hier dargestellten exkludierten Patientenkollektiv wurden drei Gewebeproben (Pat.-ID 1, 9, 12) in einer Kombinationstherapie mit Trastuzumab behandelt (Tab. 15). Alle Gewebeproben zeigten *in vitro* durch Trastuzumab kein verbessertes Therapieansprechen. Histopathologisch waren diese drei Patienten HER2 negativ, sodass das Therapieansprechen von Trastuzumab *in vitro* mit dem histopathologischen Ergebnis übereinstimmte (Abb. 26). Die Patientenprobe 14 wurde nur mit TCH behandelt, sodass hier der mögliche Einfluss von Trastuzumab auf das Therapieansprechen nicht beurteilt werden konnte. Anzumerken ist, dass alle hier mit Trastuzumab behandelten Gewebeproben ausschließlich HER2 negativ waren. Da 40-50% der HER2-positiven Brustkrebspatienten nicht auf Trastuzumab ansprechen, könnte zur Vermeidung von überflüssigen Therapien im SpheroTest ein großes selektives Potential liegen (Gschwantler-Kaulich et al., 2017).

Mit der zunehmenden Anzahl an verfügbaren Chemotherapeutika und Kombinationsmöglichkeiten erhöhen sich die potentiellen Therapieoptionen für jeden einzelnen Patienten. Mit Hilfe des SpheroTests lässt sich ein präklinisches Modell etablieren, das *in vitro* die bestmögliche Therapie für jeden individuellen Patienten selektieren kann, unter gleichzeitiger Vorhersage von unerwünschten Therapieresistenzen. Um *in vitro* verschiedene Therapiemöglichkeiten testen zu können, stand im Rahmen der SpheroNeo-Studie oftmals nicht ausreichend Tumorgewebe zur Verfügung. Aktuell wird deshalb die Prädiktivität des Sphäroid-Mikrotumormodells für das Ansprechen einer adjuvanten Chemotherapie im Ovarialkarzinom untersucht, da beim Ovarialkarzinom im Vergleich zum Mammakarzinom mehr vitales Tumorgewebe verfügbar ist. Um die Ergebnisse der nicht-interventionellen SpheroNeo-Studie zu validieren, ist von SpheroTec[®] eine Interventionsstudie mit größerem Patientenkollektiv geplant. Mit dem Ziel der Umsetzung einer individualisierten und personalisierten Tumorthherapie könnte das Sphäroid-Mikrotumormodell langfristig im klinischen Alltag als präklinisches diagnostisches Instrument eingesetzt werden.

5. Zusammenfassung

Multizelluläre Sphäroide sind dreidimensionale Zellaggregate, die die Komplexität und Heterogenität des *in vivo* Tumor-Mikromilieus eher widerspiegeln als 2D-Zellmodelle. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob bei ausgewählten Komponenten des Urokinase-Systems Genexpressionsunterschiede zwischen 2D-Monolayerzellen und 3D-Sphäroiden zu identifizieren sind. Zunächst wurde RNA aus Monolayerzellen und Zellliniensphäroiden isoliert und deren Qualität und Quantität spektralphotometrisch bestimmt. Nach reverser Transkription der RNA zur cDNA wurde durch Genexpressionsanalyse der Referenzgene HMBS und HPRT1 (TaqMan *real time* PCR) die Qualität der generierten cDNA bestimmt. Mittels LightCycler *real time* PCR wurde anschließend die Genexpressionsanalyse der sechs Zielgene uPA, PAI-1, uPAR, uPAR-del4/5, Rab31 und KLK7 durchgeführt.

In Vorversuchen konnte in den Zelllinien CaCo-2 und Hs746T im 2D- und 3D-Zellmodell aus 50.000 Zellen reproduzierbar RNA isoliert werden. In elf Zelllinien vier verschiedener Tumorentitäten (Mamma-, Ovarial-, Magen-, kolorektales Karzinom) zeigten die sechs analysierten Zielgene in 15 Expressionsmustern in 3D-Sphäroiden eine deutlich höhere Expression als in 2D-Monolayerzellen. uPAR war in sechs Zelllinien in 3D überexprimiert (HCC1143, OVCAR-3, SKOV-3, N87, CaCo-2, HCT116), Rab31 in vier Zelllinien (SKOV-3, Hs746T, CaCo-2, HCT116), PAI-1 in drei Zelllinien (N87, CaCo-2, HT29) und KLK7 in zwei Zelllinien (OVCAR-3, N87). Im 2D-Zellmodell waren lediglich PAI-1 in der Zelllinie SKBR3 und uPA in der Zelllinie SKOV-3 überexprimiert. Es konnten keine tumor- bzw. biomarkerspezifischen Expressionsmuster identifiziert werden. Genexpressionsanalysen in Gewebesphäroiden aus dem Ovarial- und kolorektalen Karzinom konnten nicht durchgeführt werden, da bereits die RNA-Isolierung nicht zufriedenstellende Ergebnisse zeigte.

Im Kooperationsprojekt mit dem Institute of Health and Biomedical Innovation, Brisbane wurde in KLK4-7 überexprimierenden OVMZ-6 Zellen das Genexpressionsmuster von uPA, PAI-1, uPAR, Rab31 und uPAR-del4/5 im Vergleich von 2D- und 3D-Zellmodell untersucht. PAI-1 und uPAR zeigten in KLK4-7 überexprimierenden OVMZ-6 Zellen im Vergleich zur Vektorkontrolle eine Überexpression, bei PAI-1 im 2D- und 3D-Zellmodell, bei uPAR nur im 3D-Zellmodell.

In der SpheroNeo-Studie hat sich das *in vitro* Sphäroid-Mikrotumormodell als sensitiver und spezifischer Prädiktor einer pathologischen Komplettremission in der neoadjuvanten Therapie des Mammakarzinoms erwiesen (Halfter *et al.*, 2015). Die

Ergebnisse der *in vitro* Wirkstofftestung von 17 Gewebeproben, die am Klinikum rechts der Isar rekrutiert, aber nicht in die SpheroNeo-Studie eingeschlossen wurden, zeigten analog zur *in vivo* Tumorerogenität ein sehr unterschiedliches Therapieansprechen auf die von SpheroTec[®] durchgeführten, leitliniengerechten Therapietests. Das *in vitro* Ansprechen auf den HER2-Inhibitor Trastuzumab (Herceptin[®]) stimmte mit dem histopathologischen HER2-Status überein. Um eine individualisierte Tumorthherapie umzusetzen, könnte das Sphäroid-Mikrotumormodell langfristig im klinischen Alltag als präklinisches diagnostisches Instrument eingesetzt werden.

Zusammenfassend stellen 3D-Zellmodelle ein innovatives Instrument in der Tumorforschung dar, da sie das *in vivo* Tumorgeschehen bestmöglich imitieren können. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten ersten Hinweise auf eine Überexpression von Faktoren des Urokinase-Systems im 3D-Zellmodell müssen in weiterführenden Experimenten reevaluiert werden, insbesondere im Hinblick auf Zellzusammensetzung der eingesetzten Sphäroide.

6. Literaturverzeichnis

Ahlfen von S, Schlumpberger M. Effects of low A_{260}/A_{230} ratios in RNA preparations on downstream applications. In: Qiagen Gene Expression Newsletter Issue 15/10, Seite 7. Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland, 2010.

Andreasen PA, Kjøller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer*, 72:1-22, 1997.

Antoni D, Burckel H, Josset E, Noel G. Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *Int J Mol Sci*, 16:5517-27, 2015.

Astedt B, Holmberg L. Immunological identity of urokinase and ovarian carcinoma plasminogen activator released in tissue culture. *Nature*, 261:595-7, 1976.

Astrup T, Permin PM. Fibrinolysis in the animal organism. *Nature*, 159:681, 1947.

Avgeris M, Scorilas A. Kallikrein-related peptidases (KLKs) as emerging therapeutic targets: focus on prostate cancer and skin pathologies. *Expert Opin Ther Targets*, 20:801-18, 2016.

Baker JB, Low DA, Simmer RL, Cunningham DD. Protease-nexin: a cellular component that links thrombin and plasminogen activator and mediates their binding to cells. *Cell*, 21:37-45, 1980.

Beaufort N, Plaza K, Utschneider D, Schwarz A, Burkhart JM, Creutzburg S, Debela M, Schmitt M, Ries C, Magdolen V. Interdependence of kallikrein-related peptidases in proteolytic networks. *Biol Chem*, 391:581-7, 2010.

Bellis AD, Bernabé BP, Weiss MS, Shin S, Weng S, Broadbelt LJ, Shea LD. Dynamic transcription factor activity profiling in 2D and 3D cell cultures. *Biotechnol Bioeng*, 110:563-72, 2013.

Biermann JC, Holzscheiter L, Kotsch M, Luther T, Kiechle-Bahat M, Sweep FC, Span PN, Schmitt M, Magdolen V. Quantitative RT-PCR assays for the determination of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 mRNA in primary tumor tissue of breast cancer patients: comparison to antigen quantification by ELISA. *Int J Mol Med*, 21:251-9, 2008.

- Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*, 1:46-54, 2001.
- Blasi F, Sidenius N. The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling. *FEBS Lett*, 584:1923-30, 2010.
- Brattain MG, Marks ME, McCombs J, Finely W, Brattain DE. Characterization of human colon carcinoma cell lines isolated from a single primary tumour. *Br J Cancer*, 47:373-81, 1983.
- Brattsand M, Stefansson K, Lundh C, Haasum Y, Egelrud T. A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. *J Invest Dermatol*, 124:198-203, 2005.
- Brodsky SV, Malinowski K, Golightly M, Jesty J, Goligorsky MS. Plasminogen activator inhibitor- 1 promotes formation of endothelial microparticles with procoagulant potential. *Circulation*, 106:2372–2378, 2002.
- Bugge TH, Flick MJ, Danton MJ, Daugherty CC, Romer J, Dano K, Carmeliet P, Collen D, Degen JL. Urokinase-type plasminogen activator is effective in fibrin clearance in the absence of its receptor or tissue-type plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:5899-904, 1996.
- Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25:169-93, 2000.
- Cailleau R, Young R, Olivé M, Reeves WJ Jr. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst*, 53:661-74, 1974.
- Casey JR, Petranka JG, Kottra J, Fleenor DE, Rosse WF. The structure of the urokinase-type plasminogen activator receptor gene. *Blood*, 84:1151-6, 1994.
- Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol*, 129:307-21, 2005.
- Chua CE, Tang BL. The role of the small GTPase Rab31 in cancer. *J Cell Mol Med*, 19:1-10, 2015.
- Conese M, Blasi F. The urokinase/urokinase-receptor system and cancer invasion. *Baillieres Clin Haematol*, 8:365-89, 1995.
- Crippa MP. Urokinase-type plasminogen activator. *Int J Biochem Cell Biol*, 39:690-4, 2007.

Croucher DR, Saunders DN, Lobov S, Ranson M. Revisiting the biological roles of PAI2 (SERPINB2) in cancer. *Nat Rev Cancer*, 8:535-45, 2008.

Danø K, Andreasen PA, Grøndahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res*, 44:139-266, 1985.

De Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, Swinkels DW, Span PN. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest*, 85:154-9, 2005.

Dong Y, Loessner D, Sieh S, Taubenberger A, Fuhrmann-Luck RA, Magdolen V, Hutmacher DW, Clements JA. Cellular model systems to study the tumor biological role of kallikrein-related peptidases in ovarian and prostate cancer. In: Kallikrein-related peptidases: novel cancer-related biomarkers. Magdolen V, Sommerhoff CP, Fritz H, Schmitt M (Hrsg.). De Gruyter Verlag. Berlin. 1. Auflage, 83-110, 2012.

Dong Y, Loessner D, Irving-Rodgers H, Obermair A, Nicklin JL, Clements JA. Metastasis of ovarian cancer is mediated by kallikrein related peptidases. *Clin Exp Metastasis*, 31:135–147, 2014.

Dorn J, Harbeck N, Kates R, Gkazepis A, Scorilas A, Soosaipillai A, Diamandis E, Kiechle M, Schmalfeldt B, Schmitt M. Impact of expression differences of kallikrein-related peptidases and of uPA and PAI-1 between primary tumor and omentum metastasis in advanced ovarian cancer. *Ann Oncol*, 22:877-83, 2011.

Dorn J, Bronger H, Kates R, Slotta-Huspenina J, Schmalfeldt B, Kiechle M, Diamandis EP, Soosaipillai A, Schmitt M, Harbeck N. OVSCORE - a validated score to identify ovarian cancer patients not suitable for primary surgery. *Oncol Lett*, 9:418-424, 2015.

Duffy MJ, Maguire TM, McDermott EW, O'Higgins N. Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in multiple types of cancer. *J Surg Oncol*, 71:130-5, 1999.

Duffy MJ. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr Pharm Des*, 10:39-49, 2004.

Duffy MJ, Duggan C. The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer. *Clin Biochem*, 37:541-8, 2004.

Duffy MJ, Crown J. A personalized approach to cancer treatment: how biomarkers can help. *Clin Chem*, 54:1770-9, 2008.

Duffy MJ, Harbeck N, Nap M, Molina R, Nicolini A, Senkus E, Cardoso F. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *Eur J Cancer*, 75:284-298, 2017.

Ekholm E, Egelrud T. Stratum corneum chymotryptic enzyme in psoriasis. *Arch Dermatol Res*, 291:195-200, 1999.

Engel LW, Young NA. Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review. *Cancer Research*, 38: 4327–39, 1978.

Ertongur S, Lang S, Mack B, Wosikowski K, Muehlenweg B, Gires O. Inhibition of the invasion capacity of carcinoma cells by WX-UK1, a novel synthetic inhibitor of the urokinase-type plasminogen activator system. *Int J Cancer*, 110:815-24, 2004.

Falkenberg N, Höfig I, Rosemann M, Szumielewski J, Richter S, Schorpp K, Hadian K, Aubele M, Atkinson MJ, Anastasov N. Three-dimensional microtissues essentially contribute to preclinical validations of therapeutic targets in breast cancer. *Cancer Med*, 5:703-10, 2016.

Farthmann J, Holzscheiter L, Biermann J, Meye A, Luther T, Kotzsch M, Sweep F, Schmitt M, Span P, Magdolen V. Development of quantitative RT-PCR assays for wild-type urokinase receptor (uPAR-wt) and its splice variant uPAR-del5. *Radiol Oncol*, 38:111-9, 2004.

Feder-Mengus C, Ghosh S, Reschner A, Martin I, Spagnoli GC. New dimensions in tumor immunology: what does 3D culture reveal? *Trends Mol Med*, 14:333-40, 2008.

Flemmig M, Melzig MF. Serine-proteases as plasminogen activators in terms of fibrinolysis. *J Pharm Pharmacol*, 64:1025-39, 2012.

Fogh J, Wright WC, Loveless JD. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst*, 58:209-14, 1977.

Frankel A, Buckman R, Kerbel RS. Abrogation of taxol-induced G2-M arrest and apoptosis in human ovarian cancer cells grown as multicellular tumor spheroids. *Cancer Res*, 57:2388-93, 1997.

Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge? *Int J Radiat Biol*, 83:849-71, 2007.

Froehlich K, Haeger JD, Heger J, Pastuschek J, Photini SM, Yan Y, Lupp A, Pfarrer C, Mrowka R, Schleußner E, Markert UR, Schmidt A. Generation of Multicellular Breast Cancer Tumor Spheroids: Comparison of Different Protocols. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 21:89-98, 2016.

Fuhrman B. The urokinase system in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 222:8-14, 2012.

Gaedtke L, Thoenes L, Culmsee C, Mayer B, Wagner E. Proteomic analysis reveals differences in protein expression in spheroid versus monolayer cultures of low-passage colon carcinoma cells. *J Proteome Res*, 6:4111-8, 2007.

Geiger M, Huber K, Wojta J, Stingl L, Espana F, Griffin JH, Binder BR. Complex formation between urokinase and plasma protein C inhibitor in vitro and in vivo. *Blood*, 74:722-8, 1989.

Gouri A, Dekaken A, El Bairi K, Aissaoui A, Laabed N, Chefrour M, Ciccolini J, Milano G, Benharkat S. Plasminogen Activator System and Breast Cancer: Potential Role in Therapy Decision Making and Precision Medicine. *Biomark Insights*, 11:105-11, 2016.

Grismayer B, Sölch S, Seubert B, Kirchner T, Schäfer S, Baretton G, Schmitt M, Luther T, Krüger A, Kotzsch M, Magdolen V. Rab31 expression levels modulate tumor-relevant characteristics of breast cancer cells. *Mol Cancer*, 11:62, 2012.

Gschwantler-Kaulich D, Tan YY, Fuchs EM, Hudelist G, Köstler WJ, Reiner A, Leser C, Salama M, Attems J, Deutschmann C, Zielinski CC, Singer CF. PTEN expression as a predictor for the response to trastuzumab-based therapy in Her-2 overexpressing metastatic breast cancer. *PLoS One*, 12:e0172911. doi: 10.1371/journal.pone.0172911, 2017.

Halfter K, Ditsch N, Kolberg HC, Fischer H, Hauzenberger T, von Koch FE, Bauerfeind I, von Minckwitz G, Funke I, Crispin A, Mayer B, Behalf of the SpheroNEO Study Group. Prospective cohort study using the breast cancer spheroid model as a predictor for response to neoadjuvant therapy - the SpheroNEO study. *BMC Cancer*, 15:519, 2015.

Halfter K, Hoffmann O, Ditsch N, Ahne M, Arnold F, Paepke S, Grab D, Bauerfeind I, Mayer B. Testing chemotherapy efficacy in HER2 negative breast cancer using patient-derived spheroids. *J Transl Med*, 14:112, 2016.

Halfter K, Mayer B. Bringing 3D tumor models to the clinic - predictive value for personalized medicine. *Biotechnol J*, doi: 10.1002/biot.201600295. Epub 2017.

Hamilton CT, Young RC, McKoy WM, Grotzinger KR, Green JA, Chu EW, Whang-Peng J, Rogan AM, Green W, Ozols RF. Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH: OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Research*, 43:5379-5389, 1983.

Harbeck N, Kates RE, Gauger K, Willems A, Kiechle M, Magdolen V, Schmitt M. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thromb Haemost*, 91:450-6, 2004.

Harbeck N, Schmitt M, Meisner C, Friedel C, Untch M, Schmidt M, Sweep CG, Lisboa BW, Lux MP, Beck T, Hasmüller S, Kiechle M, Jänicke F, Thomssen C; Chemo-N 0 Study Group. Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients. *Eur J Cancer*, 49:1825-35, 2013.

Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol*, 148:3-15, 2010.

Hoffmann OI, Ilmberger C, Magosch S, Joka M, Jauch KW, Mayer B. Impact of the spheroid model complexity on drug response. *J Biotechnol*, 205:14-23, 2015.

Holzschneider L, Biermann JC, Kotsch M, Prezas P, Farthmann J, Baretton G, Luther T, Tjan-Heijnen VC, Talieri M, Schmitt M, Sweep FC, Span PN, Magdolen V. Quantitative reverse transcription-PCR assay for detection of mRNA encoding full-length human tissue kallikrein 7: prognostic relevance of KLK7 mRNA expression in breast cancer. *Clin Chem*, 52:1070-9, 2006.

Hutmacher DW. Biomaterials offer cancer research the third dimension. *Nat Mater*, 9:90-3, 2010.

Hutmacher DW, Loessner D, Rizzi S, Kaplan DL, Mooney DJ, Clements JA. Can tissue engineering concepts advance tumor biology research? *Trends Biotechnol*, 28:125-33, 2010.

Irigoyen JP, Muñoz-Cánoves P, Montero L, Koziczak M, Nagamine Y. The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci*, 56:104-32, 1999.

Jensen EC. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction to measure mRNA: use, limitations, and presentation of results. *Anat Rec (Hoboken)*, 295:1-3, 2012.

Keydar I, Chen L, Karby S, Weiss FR, Delarea J, Radu M, Chaitcik S, Brenner HJ. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur J Cancer*, 15:659-70, 1979.

Komatsu N, Saijoh K, Kuk C, Liu AC, Khan S, Shirasaki F, Takehara K, Diamandis EP. Human tissue kallikrein expression in the stratum corneum and serum of atopic dermatitis patients. *Exp Dermatol*, 16:513-9, 2007.

Kornberg RD. The molecular basis of eukaryotic transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104:12955-61, 2007.

Kotzsch M, Farthmann J, Meye A, Fuessel S, Baretton G, Tjan-Heijnen VC, Schmitt M, Luther T, Sweep FC, Magdolen V, Span PN. Prognostic relevance of uPAR-del4/5 and TIMP-3 mRNA expression levels in breast cancer. *Eur J Cancer*, 41:2760-8, 2005.

Kotzsch M, Sieuwerts AM, Grosser M, Meye A, Fuessel S, Meijer-van Gelder ME, Smid M, Schmitt M, Baretton G, Luther T, Magdolen V, Foekens JA. Urokinase receptor splice variant uPAR-del4/5-associated gene expression in breast cancer: identification of rab31 as an independent prognostic factor. *Breast Cancer Res Treat*, 111:229-40, 2008.

Kotzsch M, Bernt K, Friedrich K, Luther E, Albrecht S, Gatzweiler A, Magdolen V, Baretton G, Zietz C, Luther T. Prognostic relevance of tumour cell-associated uPAR expression in invasive ductal breast carcinoma. *Histopathology*, 57:461-71, 2010.

Kotzsch M, Magdolen V, Greither T, Kappler M, Bache M, Lautenschläger C, Füssel S, Eckert AW, Luther T, Baretton G, Würfl P, Taubert H. Combined mRNA expression levels of members of the urokinase plasminogen activator (uPA) system correlate with disease-associated survival of soft-tissue sarcoma patients. *BMC Cancer*, 11:273, 2011a.

Kotzsch M, Dorn J, Doetzer K, Schmalfeldt B, Krol J, Baretton G, Kiechle M, Schmitt M, Magdolen V. mRNA expression levels of the biological factors uPAR, uPAR-del4/5, and rab31, displaying prognostic value in breast cancer, are not clinically relevant in advanced ovarian cancer. *Biol Chem*, 392:1047-51, 2011b.

Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB, Hedgpeth J. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res*, 28:655-61, 2000.

Lee JA, Yerbury JJ, Farrarwell N, Shearer RF, Constantinescu P, Hatters DM, Schroder WA, Suhrbier A, Wilson MR, Saunders DN, Ranson M. SerpinB2 (PAI-2) Modulates Proteostasis via Binding Misfolded Proteins and Promotion of Cytoprotective Inclusion Formation. *PLoS One*, 10:e0130136, 2015.

Lilja H. A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J Clin Invest*, 76:1899-903, 1985.

Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J*, 3:1172-84, 2008.

Llinas P, Le Du MH, Gårdsvoll H, Danø K, Ploug M, Gilquin B, Stura EA, Ménez A. Crystal structure of the human urokinase plasminogen activator receptor bound to an antagonist peptide. *EMBO J*, 24:1655-63, 2005.

Loessner D, Stok KS, Lutolf MP, Hutmacher DW, Clements JA, Rizzi SC. Bioengineered 3D platform to explore cell-ECM interactions and drug resistance of epithelial ovarian cancer cells. *Biomaterials*, 31:8494-506, 2010.

Loessner D, Quent VM, Kraemer J, Weber EC, Hutmacher DW, Magdolen V, Clements JA. Combined expression of KLK4, KLK5, KLK6, and KLK7 by ovarian cancer cells leads to decreased adhesion and paclitaxel-induced chemoresistance. *Gynecol Oncol*, 127:569-78, 2012.

Loessner D, Rizzi SC, Stok KS, Fuehrmann T, Hollier B, Magdolen V, Hutmacher DW, Clements JA. A bioengineered 3D ovarian cancer model for the assessment of peptidase-mediated enhancement of spheroid growth and intraperitoneal spread. *Biomaterials*, 34:7389-400, 2013.

Luther T, Kotzsch M, Meye A, Langerholc T, Füssel S, Olbricht N, Albrecht S, Ockert D, Muehlenweg B, Friedrich K, Grosser M, Schmitt M, Baretton G, Magdolen V. Identification of a novel urokinase receptor splice variant and its prognostic relevance in breast cancer. *Thromb Haemost*, 89:705-17, 2003.

Mason SD, Joyce JA. Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol*, 21:228-37, 2011.

Mayer B, Klement G, Kaneko M, Man S, Jothy S, Rak J, Kerbel RS. Multicellular gastric cancer spheroids recapitulate growth pattern and differentiation phenotype of human gastric carcinomas. *Gastroenterology*, 121:839-852, 2001.

Mazar AP. Urokinase plasminogen activator receptor choreographs multiple ligand interactions: implications for tumor progression and therapy. *Clin Cancer Res*, 14:5649-55, 2008.

Mekkawy AH, Pourgholami MH, Morris DL. Involvement of urokinase-type plasminogen activator system in cancer: an overview. *Med Res Rev*, 34:918-56, 2014.

Miller BE, Miller FR, Heppner GH. Factors affecting growth and drug sensitivity of mouse mammary tumor lines in collagen gel cultures. *Cancer Res*, 45:4200-5, 1985.

Mitra S, Cheng KW, Mills GB. Rab GTPases implicated in inherited and acquired disorders. *Semin Cell Dev Biol*, 22:57-68, 2011.

Möbus V, Gerharz CD, Press U, Moll R, Beck T, Mellin W, Pollow K, Knapstein PG, Kreienberg R. Morphological, immunohistochemical and biochemical characterization of 6 newly established human ovarian carcinoma cell lines. *Int J Cancer*, 52:76-84, 1992.

Montuori N, Pesapane A, Rossi FW, Giudice V, De Paulis A, Selleri C, Ragno P. Urokinase type plasminogen activator receptor (uPAR) as a new therapeutic target in cancer. *Transl Med UniSa*, 15:15-21, 2016.

Moscona A, Moscona H. The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *J Anat*, 86:287-301, 1952.

Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, 10:515-27, 2006.

Nitsche A, Steuer N, Schmidt CA, Landt O, Siegert W. Different real-time PCR formats compared for the quantitative detection of human cytomegalovirus DNA. *Clin Chem*, 45:1932-7, 1999.

O'Grady P, Lijnen HR, Duffy MJ. Multiple forms of plasminogen activator in human breast tumors. *Cancer Res*, 45:6216-8, 1985.

Park JG, Frucht H, LaRocca RV, Bliss DP Jr, Kurita Y, Chen TR, Henslee JG, Trepel JB, Jensen RT, Johnson BE, et al. Characteristics of cell lines established from human gastric carcinoma. *Cancer Res*, 50:2773-80, 1990.

Petersen LC, Lund LR, Nielsen LS, Danø K, Skriver L. One-chain urokinase-type plasminogen activator from human sarcoma cells is a proenzyme with little or no intrinsic activity. *J Biol Chem*, 263:11189-95, 1988.

Pfeffer SR. Rab GTPases: master regulators that establish the secretory and endocytic pathways. *Mol Biol Cell*, 28:712-715, 2017.

Ploug J, Kjeldgaard NO. Isolation of a plasminogen activator (urokinase) from urine. *Arch Biochem Biophys*, 62:500-1, 1956.

Pohlmann PR, Mayer IA, Mernaugh R. Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer. *Clin Cancer Res*, 15:7479-7491, 2009.

Prezas P, Arlt MJ, Viktorov P, Soosaipillai A, Holzscheiter L, Schmitt M, Talieri M, Diamandis EP, Krüger A, Magdolen V. Overexpression of the human tissue kallikrein genes KLK4, 5, 6, and 7 increases the malignant phenotype of ovarian cancer cells. *Biol Chem*, 387:807-11, 2006.

Qiagen GmbH. How much RNA does a typical mammalian cell contain? FAQ ID-2946, 2013-15. [<https://www.qiagen.com/de/resources/faq?id=06a192c2-e72d-42e8-9b40-3171e1eb4cb8&lang=en>]. Abrufdatum: 14.08.2015.

Rijken DC. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects. *Baillieres Clin Haematol*, 8:291-312, 1995.

Samadani AA, Nikbakhsh N, Fattahi S, Pourbagher R, Aghajanzpour Mir SM, Mousavi Kani N, Abedian Z, Akhavan-Niaki H. RNA Extraction from Animal and Human's Cancerous Tissues: Does Tissue Matter?. *Int J Mol Cell Med*, 4:54-9, 2015.

Sato S, Kopitz C, Grismayer B, Beaufort N, Reuning U, Schmitt M, Luther T, Kotsch M, Krüger A, Magdolen V. Overexpression of the urokinase receptor mRNA splice variant uPAR-del4/5 affects tumor-associated processes of breast cancer cells in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat*, 127:649-57, 2011.

Schmidt U, Fuessel S, Koch R, Baretton GB, Lohse A, Tomasetti S, Unversucht S, Froehner M, Wirth MP, Meye A. Quantitative multi-gene expression profiling of primary prostate cancer. *Prostate*, 66:1521-34, 2006.

Schmitt M, Magdolen V, Reuning U. Theme Issue: update on the role of the fibrinolysis/plasminogen activation system in a cellular context. *Thromb Haemost*, 89:596-8, 2003.

Schmitt M, Mengele K, Gkazepis A, Napieralski R, Magdolen V, Reuning U, Harbeck N. Assessment of Urokinase-Type Plasminogen Activator and Its Inhibitor PAI-1 in Breast Cancer Tissue: Historical Aspects and Future Prospects. *Breast Care*, 3:3-10, 2008.

Schmitt M, Magdolen V. Using kallikrein-related peptidases (KLK) as novel cancer biomarkers. *Thromb Haemost*, 101:222-4, 2009.

Schmitt M, Mengele K, Napieralski R, Magdolen V, Reuning U, Gkazepis A, Sweep F, Brünner N, Foekens J, Harbeck N. Clinical utility of level-of-evidence-1 disease forecast cancer biomarkers uPA and its inhibitor PAI-1. *Expert Rev Mol Diagn*, 10:1051-67, 2010.

Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3:1101-8, 2008.

Schroder WA, Major LD, Le TT, Gardner J, Sweet MJ, Janciauskiene S, Suhrbier A. Tumor cell-expressed SerpinB2 is present on microparticles and inhibits metastasis. *Cancer Med*, 3:500-13, 2014.

Schuliga M, Westall G, Xia Y, Stewart AG. The plasminogen activation system: new targets in lung inflammation and remodeling. *Curr Opin Pharmacol*, 13:386-93, 2013.

Shaw JL, Diamandis EP. Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. *Clin Chem*, 53:1423-32, 2007.

Shaw KJ, Thain L, Docker PT, Dyer CE, Greenman J, Greenway GM, Haswell SJ. The use of carrier RNA to enhance DNA extraction from microfluidic-based silica monoliths. *Anal Chim Acta*, 652:231-3, 2009.

Smith HS, Hackett AJ, Riggs JL, Mosesson MW, Walton JR, Stampfer MR. Properties of epithelial cells cultured from human carcinomas and nonmalignant tissues. *J Supramol Struct*, 11:147-66, 1979.

Stepanova VV, Tkachuk VA. Urokinase as a multidomain protein and polyfunctional cell regulator. *Biochemistry (Mosc)*, 67:109-18, 2002.

Su SC, Lin CW, Yang WE, Fan WL, Yang SF. The urokinase-type plasminogen activator (uPA) system as a biomarker and therapeutic target in human malignancies. *Expert Opin Ther Targets*, 20:551-66, 2016.

Taubert H, Würfl P, Greither T, Kappler M, Bache M, Lautenschläger C, Füssel S, Meye A, Eckert AW, Holzhausen HJ, Magdolen V, Kotzsch M. Co-detection of members of the urokinase plasminogen activator system in tumour tissue and serum correlates with a poor prognosis for soft-tissue sarcoma patients. *Br J Cancer*, 102:731-7, 2010.

Taubert H, Magdolen V, Kotzsch M. Impact of expression of the uPA system in sarcomas. *Biomark Med*, 7:473-80, 2013.

Thurison T, Almholt K, Gårdsvoll H, Ploug M, Høyer-Hansen G, Lund IK. Urokinase receptor cleavage correlates with tumor volume in a transgenic mouse model of breast cancer. *Mol Carcinog*, PMID: 25809119, 2015. [Epub ahead of print, doi: 10.1002/mc.22316].

Timmins NE, Maguire TL, Grimmond SM, Nielsen LK. Identification of three gene candidates for multicellular resistance in colon carcinoma. *Cytotechnology*, 46:9-18, 2004.

Vassalli JD, Baccino D, Belin D. A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase. *J Cell Biol*, 100:86-92, 1985.

Veer LJ van't, Bernards R. Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. *Nature*, 452:564-70, 2008.

Williams JR. The fibrinolytic activity of urine. *Br J Exp Pathol*, 32:530-7, 1951.

Wun TC, Schleuning WD, Reich E. Isolation and characterization of urokinase from human plasma. *J Biol Chem*, 257:3276-83, 1982.

Yasar Yildiz S, Kuru P, Toksoy Oner E, Agirbasli M. Functional stability of plasminogen activator inhibitor-1. *Scientific World Journal*, 2014:858293, 2014.

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Das uPA-System und seine Interaktion im Tumor-Mikromilieu.	3
Abb. 2	Schematische Darstellung von mRNA-Spleißvarianten des uPA-Rezeptors.	10
Abb. 3	Das Urokinase-System und die Kallikrein-ähnlichen Peptidasen als Komponenten eines komplexen proteolytischen Tumor-Netzwerkes. ..	16
Abb. 4	Sphäroid-Formation in biomimetischer PEG-Hydrogelmatrix.	21
Abb. 5	Sphäroid-Formation in Liquid-Overlay-Technik.	22
Abb. 6	Sphäroid-Geometrie.	23
Abb. 7	Lichtmikroskopische Darstellung von Gewebesphäroiden (Mammakarzinom) vor und nach Therapie mit Epirubicin/Cyclophosphamid und Docetaxel.	26
Abb. 8	Extraktion der Gesamt-RNA.	36
Abb. 9	Reaktionsablauf der cDNA-Synthese mit Temperaturprofil.	40
Abb. 10	Prinzip der TaqMan Methode der quantitativen <i>real time</i> PCR.	42
Abb. 11	Prinzip der LightCycler Methode der quantitativen <i>real time</i> PCR mit dualen Hybridisationsfarbstoffen.	47
Abb. 12	Expressionsanalyse von HMBS und HPRT1 in den Zelllinien T47D, OVCAR-3, SKBR3 und HCT116 im 2D- und 3D-Zellmodell.	55
Abb. 13	Expressionsmuster von PAI-1 und Rab31 in der Zelllinie MDA-MB-231 im 2D-Zellmodell.	58
Abb. 14	Expressionsmuster von PAI-1, uPA und Rab31 in einer Verdünnungsreihe der Zelllinie CaCo-2 im 2D- und 3D-Zellmodell.	60
Abb. 15	Expressionsmuster von PAI-1, uPA und Rab31 in einer Verdünnungsreihe der Zelllinie Hs746T im 2D- und 3D-Zellmodell.	61
Abb. 16	Expressionsmuster von PAI-1, uPA, uPAR, uPAR-del4/5, Rab31 und KLK7 in vier Mammakarzinomzelllinien im 2D- und 3D-Zellmodell.	63
Abb. 17	Expressionsmuster von PAI-1, uPA, uPAR, uPAR-del4/5, Rab31 und KLK7 in zwei Ovarialkarzinomzelllinien im 2D- und 3D-Zellmodell.	64
Abb. 18	Expressionsmuster von PAI-1, uPA, uPAR, uPAR-del4/5, Rab31 und KLK7 in zwei Magenkarzinomzelllinien im 2D- und 3D-Zellmodell.	65
Abb. 19	Expressionsmuster von PAI-1, uPA, uPAR, uPAR-del4/5, Rab31 und KLK7 in drei Kolonkarzinomzelllinien im 2D- und 3D-Zellmodell.	66
Abb. 20	Expressionsmuster von PAI-1, uPA, uPAR, Rab31 und KLK7 in elf Zelllinien unterschiedlicher Tumorentität im 2D- und 3D-Zellmodell. ...	68
Abb. 21	Darstellung der Reproduzierbarkeit des Expressionsmusters in zwei unabhängigen Proben der Mammakarzinomzelllinie SKBR3.	69

Abb. 22	Darstellung der Reproduzierbarkeit des Expressionsmusters in drei unabhängigen Proben der Mammakarzinomzelllinie HCC1143.	70
Abb. 23	Expressionsmuster von PAI-1, uPA, uPAR und Rab31 in RSV-Vektorkontrolle und KLK4-7 überexprimierenden OVMZ-6 Zellen im 2D- und 3D-Zellmodell.	73
Abb. 24	Selektion effizienter Therapieoptionen im Sphäroid-Mikrotumormodell.	79
Abb. 25	Intraindividuelles Ansprechen von Gewebesphäroiden auf verschiedene Chemotherapeutika.	80
Abb. 26	<i>In vitro</i> Sphäroidtherapie mit Trastuzumab (Herceptin®).	81

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Übersicht über das verwendete Patientengewebe.	29
Tab. 2	Übersicht über die verwendeten Zelllinien.	31
Tab. 3	Generierung von Verdünnungsreihen mit MDA-MB-231 Zellen in 2D-Zellkultur.	34
Tab. 4	Generierung von Verdünnungsreihen mit CaCo-2 und Hs746T Zellen in 2D-/3D-Zellkultur.	35
Tab. 5	Pipettierschema der cDNA-Synthese (Cloned AMV First-strand cDNA Synthesis Kit, Life Technologies, Darmstadt).	39
Tab. 6	Pipettierschema der qPCR (TaqMan Methode) zur Genexpressionsanalyse von Referenzgenen.	44
Tab. 7	RNA-Isolierung und Expressionsanalyse von HPRT1 in zwei unabhängigen Verdünnungsreihen der Zelllinie MDA-MB-231 im 2D-Zellmodell.	51
Tab. 8	Qualitäts- und Quantitätsbestimmung der extrahierten Gesamt-RNA in Verdünnungsreihen der Zelllinien Hs746T und CaCo-2 im 2D-/3D-Zellmodell.	52
Tab. 9	cDNA-Qualitätsbestimmung durch Expressionsanalyse von HMBS und HPRT1 (TaqMan Methode) in den Zelllinien Hs746T und CaCo-2 im 2D-/3D-Zellmodell.	53
Tab. 10	Qualitäts- und Quantitätsbestimmung der extrahierten Gesamt-RNA in Zelllinien unterschiedlicher Tumorentität.	54
Tab. 11	Qualitäts- und Quantitätsbestimmung der extrahierten Gesamt-RNA in Tumorgewebe unterschiedlicher Entität.	56
Tab. 12	Expressionsanalyse von HMBS und HPRT1 in RSV-Vektorkontrolle und KLK4-7 überexprimierenden OVMZ-6 Zellen im 2D- und 3D-Zellmodell.	72
Tab. 13	Expressionsmuster von PAI-1, uPA, uPAR und Rab31 in RSV-Vektorkontrolle und KLK4-7 überexprimierenden OVMZ-6 Zellen im Vergleich von 2D- und 3D-Zellmodell.	74
Tab. 14	Charakteristik der im Rahmen der SpheroNeo-Studie rekrutierten, aber exkludierten Patientenproben.	77
Tab. 15	Ergebnisse der <i>in vitro</i> Wirkstofftestung am Sphäroid-Mikrotumormodell von 17 im Rahmen der SpheroNeo-Studie rekrutierten, aber exkludierten Brustkrebspatienten.	78
Tab. 16	Klinisch-pathologische Charakteristika der SpheroNeo-Kohorte (n=78) mit Angabe der pCR-Raten.	93

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

Herrn *Prof. Dr. Viktor Magdolen* für die Überlassung des Dissertationsthemas, für die ausgezeichnete Unterstützung während der Erstellung der gesamten Arbeit, sowie für seine stete Motivations- und Hilfsbereitschaft. Seine konstruktive Kritik und seine Geduld haben entscheidend zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Frau *PD Dr. Barbara Mayer* für die Überlassung der zahlreichen Zellmaterialien und für die kollegiale Zusammenarbeit im Rahmen der SpheroNeo-Studie.

Frau *Sabine Creutzburg* und Frau *Anke Benge* für ihre kompetente, geduldige und hilfsbereite Unterstützung in der praktischen Durchführung der Dissertation.

Frau *Dr. Bettina Grismayer* und Frau *Dr. Susanne Sölch* für die netten, geselligen und hilfsbereiten Stunden in der Zellkultur.

Frau *Dr. Heike Jansen* und Frau *Kathrin Halfter* für das fachkundige Wissen und die zielorientierte Unterstützung in der Datenakquise der SpheroNeo-Studie.

Frau *Dr. Daniela Loessner* für die freundliche Bereitstellung von Probenmaterial aus Brisbane.

Herrn *Dr. Matthias Kotzsch* für die Umsetzung der LightCycler Experimente in Dresden.

Frau *Dr. Natalie Falkenberg*, Herrn *Dr. Rudolf Napieralski* und Herrn *Dr. Christof Seidl* für das konstruktive und kritische Korrekturlesen.

Nichtzuletzt gebührt mein spezieller Dank meinen Eltern für ihre uneingeschränkte, liebevolle und motivierende Unterstützung, speziell meinem Bruder für die vielen kleinen und großen Hilfeleistungen, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

München, im September 2017.