



Technische Universität München
Fakultät für Medizin
Klinik und Poliklinik für RadioOnkologie und Strahlentherapie

Das 3D Hanging Drop System als praktikable Alternative des konventionellen, klonogenen Zellüberlebenstests zur Bestimmung der Strahlensensitivitäten verschiedener Tumorzellen nach Bestrahlung mit unterschiedlicher Strahlenintensität

Sabine Ines Rupp

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. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Stephanie E. Combs
2. apl. Prof. Dr. Thomas E. Schmid

Die Dissertation wurde am 26.02.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.07.2020 angenommen.

Meinen Eltern gewidmet, die mir alles ermöglicht haben.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	11
1.1 Krebserkrankungen	11
1.1.1 Tumore des Gehirns.....	11
1.1.1.1 Epidemiologie und Einteilung	11
1.1.1.2 Glioblastome	12
1.1.2 Mammakarzinome.....	13
1.2 Strahlentherapie	14
1.2.1 Ionisierende Strahlung	14
1.2.2 Photonenstrahlung und ihre Wirkung	15
1.2.3 Klonogener Zelltod	16
1.2.4 Strahlensensibilität und Strahlenresistenz	16
1.3 Entwicklung neuer Krebstherapien	16
1.4 Labormodelle	18
1.4.1 Der Koloniebildungstest	18
1.4.2 Die 3D Zellkultur	19
2 Zielsetzung.....	20
2.1 Motivation	20
2.2 Hypothese	21
2.3 Experimentelles Design.....	21
3 Material und Methoden	22
3.1 Materialien und Geräte.....	22
3.1.1 Zellen.....	22
3.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze	24
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien	25

3.1.4 Verbrauchsmaterialien	25
3.1.5 Geräte	26
3.1.6 Software	27
3.2 Methoden	27
3.2.1 Zellbiologische Methoden.....	27
3.2.1.1 Auftauen und Kultivieren.....	28
3.2.1.2 Herstellung einer Einzelzellsuspension und Bestimmung der Zellzahl.....	29
3.2.1.3 Bestrahlen.....	29
3.2.2 Koloniebildungstest	30
3.2.2.1 Versuchsdurchführung.....	31
3.2.2.2 Fixieren und Färben.....	33
3.2.2.3 Auswertung der Koloniebildungstests.....	33
3.2.3 3D Hanging Drop Technik	35
3.2.3.1 GravityPLUS™ KIT	35
3.2.3.2 Versuchsablauf.....	37
3.2.3.3 Fotografieren der 3D Hanging Drops.....	42
3.2.3.4 Auswertung der 3D Hanging Drop Versuche.....	43
3.2.3.5 Korrelationsberechnung.....	45
3.3 Statistik	46
4 Ergebnisse	46
4.1 Ergebnisse der Koloniebildungstests.....	46
4.2 Ergebnisse der 3D Hanging Drop Versuche.....	49
4.3 Korrelation der Ergebnisse der Koloniebildungstests und der 3D Hanging Drop Versuche.....	53
5 Diskussion	55
5.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse.....	55
5.2 Diskussion der Methoden.....	56
5.2.1 Diskussion des Koloniebildungstests	56
5.2.2 Diskussion des 3D Hanging Drop Systems.....	57
5.3 Diskussion der Ergebnisse	61

5.4. Stand der Forschung und Ausblick.....	61
6 Literaturverzeichnis	63
7 Zusammenfassung.....	68
8 Danksagung.....	69
9 Veröffentlichungen.....	70

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Entstehung von 3D Hanging Drops.	20
Abb. 2: Experimentelles Design der durchgeführten Experimente.....	22
Abb. 3: Verwendete Zellen unter dem Mikroskop, 10-fache Vergrößerung.	23
Abb. 4: Fixierte Tumorzellkolonien des Koloniebildungstests 21 Tage nach Bestrahlung.	33
Abb. 5: Aufbau der GravityPlus™ Hanging Drop Platte.	35
Abb. 6: 96-Well GravityTRAP™ Platte der 3D Hanging Drop Versuche.	36
Abb. 7: Versuchsablauf der 3D Hanging Drop Methode.	37
Abb. 8: Mediumswechsel in der Trap-Platte des 3D Hanging Drop Versuchs. .	42
Abb. 9: Operetta Imaging System.	43
Abb. 10: Koloniebildung im CFA.	47
Abb. 11: Überlebenskurven der Tumorzellen im Koloniebildungstest.....	48
Abb. 12: 3D Hanging Drop Sphäroide der drei getesteten Zelllinien 10 Tage nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen. Skala: 100 µm.....	49
Abb. 13: Unterschiede in der Sphäroidgröße 10 Tage nach Scheinbestrahlung in Abhängigkeit der ausgesäten Startzellzahl der untersuchten Zelllinien. Skala: 100 µm.	51
Abb. 14: Ergebnisse des 3D Hanging Drop Versuchs.	52
Abb. 15: Korrelationsgeraden der beiden Versuchsreihen.....	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispiele der Korpuskular- und der Photonenstrahlung	15
Tabelle 2: Zellkulturmedien und Zusätze.	24
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien.....	25
Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien.....	25
Tabelle 5: Geräte.....	26
Tabelle 6: Software.	27
Tabelle 7: Verwendete Zellzahlen für die Koloniebildungstests.	30
Tabelle 8: Verwendete Zellzahlen für die 3D Hanging Drop Versuche.	38
Tabelle 9: Auswertung der Sphäroidfläche durch die Harmony Software.....	43
Tabelle 10: Überlebensfraktionen (SF) der verwendeten Zelllinien im Bezug auf die Bestrahlungsdosis.	47
Tabelle 11: Alpha und beta Werte des linear quadratischen Modells der getesteten Zelllinien sowie deren D50 und D10 Werte.	48
Tabelle 12: Größe der 3D Sphäroide in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis 10 Tage nach Bestrahlung.	50
Tabelle 13: Korrelationen der Ergebnisse des CFA und der 3D Hanging Drop Methode.	53
Tabelle 14: Vergleich des Koloniebildungstests mit der 3D Hanging Drop Methode.	60

Abkürzungsverzeichnis

α	Teil einer Formel, griech. alpha, hier: zellinienspezifische Konstante
anova	Varianzanalyse, engl. analysis of variance
Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection (gemeinnützige Organisation, die Standardreferenzmikroorganismen, Zelllinien und andere Materialien für Forschung und Entwicklung sammelt, speichert und verteilt)
β	Teil einer Formel, griech. beta, hier: zellinienspezifische Konstante
Ca	Karzinom, lat. carcinoma
ca.	circa
CFA	Koloniebildungstest, engl. Colony Forming Assay
Cs	Cäsium
D	Dimension/-nal
D	Teil einer Formel, hier: Bestrahlungsdosis in Gray
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium, engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. Deoxyribonucleic Acid
$d_{x/0/10}$	Teil einer Formel, engl. day, hier: Tag x, 0, 10
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, engl. Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EM λ	Emissionswellenlänge, griech. Lambda

et al.	und andere, lat. et alii
Ex λ	Exzitationswellenlänge, griech. Lambda
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	Fetales Kälberserum, engl. Fetal Calf Serum
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
Gy	Gray (Einheit der Strahlungs-dosis), 1 Gy = 1 Joule/Kilogramm
JPG	Joint Photographic Experts Group, Grafikformat
ml	Milliliter
MW	Mittelwert
μm	Mikrometer
n	Teil einer Formel, Anzahl, engl. numbers
n	Anzahl, engl. numbers
NaCl	Natriumchlorid
nm	nanometer
p	p-Wert, zur Beschreibung des Signifikanzniveaus
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung, engl. Phosphate Buffered Saline
PE	Plattierungseffizienz
r	Korrelationskoeffizient nach Pearson
RPMI	Rosswell Park Memorial Institute
R^2	Gütemaß zur Beschreibung des linearen Zusammenhangs
SEE	Standardabweichung vom Schätzwert, engl. standard error of the estimate
SF	Überlebensrate, engl. Surviving Fraction

T 75/175	Zellkulturflaschen mit definierter Anwuchsfläche (75=75 cm ² , 175=175 cm ²)
TPZ	Tirapazamine
V ₁	Teil einer Formel, hier: benötigtes Volumen
V ₂	Teil einer Formel, hier: erweitertes benötigtes Volumen
V _{ben}	Teil einer Formel, hier: benötigte Zellsuspension
V _M	Teil einer Formel, hier: zusätzliches Medium
WHO	Weltgesundheitsorganisation, engl. World Health Organization
x	Teil einer Formel, hier: Platzhalter für Dosiswerte
X ₁	Teil einer Formel, hier: für die Versuche benötigte Zellzahl
X _{ges}	Teil einer Formel, hier: benötigte Gesamtzellzahl
X _{ZK}	Teil einer Formel, hier: Zellen in der Zellkulturflasche
x _i	Teil einer Formel, Strahlensensibilität im 3D Hanging Drop Versuch
\bar{x}	Teil einer Formel, arithmetischer Mittelwert aller x-Werte
y _i	Teil einer Formel, Strahlensensibilität im Koloniebildungsversuch
\bar{y}	Teil einer Formel, arithmetischer Mittelwert aller y-Werte
γ	griech. gamma (-Strahlen)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter = 10 ⁻⁶ l
5-FU	5-Fluoruracil

1 Einleitung

1.1 Krebserkrankungen

Im Jahr 2018 gab es weltweit 18,1 Millionen Neuerkrankungen an Krebs. 9,6 Millionen Menschen sind 2018 an Krebs gestorben (Ferlay et al., 2018). Man nimmt an, dass die Inzidenz bis zum Jahr 2030 auf 21,6 Millionen steigen wird. Dies würde einen Anstieg um 53 % seit dem Jahr 2012 bedeuten. Gründe dafür sind unter anderem das Wachstum und das Altern der Bevölkerung, körperliche Inaktivität, Rauchen und Übergewicht (Bray, Soerjomataram, 2015). Diese Entwicklung steigert den Bedarf an neuen, wirksamen Krebstherapien und damit auch an der Forschung in diesem Bereich.

1.1.1 Tumore des Gehirns

1.1.1.1 Epidemiologie und Einteilung

Der Anteil der Hirntumore an allen bösartigen Tumoren liegt im Erwachsenenalter bei 5 - 10 %. Bei Kindern stellen Tumore des Gehirns die zweithäufigsten Krebserkrankungen nach den Leukämien dar (20 - 40 % aller bösartigen Tumoren). Man unterscheidet die primären, hirneigenen Tumoren von den sekundären Hirntumoren (Hirnmetastasen, 30 - 40 %) (Sauer, 2010, S. 299 ff.).

Bei den primären Tumoren des Gehirns differenziert die World Health Organization (WHO) ca. 200 verschiedene Tumorarten. Den größten Anteil bildet mit 58 % die Gruppe der Gliome (Hablützel, 2009, S. 15). Als Gliom bezeichnet man intrazerebrale und intraspinalen Tumoren mit Ursprung im neuroepithelialen Gewebe (Diener, 2016). Dazu gehören beispielsweise astrozytäre Tumoren wie Astrozytome und Glioblastome, oligodendrogiale und ependymale Tumoren. Ursprung weiterer Hirntumorarten sind z.B. die Hirnhäute und die Schwann-Zellen in den Scheiden peripherer Nerven (Louis et al., 2007).

Eine Einteilung der Hirntumoren erfolgt nach der „WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems“. Für jeden Hirntumor wird eine passende Klassifikation und eine Gradeinteilung vergeben (Louis et al., 2016).

Die Klassifikation bezeichnet Tumortypen ausgehend von der Tumorphistologie, das heißt dem vorliegenden Wachstumsmuster, der Gewebsarchitektur sowie der vorkommenden Zelltypen. Seit der 5. Auflage der Klassifikation vom Mai 2016 werden zusätzlich molekulargenetische und immunhistochemische Eigenschaften berücksichtigt (Louis et al., 2016).

Bei jedem klassifizierten Tumor wird von der WHO ein histopathologisches Grading in die Grade I-IV vorgenommen. Dies ist ein Anzeiger des Malignitätsgrades und lässt eine Aussage über das biologische Verhalten der Hirntumoren und deren klinischen Verlauf treffen. Dementsprechend ist die Graduierung wichtig für die Wahl einer geeigneten Therapie. Dies gilt besonders in Bezug auf die adjuvante (postoperative) Bestrahlung oder die spezifische Chemotherapie (Louis et al., 2007).

Grad I beinhaltet langsam wachsende Tumoren mit der Möglichkeit auf Heilung nach chirurgischer Resektion. Tumoren des IV. Grades hingegen sind maligne, mitotisch aktive und Nekrose anfällige Neubildungen, welche ein schnelles prä- und postoperatives Wachstum zeigen. Die Überlebensrate nach der Diagnosestellung ist sehr gering (Louis et al., 2007).

1.1.1.2 Glioblastome

Die Glioblastome werden dem IV. Grad der WHO Klassifikation zugeordnet (Louis et al., 2016). Sie bilden mit bis zu 15 % den häufigsten Hirntumor bei Erwachsenen. Die 2-Jahres Überlebensrate beträgt ca. 10 % (Diener, 2016).

Die Standardtherapie eines neu diagnostizierten Glioblastoms findet multidisziplinär statt. Zuerst wird eine größtmögliche Resektion angestrebt. Anschließend folgt eine fraktionierte Teilhirnbestrahlung (mit Einzeldosen von 1,8 - 2,0 Gray (Gy) bei einer Gesamtdosis von ca. 60 Gy) in Kombination mit einer konkomitanten und adjuvanten Temozolomid Chemotherapie in sechs Zyklen (Stöver, Feyer, 2018, S. 95 ff).

Aufgrund der hohen Resistenzen gegenüber den gängigen Behandlungsmethoden gestaltet sich die Therapie von Glioblastomen noch sehr schwierig. Durch starke Invasion in das umliegende Normalgewebe entsteht typischerweise ein lokales Rezidiv in der resezierten Tumorphöhle oder mit einem zwei Zentimeter großen Radius um die Resektionshöhle herum. Metastasen außerhalb des zentralen Nervensystems und Metastasierungen über den Liquor hingegen sind äußerst selten (Iacob, Dinca, 2009). Daher versucht man vor allem durch intensive Bestrahlung eine lokale Kontrolle zu gewinnen und die Überlebenszeit der Patienten zu verlängern (Laperriere et al., 2002). Ohne Therapie liegt das mediane Überleben bei drei Monaten (Iacob, Dinca, 2009). Bei einer kombinierten Therapie, bestehend aus Operation und Radiochemotherapie, liegt derzeit das durchschnittliche Überleben nach Diagnosestellung bei 14 - 15 Monaten (Stöver, Feyer, 2018, S. 102).

1.1.2 Mammakarzinome

In vielen Ländern steht Brustkrebs auf Platz eins der häufigsten Krebserkrankungen und auch der häufigsten Krebstodesfälle bei Frauen (Bray et al., 2018). In Deutschland besteht für Frauen ein Lebenszeitrisko von ca. 12,8 %, d. h. eine von acht Frauen wird erkranken. Auch bei Männern kann Brustkrebs auftreten, das Lebenszeitrisko liegt in Deutschland bei ca. 0,1 % (Kaatsch et al., 2015, S. 74 ff.). Das relative 10-Jahres-Überleben nach Diagnosestellung liegt bei Frauen bei 82 % und bei Männern bei 65 % (Barnes et al., 2016, S. 36).

Die Brust besteht aus Binde- und Fettgewebe mit bis zu 20 Drüsen, den Lobuli glandulae mammae. Über Ausführungsgänge, den Ductus lactiferi, und den Sinus lactiferi münden diese in der Brustwarze (Lasch, Fillenberg, 2017, S. 12).

Invasive Karzinome der Brust werden nach ihrem Entstehungsort eingeteilt. Man unterscheidet das lobuläre, das von den Einzeldrüsen ausgeht, vom duktalem Karzinom der Milchgänge. Das duktales Mammakarzinom tritt in ca. 80 % der Fälle auf, das lobuläre Karzinom in bis zu 10 %. Neben diesen zwei Formen werden weitere Sonderformen beschrieben (Lasch, Fillenberg, 2017, S. 12 ff.).

Die Therapie des Mammakarzinoms ergibt sich aus dem Tumorstaging und dem Tumorgrading. In niedrigen Stadien oder nach neoadjuvanter (präoperativer) Chemotherapie kann brusterhaltend reseziert werden. Dabei werden auch befallene Lymphknoten der Achselhöhle entfernt. Ist der Tumor bereits fortgeschritten oder multizentrisch wachsend, d. h. es wachsen mehrere Herde in mehreren Quadranten der Brust, wird eine Entfernung der Brust durchgeführt (Lasch, Fillenberg, 2017, S. 40 f.).

Eine Bestrahlung der Brust wird meist postoperativ bzw. nach Chemotherapie zur Rezidivkontrolle durchgeführt. Bei inoperablen Karzinomen kann die Strahlentherapie auch primär indiziert sein. Palliativmedizinisch dient sie vor allem der akuten Therapie von Hirnmetastasen oder frakturgefährdeten Knochenmetastasen. Die Entscheidung zu einer adjuvanten Therapie in Form einer Chemo-, einer Antihormonellen- oder einer Antikörpertherapie wird im Tumorboard interdisziplinär und individuell für die/den Patientin/-en getroffen (Lasch, Fillenberg, 2017, S. 41 f.).

Im Rahmen der Rezidivkontrolle zeigt sich die postoperative Bestrahlung als wichtigstes und effektivstes Vorgehen, noch vor einer medikamentösen Systemtherapie (Castaneda, Strasser, 2017) (Clarke et al., 2005). Die Behandlung erfolgt entweder in konventioneller Fraktionierung (mit einer Gesamtdosis von ca. 50 Gy in etwa 25 - 28 Fraktionen) oder in Hypofraktionierung (ca. 40 Gy Gesamtdosis in ca. 15 - 16 Fraktionen) (Stöver, Feyer, 2018, S. 171) (Owen et al., 2006).

1.2 Strahlentherapie

Etwa zwei Drittel aller örtlich begrenzten Tumoren können derzeit kurativ behandelt werden. In der Hälfte der Fälle gelingt dies durch die Strahlentherapie (Sauer, 2010, S. 8 f.).

1.2.1 Ionisierende Strahlung

Die in der Radiotherapie verwendete ionisierende Strahlung kann ein Atom strukturell verändern. Bei der direkt ionisierenden Strahlung geben elektrisch geladene Teilchen, z. B. Elektronen, ihre Energie direkt durch Stöße an die

Materie entlang ihrer Bahn ab. Bei der indirekt ionisierenden Strahlung wird erst durch Interaktion mit einem Atom des bestrahlten Materials ein geladenes Teilchen erzeugt, welches dann durch Stöße Energie abgeben kann. Man unterscheidet die Korpuskularstrahlung, die aus ungeladenen oder geladenen Teilchen mit Ruhemasse besteht, von der Photonenstrahlung. Bei Letzterer handelt es sich um elektromagnetische Wellenstrahlung, die aus Teilchen ohne Ruhemasse oder Ladung besteht. Tabelle 1 zeigt Beispiele dieser Einteilung (Sauer, 2010, S. 81 ff.).

Tabelle 1: Beispiele der Korpuskular- und der Photonenstrahlung.

Strahlenart	Direkt ionisierend (geladene Teilchen)	Indirekt ionisierend (ungeladene Teilchen)
Korpuskularstrahlung	Elektronen, Protonen	Neutronen
Photonenstrahlung		Röntgenstrahlen, Gammastrahlen

1.2.2 Photonenstrahlung und ihre Wirkung

Die in dieser Arbeit verwendete Gammastrahlung gehört zu der ionisierenden Photonenstrahlung. Sie wird ausgesandt, wenn angeregte Atomkerne aus einem Zustand höherer Energie in einen Zustand niedrigerer Energie übergehen (Sauer, 2010, S. 82).

Die Wirkung der Photonenstrahlung auf die Zellen erfolgt durch das Herauswerfen von Elektronen aus den Molekülen der Zelle (Ionisierung). Diese Elektronen verursachen durch Zusammenstöße mit anderen Molekülen weitere Ionisierungen. Dadurch können chemische Verbindungen aufgebrochen und die Struktur der Zell-DNA (Desoxyribonukleinsäure) zerstört werden. Zu den verursachten Schäden gehören Basenschäden, Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA. Können die zelleigenen Reparaturmechanismen diese Schäden nicht schnell genug beseitigen, kann es entweder zum Absterben der Zelle oder zu einem (temporären) Stopp im Zellzyklus kommen. Bei der Bestrahlung mit 1 Gy Dosis kommt es in jeder bestrahlten Zelle zu ca. 10^5 Ionisierungen, über 1.000 Basenschäden, ca. 1.000 Einzel- und 20 - 40 Doppelstrangbrüchen. Aufgrund von verschiedenen Reparaturmechanismen

kommt es bei dieser Dosis jedoch lediglich in 30 % der typischen humanen Zellenlinien zum Zelltod (Joiner, van der Kogel, 2009, S. 11 ff.).

1.2.3 Klonogener Zelltod

Der Verlust der unbegrenzten Teilungsfähigkeit einer Zelle wird als klonogener Zelltod bezeichnet. Aus strahlenbiologischer Sicht spielt diese funktionelle Definition des Zelltods die wichtigste Rolle in der Erfolgsbeurteilung der Strahlentherapie. Eine Zelle, die sich auch nach Bestrahlung weiterhin unbegrenzt teilen kann, kann eine lokale Tumorkontrolle verhindern. Zum klonogenen Zelltod führen genetisch festgelegte Mechanismen wie der programmierte Zelltod (Apoptose), die Autophagie, die Seneszenz und die passiv ablaufende Nekrose. Auch der Mitose-Tod, bei der die Zellen nicht mehr in der Lage sind, die Mitose korrekt durchzuführen, endet im klonogenen Zelltod (Joiner, van der Kogel, 2009, S. 27 ff.).

1.2.4 Strahlensensibilität und Strahlenresistenz

Klinisch definiert sich ein Tumor als strahlenempfindlich, wenn er durch eine Bestrahlung kontrolliert werden kann, ohne schwere Schäden am gesunden Gewebe zu verursachen. Mitbestimmend ist also auch die Strahlentoleranz des Nachbargewebes. Gründe für die Strahlenresistenz sind unter anderem das Tumolvolumen, die Tumorstammzellen, der Anteil von Hypoxie, die reaktive Tumorpheriferation nach Bestrahlung, das Reparaturvermögen der Tumorzellen und individuelle Faktoren wie das Patientenalter und der Allgemeinzustand. Sowohl das Glioblastom als auch das Mammakarzinom gelten als relativ strahlenresistent, wobei das Glioblastom noch resistenter ist als das Mammakarzinom (Bao et al., 2006) (Sauer, 2010, S. 130 ff.) (Wang et al., 2010).

1.3 Entwicklung neuer Krebstherapien

Die niedrige Überlebensrate bei Glioblastomen und die hohe Inzidenz von Mammakarzinomen und deren Rezidivrate (ca. 8 % in den ersten 5 Jahren nach brusterhaltender Operation mit Bestrahlung (Haffty et al., 1991))

veranlassen die Forschung, bessere Therapien, wie z.B. die personalisierte Strahlentherapie, zu entwickeln.

Der Weg eines neuen und erfolgsversprechenden Wirkstoffs vom Labor bis zur Anwendung in der Klinik dauert ca. 10 - 16 Jahre und kostet Millionen bis Milliarden Euro (Williams, 2016).

Bis zu 10.000 Substanzen müssen getestet werden, um ein neues Medikament auf den Markt bringen zu können. Ist eine Substanz mit potentieller therapeutischer Bedeutung gefunden, folgt das präklinische Entwicklungsprogramm. In Laborversuchen müssen zuerst schädigende Wirkungen ausgeschlossen werden. Hierfür werden Zellkulturen verwendet. Hat sich die Substanz bis dahin bewährt, werden die Labormodelle auf Tiermodelle übertragen. So können die Wirkungen und Nebenwirkungen in einem lebenden Organismus getestet werden. Übersteht die Substanz auch diese Stufe und zeigt sich als unbedenklich, ist die präklinische Phase beendet. Etwa 2/3 der Kosten fallen bis zu diesem Punkt an. Nur ca. 10 von ursprünglich 10.000 Substanzen schaffen es in die nächste Phase. Jetzt dürfen Versuche am Menschen unternommen werden (N.N., s.a.) (N.N., 2013) (Wehner, s.a.). 85 % der möglichen Wirkstoffe scheitern schon in den ersten Phasen der sogenannten klinischen Prüfungen. Von den Stoffen, die alle drei Phasen der klinischen Prüfungen überstehen, werden letztlich nur die Hälfte zugelassen (Ledford, 2011).

In der strahlentherapeutischen Forschung bedeutet das zum Beispiel, dass sich eine kombinierte Radiochemotherapie in konventionellen 2D Zellkulturen bewährt, in Tierexperimenten oder folgenden klinischen Tests aber unwirksam oder toxisch ist.

Wünschenswert sind daher Zellkulturmodelle, die das *in vivo* Verhalten von Tumoren in ihrem umgebenden Gewebe schon in der präklinischen Phase möglichst real abbilden. Somit könnten unwirksame oder toxische Stoffe früher in der Therapieentwicklung ausgeschlossen werden. Das kann die Zahl der Tierversuche reduzieren und Zeit und Geld sparen (Abbott, 2003) (Edmondson et al., 2014) (Eke et al., 2016) (Pampaloni et al., 2007). Neben dem

Goldstandard, dem 2D Koloniebildungstest, werden deshalb immer mehr 3D Modelle verwendet.

1.4 Labormodelle

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturmodellen handelt es sich um den konventionellen Koloniebildungstest und ein 3D Hanging Drop Modell.

1.4.1 Der Koloniebildungstest

Der Koloniebildungstest (Colony forming assay, CFA) gilt derzeit als Goldstandard zur Ermittlung der Strahlensensibilität einer Zellpopulation *in vitro*. Seit seiner Etablierung in den 50er Jahren von Puck und Marcus wurde diese Methode für eine Vielzahl von Versuchen mit den unterschiedlichsten Zellen und Kulturmedien verwendet (Puck, Marcus, 1956) (Schmitz, 2011, S. 239).

Grundlage des CFA ist die Fähigkeit von Einzelzellen, durch unlimitierte Zellteilung Kolonien zu bilden. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen vor oder nach der Bestrahlung in einem geeigneten Medium ausgesät. Nach einem bestimmten Zeitraum wird die Zahl der entstandenen Kolonien gezählt und die Überlebensrate errechnet. Die Zellen wachsen in diesem Test in einer einfachen Schicht, als sog. Monolayer. Es handelt sich demnach um ein zweidimensionales (2D) Zellkulturmodell (Franken et al., 2006) (Schmitz, 2011, S. 239 ff.).

Das Zeitfenster von bis zu drei Wochen bis zur Auswertung beinhaltet alle Formen des Zelltods wie Nekrose, Apoptose und der Unfähigkeit zur Proliferation. Ergebnisse solcher 2D *in vitro* Versuche zeigen teilweise eine gute Aussagekraft und Korrelation zu *in vivo* Ergebnissen und Messungen an Patienten (Franken et al., 2006) (Joiner, Van der Kogel, 2009, S. 27 ff.) (Brown, Attardi, 2005).

In den letzten Jahren gerät die 2D Zellkultur jedoch aufgrund ihrer biologischen Grenzen zunehmend in Kritik. In einem lebenden Organismus sind fast alle Zellen in drei Dimensionen von anderen Zellen sowie von Extrazellulärmatrix (EZM) umgeben. Diese Situation ist in einem 2D Kulturmodell nicht gegeben.

Deshalb wird versucht, mehr 3D Methoden in der Tumortheraieforschung zu etablieren (Abbott, 2003) (Edmondson et al., 2014) (Mogilner, Odde, 2011) (Pampaloni et al., 2007).

1.4.2 Die 3D Zellkultur

Zellen, die sich auch *in vitro* in drei Dimensionen entwickeln, ähneln in der Orientierung dem Mikrogewebe eines lebendigen Organismus. Deshalb erwartet man hierbei eine bessere Aussagekraft über biologische Funktionen in Geweben zu erlangen als mit 2D Zellkulturen. Soll das Wirkprofil und die Wirkungsbreite eines neuen Medikaments getestet werden, so ist es von Vorteil, wenn das Zellkulturmodell ein organähnliches Verhalten zeigt (Eke et al., 2016) (Ferne Korn, 2014) (Pampaloni et al., 2007).

Lange Zeit gab es Zweifel an der Anwendbarkeit und dem Nutzen von 3D Methoden. Gründe waren beispielsweise der Aufwand und die Kosten der dreidimensionalen Kultivierung von Zellen in einem geeigneten Umfeld. Zu einem Aufschwung der 3D Modelle führte unter anderem die Entdeckung der Forschergruppe um Bissell im Jahre 1997. Sie konnte zeigen, dass Antikörper gegen einen Rezeptor auf der Zelloberfläche, den β 1-Integrin Rezeptor, die Malignität und das Wachstum von Brustkrebszellen in einem 3D Zellkulturmodell hemmen. In einem 2D Modell konnten diese Veränderungen nicht belegt werden. Die Zellen im Brustgewebe kommunizieren nicht nur untereinander, sondern auch mit der EZM. Dabei handelt es sich z.B. um Kollagene, Elastin und Laminin. Diese Proteine wirken sich auf die mechanischen Eigenschaften des Gewebes aus und organisieren die Kommunikation der Zellen mit der umgebenden Matrix. Die Integrin-Rezeptoren auf den Oberflächen der Zellen verankern sich in der EZM und bestimmen, wie die Zellen biochemische Signalstoffe aus ihrer näheren Umgebung verarbeiten. Konsequenz ist, dass gewisse Feinheiten in flachen Monolayer Zellkulturen nicht detektiert werden können (Abbott, 2003).

Heute existieren verschiedene Formen von 3D Zellkulturen. Dazu zählt zum Beispiel die Kultivierung von Zellen in EZM oder in Kunststoffsubstraten („Scaffolds“) (Ferne Korn, 2014). In dieser Arbeit wurden 3D Sphäroide in einem Hanging Drop Modell eingesetzt. Es wurde erstmals untersucht, ob die 3D

Hanging Drop Methode eine geeignete Alternative zum 2D CFA ist, um die Strahlensensibilität von Tumorzellen zu bestimmen.

Abb. 1 zeigt die Sphäroidentstehung im verwendeten 3D Hanging Drop Modell. Nach dem Aussäen der Zell-Mediumssuspension in eine spezielle 96 Well Platte formen sich Tropfen, die an der Unterseite der trichterartig geformten Wells hängen. In den folgenden drei Tagen der Inkubation sammeln sich die Zellen durch die Schwerkraft am unteren Ende des Tropfens an. Da sie keine Oberfläche haben, an der sie sich anheften können, bilden die Zellen ein gewebeähnliches Sphäroid. In dieser Form werden sie durch die Trichteröffnung in die 96 Well Versuchsplatte überführt (N.N., 2014) und mit unterschiedlichen Dosen bestrahlt (s. Abb. 2). Mehrere Tage nach der Bestrahlung wird errechnet, wie die bestrahlten Sphäroide im Vergleich zu ihrer scheinbestrahlten Kontrolle wachsen. Ein verringertes Wachstum lässt auf eine höhere Zelltodrate der bestrahlten Zellen schließen.

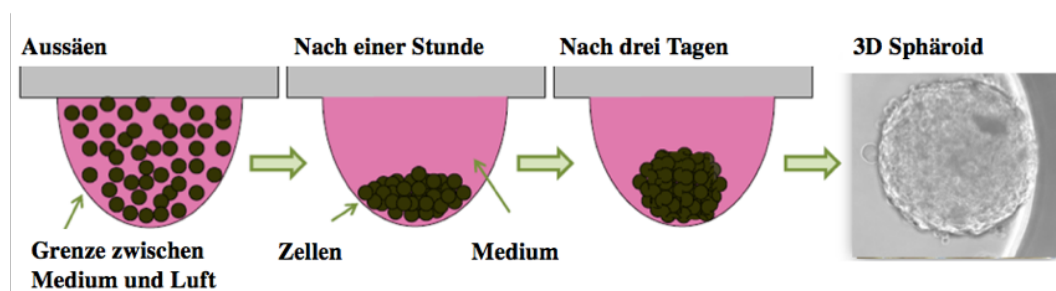


Abb. 1: Entstehung von 3D Hanging Drops.

(Leist et al, 2012, bearbeitet von Höfig I., Helmholtzzentrum München)

2 Zielsetzung

2.1 Motivation

Es wird angenommen, dass ein 3D Versuchssystem näher an den physiologischen Bedingungen eines Tumors liegt, als ein 2D System. Eignet sich das 3D Hanging Drop System genauso gut um die Strahlensensibilität von Tumorzellen abzubilden wie der konventionelle CFA, könnten durch die Ergebnisse einerseits die biologischen Grundlagen und damit das Verständnis zur Behandlung strahlenresistenter Tumoren verbessert, als auch neue

Therapiekonzepte entwickelt werden. Andererseits könnte durch die neue Methode Zeit und Material gespart werden.

2.2 Hypothese

Die Hypothese dieser Doktorarbeit lautet, dass die 3D Hanging Drop Technologie mindestens genauso gut geeignet ist, um die Strahlensensibilität verschiedener Zelllinien zu bestimmen, wie der konventionelle 2D Koloniebildungstest.

2.3 Experimentelles Design

Abb. 2 zeigt das experimentelle Design der 3D Hanging Drop Versuche und der CFAs. Für beide Versuchsaufbauten wurden eine Glioblastom- und zwei Brustkrebszelllinien verwendet. Für die Ausmessung der 3D Sphäroide war eine lentivirale Transduktion mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) nötig. Diese transduzierten Zellen wurden für beide Versuchsreihen verwendet. Bestrahlt wurde stets unter den gleichen Bedingungen mit den Dosen 0, 2, 4, 6 und 8 Gy. Das Wachstum der Sphäroide nach Bestrahlung wurde bis zum Endpunkt an Tag 10 erfasst. Anschließend wurde die Sphäroidfläche quantifiziert und mit der Koloniebildungseffizienz des 2D Versuchs 3 Wochen nach Bestrahlung verglichen.

Experimentelles Design

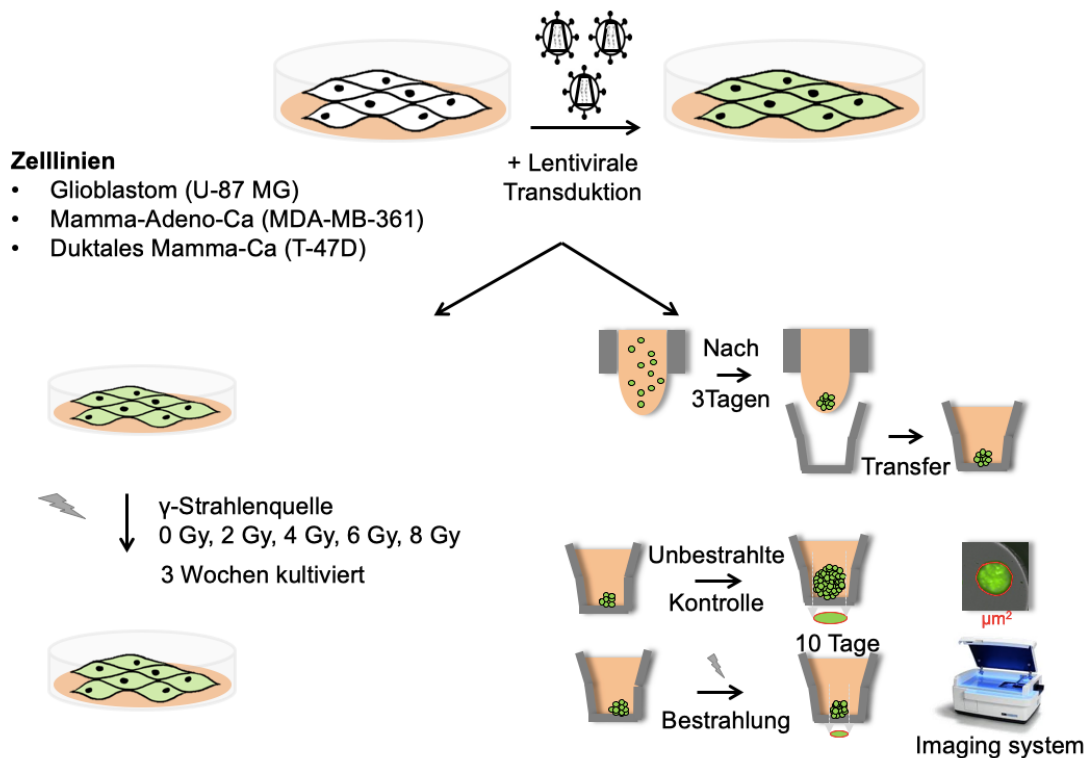


Abb. 2: Experimentelles Design der durchgeführten Experimente.

γ = Gamma-Strahlenquelle, Ca = Karzinom (Höfig I. Helmholtzzentrum München, bearbeitet).

3 Material und Methoden

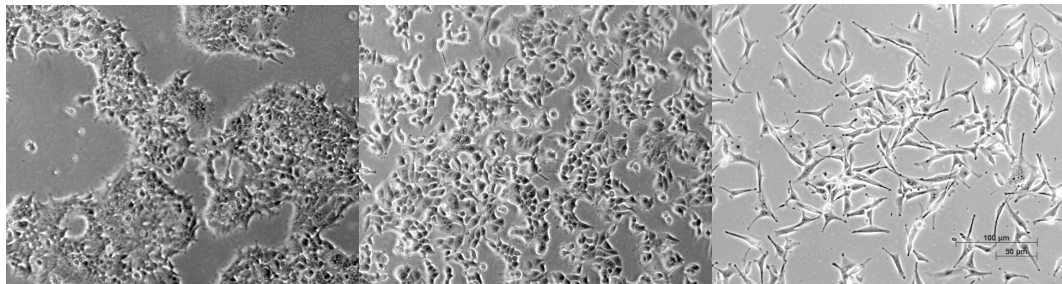
3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Zellen

Verwendet wurden die zwei Brustkrebszelllinien MDA-MB-361 und T-47D sowie die Glioblastomzelllinie U-87 MG (s. Abb. 3). Diese adhären Zellen unterscheiden sich in ihren Strahlensensibilitäten. Die Glioblastomzelllinie gilt als resistenter als die beiden Brustkrebszelllinien (Sauer, 2010, S. 130 ff.).

Die MDA-MB-361 Zelllinie stammt von einem Adenokarzinom der Brust einer 40-jährigen Kaukasierin. Die Zelllinie T-47D stammt von einem duktalem Mammakarzinom einer 54-jährigen Frau. Bei der Zelllinie U-87 MG handelt es

sich um humane Glioblastomzellen eines männlichen Patienten (N. N., 2016). Die Glioblastomzelllinie wurde von der Sirion Biotech GmbH, Martinsried, Deutschland, zur Verfügung gestellt. Die Brustkrebszelllinien stammen von der American Type Culture Collection (ATCC). Alle diese Zellen wurden von Höfig I. am Helmholtzzentrum München mit Lentiviren transduziert. Dadurch exprimieren die Zellen GFP. Die GFP Transduktion war erforderlich, um die 3D Sphäroide mit Hilfe des Operetta Imaging Systems ausmessen zu können.



a) MDA-MB-361-GFP b) T-47D-GFP c) U-87 MG-GFP

Abb. 3: Verwendete Zellen unter dem Mikroskop, 10-fache Vergrößerung. (Richter S., Helmholtzzentrum München).

3.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze

Tabelle 2: Zellkulturmedien und Zusätze.

Bezeichnung	Bezugsquelle
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), high glucose	Gibco life tech., ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Bio & SELL, Feucht bei Nürnberg, Deutschland
Insulin	Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Deutschland
Puromycin	Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Deutschland
Rosswell Park Memorial Institute (RPMI-1640), high glucose	Gibco life tech., ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Das Kulturmedium für die Zelllinie MDA-MB-361-GFP bestand aus folgenden Komponenten:

DMEM: 500 ml
FCS: 20 %
Puromycin: 0,3 µg / ml

Das Kulturmedium für die Zelllinie T-47D-GFP bestand aus folgenden Komponenten:

RPMI-1640: 500 ml
FCS: 10 %
Insulin: 0,2 U / ml
Puromycin: 0,3 µg / ml

Das Kulturmedium für die Zelllinie U-87 MG-GFP bestand aus folgenden Komponenten:

DMEM:	500 ml
FCS:	10 %
Puromycin:	0,3 µg / ml

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien.

Bezeichnung	Bezugsquelle
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol, 100 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Giemsa	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (0,05 %)	Gibco life tech., ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Bezugsquelle
GravityPLUS Kit, CS-06-001	InSphero AG, Schlieren, Schweiz
MicroClime Deckel LLS-0310	Labcyte, Sunnyvale, Kalifornien, USA
Medium Reservoir für Multipipetten	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Petrischalen 10 cm, Nunclon™, Delta-behandelt	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Spritze, 16cc syringe, steril	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes (USA)
12 Well Platten	Corning Incorporated, NY, USA
Zellkulturflaschen T75	Corning Incorporated, NY, USA
Zellkulturflaschen T175	Corning Incorporated, NY, USA

3.1.5 Geräte

Tabelle 5: Geräte.

Bezeichnung	Modell	Firma
Bestrahlungsanlage	HWM D-2.000	Wälischmiller Engineering, Germany
Brutschrank	Heraeus 6.000	Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, USA
Gerät zur Zellzahlbestimmung	Beckman Z1 Coulter-Particle-Counter	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Koloniezählgerät	GelCountTM	Oxford Optronix Ltd., Milton Park, UK
Lichtmikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Jena, Deutschland
Mehrkanal Multipipette	Viaflo II, 300µl	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Operetta	Imaging System	Perkin Elmer, Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifuge	Rotina, 420	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland

3.1.6 Software

Tabelle 6: Software.

Bezeichnung	Details	Bezugsquelle
GelCount Software	n/a	Oxford Optronix Ltd., Milton Park, UK
GraphPad Prism Software	Version 8	GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA
Harmony Software	Harmony Version 3.5	Perkin Elmer, Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Microsoft Excel	n/a	Microsoft, Redmond, Washington, USA
VassarStats.net	Website for Statistical Computation	Richard Lowry, PhD, Vassar College, Poughkeepsie, NY, USA

3.2 Methoden

Außer den Methoden „Färben und Fixieren“ wurden alle Laborarbeiten in einem Labor der Sicherheitsstufe zwei nach Gentechnikgesetz durchgeführt. Dabei handelt es sich um gentechnische Arbeiten, bei denen nach dem Stand der Wissenschaft von einem geringen Risiko für die menschliche Gesundheit und die Umwelt auszugehen ist (Goerlich, 2014).

3.2.1 Zellbiologische Methoden

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in der Sterilwerkbank durchgeführt. Es wurden sterile Einmalpipetten, Zellkulturflaschen, Chemikalien, Reagenzien und Medien bzw. Medienzusätze verwendet.

3.2.1.1 Auftauen und Kultivieren

Die verwendeten Zellen waren zur langfristigen Aufbewahrung in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert. Je 1×10^6 Zellen waren pro Röhrchen konserviert. Um die eingefrorenen Zellen wieder in Kultur zu bringen, wurde das Kryoröhrchen im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut. Sobald sich die Zellsuspension verflüssigte, wurde diese in ein vorgelegtes, gekühltes Medium überführt. Danach wurde mit 1.000 Umdrehungen pro Minute bei Raumtemperatur für fünf Minuten zentrifugiert. Die Zellen setzten sich dabei als Pellet am Boden ab. Der Überstand wurde abgesaugt. Anschließend wurde das Zellpellet in einem neuen Medium sorgfältig resuspendiert und in die Zellkulturflaschen mit definierter Anwuchsfläche ($T75 = 75\text{ cm}^2$, $T175 = 175\text{ cm}^2$) ausgesät. Nach einem Tag im Brutschrank wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, ob sich die Zellen gut anheften, und ein Wechsel des Mediums durchgeführt.

Alle Medien, die je nach Zelllinie unterschiedlich zusammengestellt wurden (s.o.), beinhalteten FCS sowie das Antibiotikum Puromycin. Die Medien DMEM und RPMI-1640 versorgten die Zellen unter anderem mit Glucose, Vitaminen und Aminosäuren. Das FCS lieferte ebenso wichtige Nährstoffe wie Aminosäuren, Vitamine, Hormone und Wachstumsfaktoren (Schmitz, 2011 S. 104 ff.). Die Zugabe von Puromycin war zur Erhaltung der GFP Transduktion erforderlich (Sakuma et al., 2012). Dem Medium der T-47D-GFP Zelllinie wurde Insulin gemäß der Empfehlungen der ATCC hinzugegeben (N.N., 2016). Die Zellen wurden bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 und einer Luftfeuchtigkeit von 95% inkubiert.

Die Subkultivierung der verwendeten Zellen wurde bei $70 - 80\%$ Konfluenz durchgeführt. Dafür wurden die Zellen mittels Trypsin enzymatisch von ihrer Unterlage abgelöst, gezählt und die gewünschte Zellzahl zusammen mit einem neuen Medium in eine neue Zellkulturflasche überführt (Schmitz, 2011, S. 99 f.). Dies erfolgte zwei Mal pro Woche.

Für die Durchführung der simultanen Versuchsansätze der beiden verwendeten Methoden, dem Koloniebildungstest und der 3D Hanging Drop Technologie, wurden stets Zellen derselben Kulturflasche und Passagenzahl entnommen. Die Zellen waren dabei nach dem Auftauen maximal drei Passagen alt.

3.2.1.2 Herstellung einer Einzelzellsuspension und Bestimmung der Zellzahl

Um die kultivierten Zellen für einen Versuch nutzen zu können, musste zuerst eine Einzelzellsuspension hergestellt werden. Dazu wurden Zellen bei etwa 90 % Konfluenz in einer Zellkulturflasche verwendet. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 10 ml PBS pro T75 Flasche bzw. 12 ml PBS pro T175 Flasche gewaschen. Das PBS wurde anschließend wieder abgesaugt. Sobald Trypsin zugegeben wurde (1 ml pro T75 Flasche, 2 ml pro T175 Flasche), wurden die Flaschen bei 37 °C inkubiert, bis sich alle Zellen gelöst hatten (ca. 5 Minuten). Dieser Zustand konnte im Mikroskop bestimmt werden, wenn die Zellen abgerundet und vom Boden der Flasche losgelöst waren. Um die Trypsinreaktion zu stoppen, wurde Medium (samt Serum) im Verhältnis von mindestens 3:1 zum Trypsin zugegeben und mittels einer 5 ml Pipette gut resuspendiert. Diese Einzelzellsuspension wurde dann in ein 10 ml Falcon gegeben. Davon wurden 0,5 ml abgenommen und in ein Gefäß mit 19,5 ml NaCl gegeben, um die Zellzahl mit Hilfe des Coulter-Particle-Counters zu bestimmen. Die verbliebenen Zellen in dem 10 ml Falcon wurden danach unter Raumtemperatur bei 300 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die gezählten Zellen entsprechend der gewünschten Zellzahl in die Versuchsgefäße ausgesät.

3.2.1.3 Bestrahlen

Die Bestrahlung erfolgte 24 Stunden nach Aussaat des Koloniebildungstests bzw. 24 Stunden nach dem Heruntertropfen der Sphäroide. Verwendet wurde eine ^{137}Cs γ -Strahlenquelle bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden für die CFA Versuche in 12 Well Platten (Brustkrebszelllinien) bzw. Petrischalen (Glioblastomzelllinie) und für die 3D Hanging Drop Versuche in 96 Well Platten (alle Zelllinien) bestrahlt. 1 Gy entsprach einer Bestrahlungszeit von 2,12 Minuten (Stand Januar 2015). 2 Gy entsprachen demnach 4,24 min, 4 Gy = 8,48 min, 6 Gy = 12,72 min und 8 Gy = 16,96 min. Die Kontrollplatten wurden scheinbestrahlt. Sie wurden ohne Bestrahlung denselben Transportbedingungen ausgesetzt, wie die bestrahlten Platten.

3.2.2 Koloniebildungstest

Alle CFAs dieser Arbeit wurden in der pre-plating Methode durchgeführt. Dabei wurden die Zellen zuerst ausgesät und anschließend bestrahlt (Franken et al., 2006).

Für den Koloniebildungstest der Zelllinien MDA-MB-361-GFP und T-47D-GFP wurden 12 Well Platten mit einem Befüllungsvolumen von 2 ml / Well verwendet. Für die Zelllinie U-87 MG-GFP wurden Petrischalen mit 10 cm Durchmesser und einem Befüllungsvolumen von 13 ml / Schale verwendet. Mit Hilfe von Vorversuchen konnte für jede der drei Zelllinien eine, für den jeweiligen Versuch geeignete, Zellzahl ermittelt werden. Aufgrund der toxischen Wirkung der Bestrahlung musste die Zellzahl in den bestrahlten Platten gegenüber den unbestrahlten Kontrollen erhöht werden. Nur so konnte für die nachfolgende Auswertung eine ausreichend hohe Zelldichte gewährleistet werden. Eine Übersicht über die verwendeten Zellzahlen gibt die Tabelle 7:

Tabelle 7: Verwendete Zellzahlen für die Koloniebildungstests.

	MDA-MB-361-GFP	T-47D-GFP	U-87 MG-GFP
Kontrollen	500 Zellen	250 Zellen	1.000 Zellen
2 Gy	1.000 Zellen	250 Zellen	2.000 Zellen
4 Gy	2.000 Zellen	1.000 Zellen	3.000 Zellen
6 Gy	6.000 Zellen	2.000 Zellen	5.000 Zellen
8 Gy	12.000 Zellen	4.000 Zellen	6.000 Zellen

Replikate:

Ein technisches Replikat entspricht einem Well bzw. einer Petrischale derselben Versuchsreihe. Von den MDA-MB-361-GFP und den T-47D-GFP Zelllinien wurden je zwölf technische Replikate für die Bestrahlungsdosen 2, 4, 6 und 8 Gy angefertigt. Bei den dazugehörigen Kontrollen waren es 36 technische Replikate. Von der U87 MG-GFP Zelllinie gab es je vier technische Replikate pro Bestrahlungsdosis und vier technische Replikate der Kontrollen.

Ein biologisches Replikat entspricht einem Well bzw. einer Petrischale in einem gleich aufgebauten Wiederholungsversuch. Bei den T-47D-GFP und den U-87 MG-GFP Zelllinien wurden je 4 biologische Replikate angefertigt. Bei der MDA-MB-361-GFP Zelllinie waren es 3 biologische Replikate.

3.2.2.1 Versuchsdurchführung

Vor Beginn der Zellkulturarbeiten wurden alle benötigten Materialien und Geräte (siehe 3.1) mit Ausnahme der Zellen bereitgestellt. Die Zellen verblieben während der Vorbereitung im Brutschrank. Die Medien, PBS und Trypsin wurden auf 37 °C erwärmt. Die verwendeten Platten wurden mit Versuchsnummer, Zelllinie, Zellzahl, Bestrahlungsdosis, Datum und Namenskürzel beschriftet. Durch diese Vorbereitung konnte die unmittelbare Arbeit an den Zellen möglichst kurzgehalten werden. So wurde einer Veränderung des pH-Werts und der Temperatur vorgebeugt.

Vor dem Aussäen der Zellen für einen Versuch wurde die Zellzahl in den Zellkulturflaschen nach obiger Beschreibung bestimmt (s. 3.2.1.2). Daraus wurde errechnet, welche Menge an Zell-Mediumslösung in ein Well bzw. eine Petrischale ausgesät werden musste, um die für den Versuch gewünschte Anzahl an Zellen zu erhalten:

$$\frac{\text{Erwünschte Zellzahl}}{(\text{Vorhandene Zellzahl} / \text{ml})}$$

Beispiel: 12-Well Platte mit je 1.000 Zellen pro Well:

Zuerst wurde errechnet, wie viele Zellen insgesamt für alle Wells der Platte benötigt wurden. Dabei wurde sicherheitshalber für drei Wells mehr geplant,

falls beim Pipettieren ein Fehler vorkam. In diesem Fall waren das 1.000 Zellen x (12 + 3) Wells = 15.000 Zellen. Diese 15.000 Zellen mussten in einem Falcon in 15 ml Medium vorliegen, um danach in jedes Well 1 ml Zellsuspension geben zu können. Für dieses Beispiel wurden als Zellzahl in der Zellkulturflasche 350.000 Zellen pro ml angenommen. Folgende Rechnung wurde aufgesetzt:

$$\frac{15.000 \text{ Zellen / Well}}{(350.000 \text{ Zellen / ml})} = 0,0429 \text{ ml} = 42,9 \mu\text{l}$$

Folglich mussten 42,9 μl Zell-Mediumssuspension in einem Falcon mit (15 ml - 42,9 μl) Medium gemischt werden. Handelte es sich bei dem errechneten Wert um eine Menge unter 100 μl , wurde eine Verdünnungsreihe angelegt. So wurden Ungenauigkeiten beim Pipettieren mit μl -Pipetten umgangen. Eine 1:10 Verdünnung bedeutet, dass 1 ml der Zell-Mediumslösung aus der Zellkulturflasche mit 9 ml Medium verdünnt wurde. Nach der Verdünnung wurden statt 42,9 μl Zell-Mediumslösung 429 μl in ein Falcon mit (15 ml - 429 μl) Medium pipettiert und resuspendiert.

Anschließend wurde, mit Hilfe des Multistepers, in alle Wells und Petrischalen 1 ml Zell-Mediumslösung aus dem Falcon gegeben. Danach wurde jedes Well auf insgesamt 2 ml und jede Petrischale auf 13 ml mit Medium aufgefüllt. Durch schwenken der Platten in Form einer „8“ wurden die Zellen gleichmäßig in den Wells und Petrischalen verteilt. Alle angefertigten Versuchsplatten bzw. Petrischalen kamen für ca. 24 Stunden in den Inkubator, bevor sie bestrahlt wurden. In dieser Zeit konnten die Zellen zwar am Boden der Platten bzw. Schalen anhaften, jedoch keine Zellteilung durchführen.

Nach der Bestrahlung verblieben die Platten für mindestens sechs Zellteilungen im Inkubator. Dadurch bestanden die gebildeten Kolonien aus über 50 Zellen. Diese Anzahl an Mitosen ist nötig, um alle Tumorzellen ausfindig zu machen, die nach der Bestrahlung unter den gegebenen Wachstumsbedingungen noch in der Lage sind, sich unendlich oft zu teilen (Schmitz, 2011, S. 240). Maximal wurden die Zellen so lange inkubiert, bis die Kontrollen eine ausreichend hohe Anzahl an Kolonien für eine sinnvolle Auswertung hatten. Dies war bei allen drei Zelllinien nach 21 Tagen der Fall.

3.2.2.2 Fixieren und Färben

Zum Fixieren wurde zuerst das Medium der einzelnen Wells abgesaugt. Danach wurde mit 1 ml PBS pro Well gewaschen. Nach Entfernung des PBS wurden ca. 2 ml 100 prozentiges Ethanol in jedes Well pipettiert und für 30 Minuten belassen. Dies stoppte die Zellteilung und fixierte die Kolonien. Zum anschließenden Färben wurden ca. 2 ml Giemsa Lösung in jedes Well pipettiert und diese für 30 Minuten abgedeckt. Danach wurde das Giemsa abgesaugt und die Platten mit destilliertem Wasser vorsichtig ab gespült. Zum Trocknen wurden die Platten für ca. 24 Stunden gelagert. Die Färbung erleichterte das Auszählen der Kolonien.

3.2.2.3 Auswertung der Koloniebildungstests

Für die Auszählung der Kolonien wurden die fixierten und gefärbten 12 Well Platten und die Petrischalen mit Hilfe des GelCount™ (Oxford Optronix Ltd.) eingelesen und Fotos am Computer erstellt. Mit der GelCount Software (Version 1.1.8.0) konnten die Kolonien markiert und gezählt werden. Abb. 4 zeigt gezählte Tumorzellkolonien.

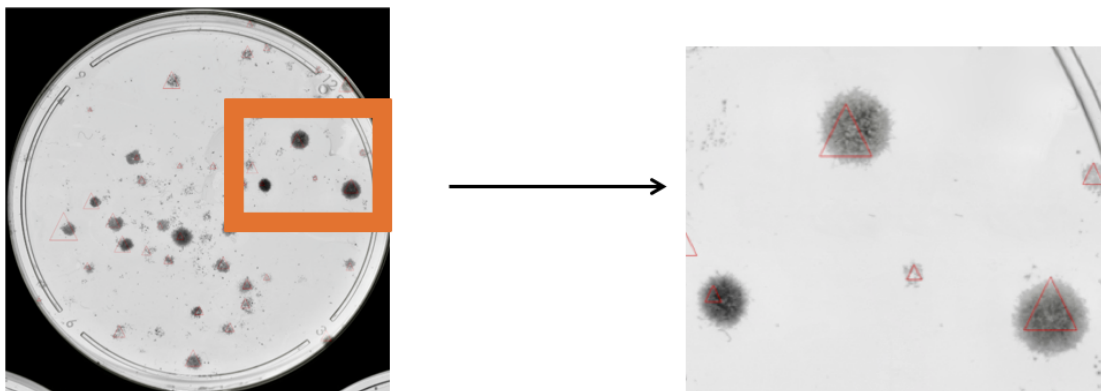


Abb. 4: Fixierte Tumorzellkolonien des Koloniebildungstests 21 Tage nach Bestrahlung.

Die roten Dreiecke markieren gezählte Kolonien (bearbeitet).

Aus den ermittelten Zahlen konnte die Ausplattierungseffizienz (plating efficiency, PE) jeder Zelllinie errechnet werden. Sie beschreibt die Rate an Zellen einer unbestrahlten Kontrolle, die nach Ablauf des Versuchszeitraumes eine Kolonie gebildet haben. Die Rechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$PE = \frac{\text{Anzahl der gezählten Kolonien}}{\text{Anzahl an ausgesäten Zellen}} \times 100\%$$

Aus allen technischen Replikaten der Kontrollen einer Zelllinie wurde die Plattierungseffizienz errechnet. Danach wurde der arithmetische Mittelwert der Plattierungseffizienz samt Standardabweichung gebildet.

Nach der Bestrahlung konnten sich in den bestrahlten Versuchsreihen weniger Kolonien bilden, als bei den unbestrahlten Kontrollen. Die Überlebensfraktion (surviving fraction, SF) beschreibt die Anzahl an klonogenen Zellen, die trotz Bestrahlung Kolonien bilden konnten. Sie wurde in Relation zur unbestrahlten Kontrolle (entspricht einem Wert gleich Eins) gesetzt. Die Überlebensrate errechnet sich wie folgt:

$$SF = \frac{\text{Anzahl der gezählten Kolonien}}{\text{Anzahl an ausgesäten Zellen} \times \text{PE der Kontrolle}}$$

(Franken et al., 2006) (Schmitz, 2011, S. 241).

Auch hier wurde der Mittelwert aus allen technischen Replikaten für jede untersuchte Zellzahl bei jeder Bestrahlungsdosis gebildet. Letztlich wurden die Mittelwerte mit Standardabweichung aller biologischen Replikate berechnet und graphisch in einer Überlebenskurve durch die erhaltenen Kurvenpunkte dargestellt. Dabei wird in einer halblogarithmischen Darstellung der Prozentsatz an überlebenden Zellen gegen die applizierte Bestrahlungsdosis aufgetragen. Die Überlebenskurven wurden mit Hilfe der GraphPad Prism Software durch das linear quadratische Modell generiert. Dadurch kann die biologische Wirkung von unterschiedlichen Strahlungsdosen verglichen werden. Grundlage ist folgende Formel:

$$\ln SF = -\alpha D - \beta D^2$$

Dabei sind „ α “ und „ β “ zellinienspezifische Komponenten. „D“ steht für die Bestrahlungsdosis in Gray. „ $-\alpha D$ “ steht für die lineare Komponente. Sie gibt die Anfangsneigung der Kurve wieder. „ $-\beta D^2$ “ steht als quadratische Komponente für die Kurvenkrümmung (Schulter) (Stöver, Feyer, 2018, S. 480). Aus den α - und β -Werten der einzelnen Zelllinien kann nach der Formel $-\alpha + \sqrt{(\alpha^2 - 4\beta \ln(0,5))} / (2\beta)$ die Strahlendosis ermittelt werden, bei der 50 % (D50) bzw. 10% (D10) der Tumorzellen überleben.

3.2.3 3D Hanging Drop Technik

3.2.3.1 GravityPLUS™ KIT

Bei der in dieser Arbeit verwendeten 3D Hanging Drop Methode handelte es sich um eine scaffold-freie Technologie zur Herstellung von Mikrosphäroiden. Die Sphäroide wurden in dem GravityPLUS™ Kit der Firma InSphero kultiviert. Bestandteile dieses Kits waren die GravityPLUS™ Hanging Drop Platte und die GravityTRAP™ Gewebe Auffang- und Versuchsplatte (Tissue Receiver and Assay Plate) (N.N., 2014).

Das Aussäen und die Sphäroidbildung der Zellen erfolgte in der 96 Well GravityPLUS™ Hanging Drop Platte. Diese bestand aus den in Abb. 5 dargestellten Einzelteilen: Der Bodenplatte mitsamt Reservoir, der Rasterplatte mit 12 x 8 = 96 Wells, dem Wasserkanal zur Kontrolle der Verdunstung, dem MicroClime Deckel und den SureDrop™ Hanging Drop Einsätzen für die Wells (N.N., 2014). Zusätzlich wurde ein Befeuchtungspad in die Bodenplatte eingelegt.

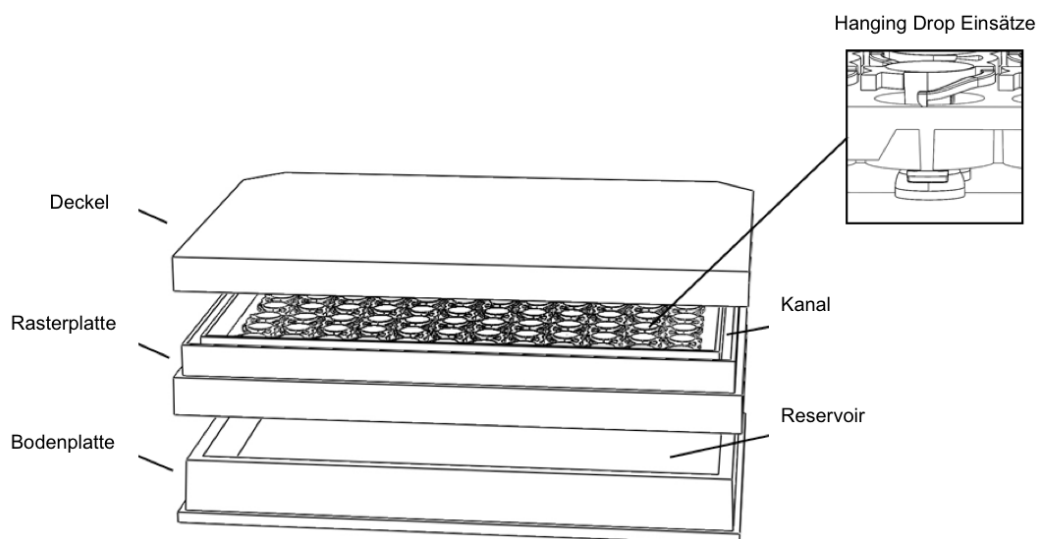


Abb. 5: Aufbau der GravityPlus™ Hanging Drop Platte. (N.N., 2014, bearbeitet).

Sobald sich die Sphäroide über drei Tage gebildet hatten, wurden sie in die GravityTRAP™ Platte (s. Abb. 6) überführt. Dabei handelte es sich um eine spezielle 96 Well Platte ohne anheftende Oberflächenbeschichtung. Die zwölf Spalten der Trap Platte waren mit den Zahlen 1 - 12 und die acht Zeilen mit den Buchstaben A - H gekennzeichnet. Die Sphäroide befanden sich in einer 1 mm

Durchmesser großen Kammer am Boden der Wells und wurden somit vor unbeabsichtigtem Ansaugen und Verlust beim Mediumswechsel geschützt. Dies erleichterte die Langzeitkultivierung. In dieser Lage waren die Sphäroide zentral im optisch klaren Feld am Boden der Wells lokalisiert, was automatisierte Bildgebungsverfahren ermöglichte (N.N., 2014) .

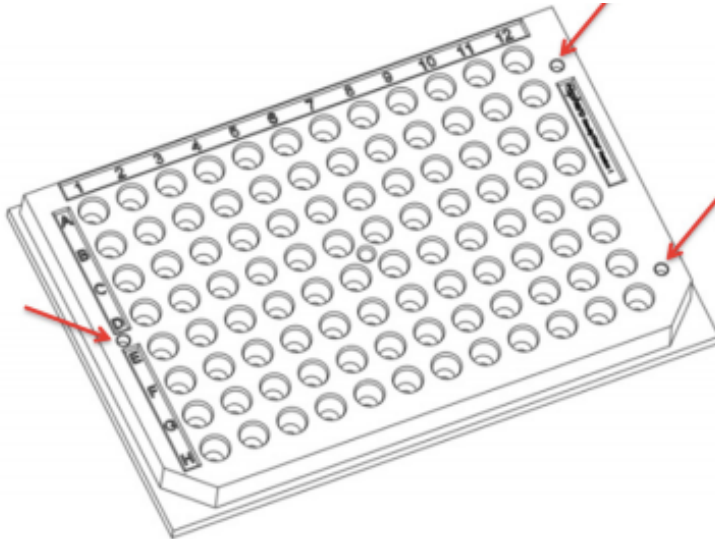


Abb. 6: 96-Well GravityTRAP™ Platte der 3D Hanging Drop Versuche.

Pfeile: Vertiefungen zur Fixierung der GravityPLUS™ Hanging Drop Platte bei dem Heruntertropfen der Sphäroide. 1 – 12: Nummerierung der Spalten, A – H: Beschriftung der Zeilen (N.N., 2014).

3.2.3.2 Versuchsablauf

Die Herstellung und Bestrahlung der 3D Sphäroide nahm, wie in Abb. 7 dargestellt, fünf Tage in Anspruch. Am ersten Tag wurden die Zell-Mediumssuspensionen als Tropfen in die GravityPlus™ Hanging Drop Platte ausgesät. Am vierten Tag wurden die Tropfen der GravityPlus™ Hanging Drop Platte in die GravityTRAP™ Platte heruntergetropft. Am fünften Tag wurden die Sphäroide bestrahlt.

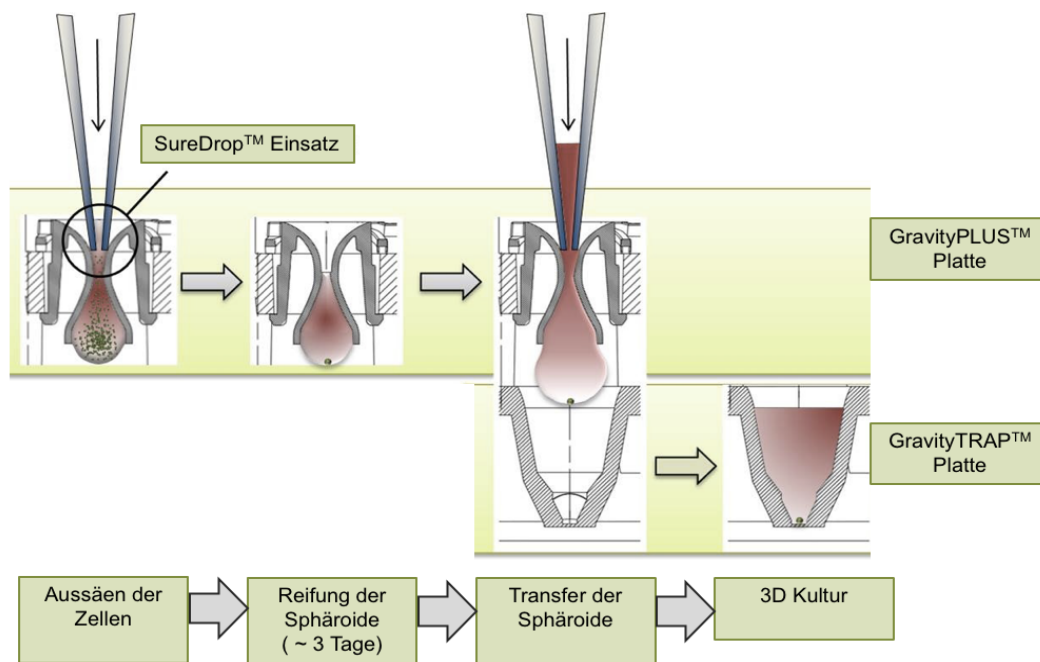


Abb. 7: Versuchsablauf der 3D Hanging Drop Methode (N.N., 2014).

Tag 1: Aussäen

Zuerst wurde eine Verdünnung von 0,5 x PBS in 12 ml H₂O pro Platte hergestellt. Darin wurde ein Fleecepad, welches zur Befeuchtung der Platten dient, mit Hilfe einer Pinzette für ca. fünf Minuten getränkt. Dieses Befeuchtungspad wurde dann in der Bodenplatte der GravityPlus™ Hanging Drop Platte platziert.

Die Herstellung einer Einzelzellsuspension sowie die Zellzählung wurden, wie unter Kapitel 3.2.1.2 beschrieben, vorgenommen.

Pro Zelllinie wurden drei unterschiedliche Zellzahlen untersucht (s. Tabelle 8). Dabei gab es von jeder Zellzahl mindestens acht technische Replikate auf einer

96 Well Platte. Für jede Bestrahlungsdosis (2 - 8 Gy) und die Kontrollgruppe mit 0 Gy wurde eine solche Platte angefertigt.

Tabelle 8: Verwendete Zellzahlen für die 3D Hanging Drop Versuche.

	Zellzahl 1	Zellzahl 2	Zellzahl 3
MDA-MB-361-GFP	500 Zellen	1.000 Zellen	2.000 Zellen
T-47D-GFP	200 Zellen	500 Zellen	1.000 Zellen
U-87 MG-GFP	200 Zellen	500 Zellen	1.000 Zellen

Vor dem Aussäen wurden die benötigten Zellzahlen und Volumina berechnet:

1) Der Tropfen eines Wells bestand aus 40 µl Zell-Mediumssuspension. Die für die Versuche benötigte Zellzahl (X_1) pro µl errechnete sich wie folgt:

$$X_1 = \frac{\text{Startzellzahl}}{40 \mu\text{l}}$$

2) Das benötigte Volumen für den gesamten Versuch (V_1) ergab sich aus folgender Rechnung:

$$V_1 = 40 \mu\text{l} \times (\text{Anzahl der Wells}) \times (\text{Anzahl der Platten})$$

Zu dem benötigten Volumen (V_1) wurden 5 ml Medium addiert (erweitertes benötigtes Volumen V_2), um das Aufziehen von Luft in der Multipipette zu verhindern.

$$V_2 = 40 \mu\text{l} \times (\text{Anzahl der Wells}) \times (\text{Anzahl der Platten}) + 5 \text{ ml Medium}$$

3) Die für die Versuchsdurchführung benötigte Gesamtzellzahl (X_{ges}) errechnete sich aus:

$$X_{\text{ges}} = \text{Zellen pro } \mu\text{l} (X_1) \times \text{erweitertes benötigtes Volumen} (V_2)$$

4) Die gezählten Zellen der Zellkulturflasche wurden in neuem Medium resuspendiert und lagen in diesem Zell-Medium Gemisch (X_{ZK}) wie folgt vor:

$$X_{ZK} = \frac{\text{gezählte Zellzahl}}{\text{neues Medium [ml]}}$$

5) Die benötigte Zellsuspension (V_{ben}) errechnete sich folgendermaßen („Wollen“ durch „Haben“):

$$V_{ben} = \frac{\text{benötigte Gesamtzellzahl } (X_{ges})}{\text{gezählte Zellen pro ml Medium } (X_{ZK})}$$

6) Der Bedarf an zusätzlichem Medium (V_M) zum erweiterten benötigten Volumen errechnete sich wie folgt:

$$V_M = \text{erweitertes benötigtes Volumen } (V_2) - \text{benötigte Zellsuspension } (V_{ben})$$

Beispielrechnung mit den U-87 MG-GFP Zellen:

Insgesamt wurden fünf Platten angefertigt: je eine für 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy und 8 Gy.

1) Als Startzellzahlen der U-87 MG-GFP Zelllinie wurden 200, 500 und 1.000 Zellen verwendet. Je Startzahl gab es acht Wells pro Platte. Die Rechnung wird anhand der Startzahl von 1.000 Zellen erläutert: Die benötigte Zellzahl X_1 pro μl war:

$$X_1 = \frac{1.000 \text{ Zellen}}{40 \mu\text{l Medium}} = 25 \text{ Zellen}/\mu\text{l}$$

2) Das erweiterte benötigte Volumen (V_2) an Medium war:

$$V_2 = 40 \mu\text{l} \times 8 \text{ Wells} \times 4 \text{ Platten} + 5 \text{ ml Medium} = 6.280 \mu\text{l}$$

3) Die Gesamtzellzahl (X_{ges}) ergab sich wie folgt:

$$X_{ges} = 25 \frac{\text{Zellen}}{\mu\text{l}} \times 6.280 \mu\text{l} = 157.000 \text{ Zellen}$$

4) Die vom Coulter Counter gezählte Zellzahl betrug beispielsweise 160.000 Zellen pro ml. Vorhanden waren im Falcon insgesamt 10 ml. Diese

wurden in weiteren 5 ml Medium resuspendiert. Die gezählten Zellen der Zellkulturflasche in 1 ml errechneten sich mit folgender Formel:

$$X_{ZK} = \frac{\frac{160.000}{ml} \times 10 ml}{5 ml} = 320.000 \text{ Zellen/ml}$$

5) Die benötigte Zellsuspension (XZS) errechnete sich durch:

$$X_{ZS} = \frac{157.000 \text{ Zellen}}{320.000 \text{ Zellen/ml}} = 0,491 \text{ ml} = 491 \mu\text{l}$$

6) Der Bedarf an zusätzlichem Medium (V_M) zum erweiterten benötigten Volumen (V_2) war:

$$V_M = 6.280 \mu\text{l} - 491 \mu\text{l} = 5.789 \mu\text{l}$$

Nach den Berechnungen für jede Startzellzahl jeder Zelllinie wurden die gut resuspendierten Zellsuspensionen mit dem zusätzlichen Medium auf das erweiterte benötigte Volumen gebracht und in das Reservoir überführt. Mit Hilfe der Multipipette wurden je 40 μl des Zell-Medium Gemischs pro Well in die GravityPlus™ Hanging Drop Platte ausgesät. Dazu wurde die Pipette senkrecht auf die Inlets gesetzt und leicht angedrückt. Die Zellen im Reservoir wurden während des Aussäens regelmäßig unter Vermeidung von Schaumbildung resuspendiert. Nach dem Aussäen wurde der Deckel aufgesetzt. Die Platten wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ für drei Tage inkubiert.

Tag 4: Heruntertropfen

Zur Vorbereitung des Heruntertropfens wurde das benötigte Medium warmgestellt. Pro Well mussten 70 μl Medium im Reservoir vorgelegt werden. Die Menge des benötigten Mediums (unter Berücksichtigung von 5 ml Medium Sicherheit) errechnete sich nach folgender Formel:

$$3 \text{ Startzellzahlen} \times 8 \text{ Wells} \times 5 \text{ Platten} \times 70 \mu\text{l} \text{ Medium} + 5 \text{ ml} \text{ Medium} = 13,4 \text{ ml}$$

Nach Abnahme des Deckels von der GravityPlus™ Hanging Drop Platte mit den Inlets wurde diese durch drei seitliche Vertiefungen auf der Trap-Platte fixiert. Mittels der achter Multipipette wurden dann durch die Inlets der

GravityPlus™ Hanging Drop Platte 70 µl Medium pro Well abgegeben und die Tropfen zum Fallen in die Trap-Platte gebracht. Danach wurde mit 70 µl Luft nachpipettiert, um das komplette Medium in die untere Trap-Platte zu überführen. Eventuell vorhandene Luftblasen wurden mit einer 10 µl Spritze zum Platzen gebracht. Anschließend wurde der Erfolg des Transfers unter dem Mikroskop beurteilt, bevor die Platten bei 150 x g bei Raumtemperatur für zwei Minuten zentrifugiert wurden. Der MicroClima Deckel wurde mit 8 ml destilliertem Wasser gefüllt und aufgesetzt. Die Aufbewahrung der Platten erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂.

Tag 5: Bestrahlung

24 Stunden nach dem Heruntertropfen wurden die Sphäroide bestrahlt (s.o.). Dieser Zeitpunkt stellte Tag 0 der Versuchsreihe dar.

Mediumswechsel

An Tag 6 und an Tag 12 nach Bestrahlung wurde ein Mediumswechsel in den Trap-Platten durchgeführt. Um die Sphäroide nicht zu beschädigen wurde die Pipettenspitze auf den Vorsprung in den Wells abgesetzt und das Medium langsam, bis auf einen Rest von ca. 5 µl, abgesaugt. Danach wurden in jedes Well 100 µl neues Medium mit einer Geschwindigkeit von 50 µl / Sek. pipettiert. Auch hierzu wurde die Pipettenspitze wieder auf dem Vorsprung in den Wells platziert (s. [Abb. 8](#)) (N. N., 2014).

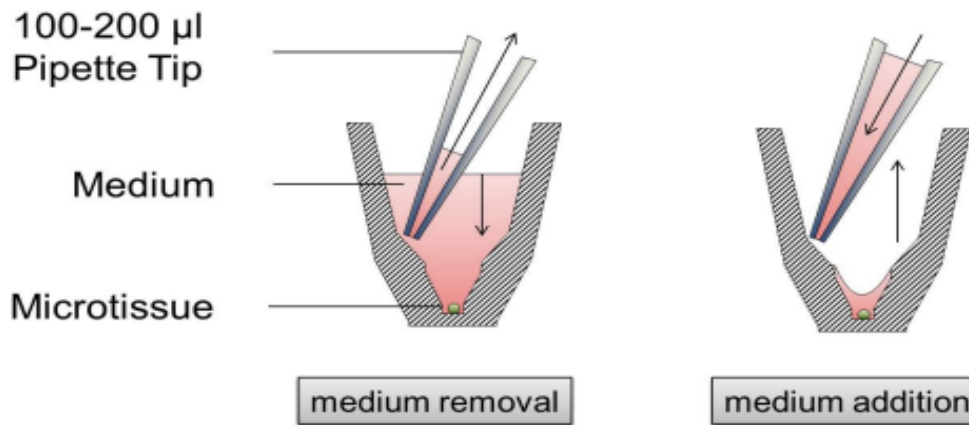


Abb. 8: Mediumswechsel in der Trap-Platte des 3D Hanging Drop Versuchs (N.N., 2014).

3.2.3.3 Fotografieren der 3D Hanging Drops

Zur Dokumentation und Auswertung wurden die fünf 3D Hanging Drop Platten mit dem Operetta Imaging System von Perkin Elmer (s. Abb. 9) an den Tagen 0, 3, 6, und 10 fotografiert. Die verwendete Software war „Harmony 3.5“.

Nach Anschalten des Lasers am Operetta Imaging System und dem Start der Harmony Software wurde jeweils eine Platte in das Gerät eingespannt. Danach wurden die Deckel geschlossen und im Reiter „Setup“ das Experiment ausgewählt. Nun konnten die Wells ausgewählt werden, die fotografiert werden sollten. Mit dem Reiter „Run Experiment“ wurde das Plattendesign mit den Informationen zu Zelllinien und Zellzahlen in den jeweiligen Wells geladen und der Plattenname eingegeben. Durch „Start“ wurden die Messungen begonnen. Es wurden ein Hellfeld- und ein Laserbild angefertigt. Für das Laserbild wurden als Emissionswellenlänge $E_m \lambda = 509 \text{ nm}$ und als Exzitationswellenlänge $E_x \lambda = 488 \text{ nm}$ verwendet. Beide Bilder wurden im JPG-Format gespeichert und auf dem Laborserver abgelegt. Nacheinander wurden alle zu messenden Platten eingelegt und die Plattennamen notiert. Unter dem Reiter „Image Analysis“ konnten die Platten markiert und unter dem Reiter „Overview“ (rechte Maustaste) ausgewählt werden. Danach folgte die Evaluation mit der Harmony Software und Excel.

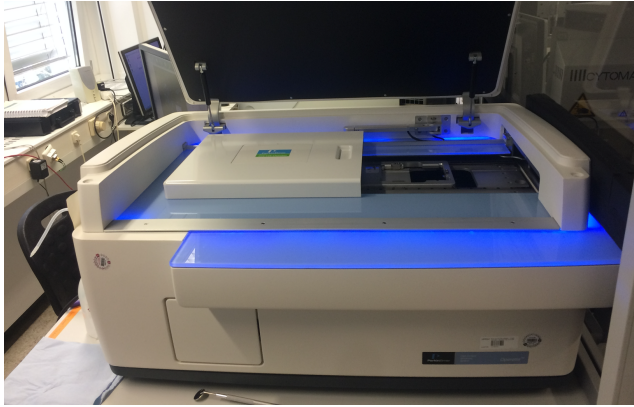


Abb. 9: Operetta Imaging System.

3.2.3.4 Auswertung der 3D Hanging Drop Versuche

Von der Auswertung wurden die äußeren Zeilen, sowie die erste und letzte Spalte jeder 96 Well Platte ausgeschlossen, da das Wachstum der Sphäroide in diesen Wells aufgrund der gesteigerten Verdunstung des Mediums geringer war. Ausgewertet wurden die inneren 60 Wells (96 - 36).

Mit Hilfe der Harmony Software wurden die Bilder in definierten Schritten aufgeschlüsselt und die benötigten Parameter zur Auswertung gewonnen. Die Einzelschritte wurden nach folgendem Schema (s. Tabelle 9) vorgenommen:

Tabelle 9: Auswertung der Sphäroidfläche durch die Harmony Software.

Schritt 1	Aufsuchen der Sphäroidfläche [μm^2] (Image Region Area)
Schritt 2	Errechnen der morphologischen Eigenschaften
Schritt 3	Errechnen der Intensitätseigenschaften
Schritt 4	Wahl des zu untersuchenden Bereichs
Schritt 5	Erneute Ermittlung der Intensitätseigenschaften
Schritt 6	Errechnung der Ergebnisse für die grün fluoreszierende Zellpopulation

Am Ende dieser sechs Schritte ergab sich eine Tabelle mit allen gemessenen Parametern. Anschließend wurden die Daten in eine Excel-Datei überführt. Die Tabelle bestand aus der Zuordnung der verwendeten Zelllinie zu den untersuchten Wells auf der 96 Well Platte samt ausgesäter Zellzahl und der Image Region Area.

Von jeder Zelllinie gab es je eine Excel-Tabelle pro Tag (0, 3, 6, 10) und pro Dosis (0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy). Anhand der einzelnen Bilder der Sphäroide konnte in der Tabelle überprüft werden, ob der von der Software ermittelte Wert der Sphäroidfläche auch dem zu messenden Sphäroid entsprach. Fehlerquellen für die Messung waren z. B. zwei kleine Sphäroide oder Luftblasen im Well. In diesem Fall wurden die betroffenen Wells von der Auswertung ausgeschlossen.

Quantifizierung der Sphäroidfläche und T-Test

An jedem Tag einer Messung wurde aus den Sphäroidflächen der sechs technischen Replikate jeder Zellzahl einer Zelllinie der arithmetische Mittelwert (MW) berechnet. Um das genaue Wachstum der Sphäroide abhängig von ihrer Bestrahlungsdosis über die Zeit bestimmen zu können, wurden die Mittelwerte aller Sphäroide an jedem Tag einer Messung in ein Verhältnis zu ihrer eigenen Anfangsgröße an Tag 0 gesetzt. Danach wurden die Mittelwerte der Sphäroidflächen für jede Dosis (x) an jedem Tag einer Messung (d_x) auf die unbestrahlte Kontrolle normiert:

$$\frac{((x)\text{Gy}, d_x)}{((x)\text{Gy}, d_0)} \times ((0)\text{Gy}, d_0)$$

Für die finale Auswertung wurden die an Tag 10 erhobenen Werte verwendet. Die Mittelwerte der Sphäroidflächen der einzelnen biologischen Replikate an Tag 10 wurden auf die Mittelwerte der jeweiligen unbestrahlten Kontrolle normiert:

$$\frac{(\text{MW Versuch 1}, d_{10}, (x)\text{Gy})}{(\text{MW Versuch 1}, d_{10}, 0\text{Gy})}$$

Die Kontrolle wurde bei jedem biologischen Replikat als „1“ definiert.

Daraufhin wurde aus den normierten Mittelwerten aller biologischen Replikate ein Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet.

Mit Hilfe des T-Tests wurde anschließend die Signifikanz in der Wachstumsreduktion nach Bestrahlung über alle biologischen Replikate berechnet. Es folgte eine graphische Darstellung der Sphäroidgröße der einzelnen Zelllinien am Endpunkt (Tag 10) in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosen.

3.2.3.5 Korrelationsberechnung

Mit Hilfe der Korrelationsrechnung von VassarStats.net ließ sich die Stärke des linearen Zusammenhangs zwischen den zwei Variablen „Strahlensensibilität der Tumorzellen im 2D CFA“ (gemessen anhand der Überlebensfraktion) und „Strahlensensibilität der Tumorzellen in der 3D Hanging Drop Methode“ (gemessen anhand des Sphäroidwachstums) untersuchen.

Die Formel für Korrelationsberechnungen lautet:

$$r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

(Galata, Scheid, 2012, S. 82 ff.) (Schwarz, 2020).

„n“ ist die Anzahl der zu korrelierenden Werte. In diesem Fall waren das fünf Werte, je einer für 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy und 8 Gy. „ x_i “ steht für die jeweilige Strahlensensibilität im 3D Hanging Drop Versuch (gemessen anhand des Sphäroidwachstums). „ y_i “ steht für die Strahlensensibilität im Koloniebildungstest (gemessen anhand der Überlebensfraktion). „ \bar{x} “ gibt den arithmetischen Mittelwert aller x -Werte (Sphäroidgröße) an, „ \bar{y} “ den arithmetischen Mittelwert aller y -Werte (SF).

Der Korrelationskoeffizient „ r “ nach Pearson kann Werte zwischen -1 und 1 annehmen. Ein Wert von $r = 0$ bedeutet, dass kein linearer Zusammenhang zwischen beiden Variablen besteht. Wenn $r = \pm 1$ ist, dann sind beide Variablen perfekt korreliert. Die „ x_i “ und „ y_i “ Werte liegen genau auf einer Geraden mit negativer oder positiver Steigung. Ist $r > 0$, liegt ein positiver linearer Zusammenhang vor, d. h. größere Werte der ersten Variablen gehen mit

größeren Werten der zweiten Variablen einher. Ist $r < 0$, stehen höhere Werte der ersten Variablen niedrigeren Werten der zweiten Variablen gegenüber (und umgekehrt). In dem Fall besteht ein negativer linearer Zusammenhang (Galata, Scheid, 2012, S. 82 ff.) (Schwarz, 2020).

Als Gütemaß zur Beschreibung des linearen Zusammenhangs wurde das R^2 bestimmt. Ein Wert von $R^2 = 1$ bedeutet eine perfekte lineare Regression, ein Wert von $R^2 = 0$ hingegen bedeutet keine lineare Regression (Rottmann et al., 2018)

3.3 Statistik

Für jede Versuchsreihe (CFA und 3D Hanging Drops) wurden mindestens zwei unabhängige biologische Replikate analysiert. Bei allen in dieser Arbeit dargestellten bzw. aufgeführten Werten handelt es sich, soweit nicht anders gekennzeichnet, um arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler.

Die Korrelationsanalysen zum Vergleich der 2D Überlebensfraktion mit dem 3D Sphäroidwachstum wurden mit Hilfe der VassarStats.net Website für statistische Berechnung durchgeführt (Lowry, 2019). Die Varianzanalyse (engl. analysis of variance, „anova“) und die Überlebenskurven nach dem linear quadratischen Modell wurden mit GraphPad Prism 8 erstellt. Alle anderen Berechnungen inklusive T-Test wurden mit Microsoft Excel 2007 durchgeführt. Anova und T-Test wurden zur Bestimmung der Signifikanz von Unterschieden im Sphäroidwachstum und dem klonogenen Überleben verwendet. Für das Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von $p \leq 0,05$ als signifikant angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Koloniebildungstests

Um die Strahlensensibilität der drei verwendeten Zelllinien (MDA-MB-361-GFP, T-47D-GFP, U-87 MG-GFP) zu bestimmen wurde ein Koloniebildungstest durchgeführt. Dafür wurden unterschiedliche Zellzahlen 24 Stunden nach Aussaat mit 0 - 8 Gy bestrahlt und die Koloniebildung nach 21 Tagen evaluiert. Diese Ergebnisse stellten den ersten Teil der in Kapitel 4.3. aufgestellten

Korrelation der zwei verglichenen Labormodelle dar. Alle getesteten Zelllinien bildeten Kolonien im CFA, s. Abb. 10.

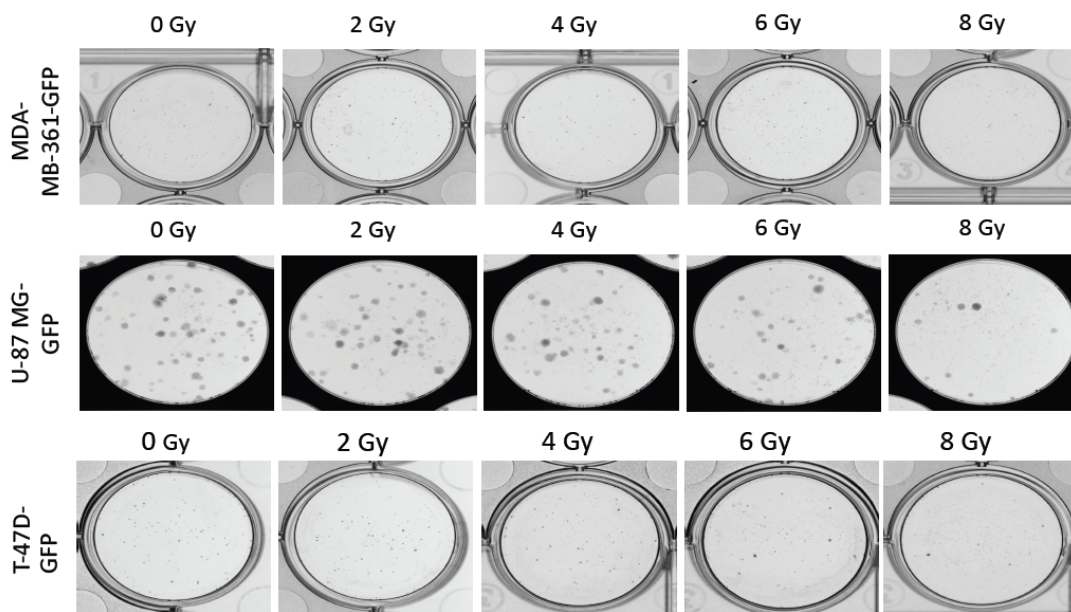


Abb. 10: Koloniebildung im CFA.

In Tabelle 10 wird die Verringerung des Zellüberlebens (Überlebensfraktion) der verwendeten Zelllinien mit steigender Bestrahlungsdosis (Gy) dargestellt.

Tabelle 10: Überlebensfraktionen (SF) der verwendeten Zelllinien im Bezug auf die Bestrahlungsdosis.

Zelllinie	SF bei 0 Gy	SF bei 2 Gy	SF bei 4 Gy	SF bei 6 Gy	SF bei 8 Gy
MDA-MB-361-GFP	100 %	62 %	29 %	10 %	4 %
T-47D-GFP	100 %	63 %	16 %	6 %	2 %
U-87 MG-GFP	100 %	62 %	32 %	14 %	5 %

Die Überlebenskurven der untersuchten Zelllinien nach dem linear quadratischen Modell zeigt Abb. 11. Das klonogene Überleben der MDA-MB-361-GFP Zelllinie sank signifikant mit steigender Dosis ($p=0,0185$). Der gleiche Effekt zeigte sich bei der U-87 MG-GFP Zelllinie ($p=0,0002$) und der T-47D-GFP Zelllinie ($p=<0,0001$).

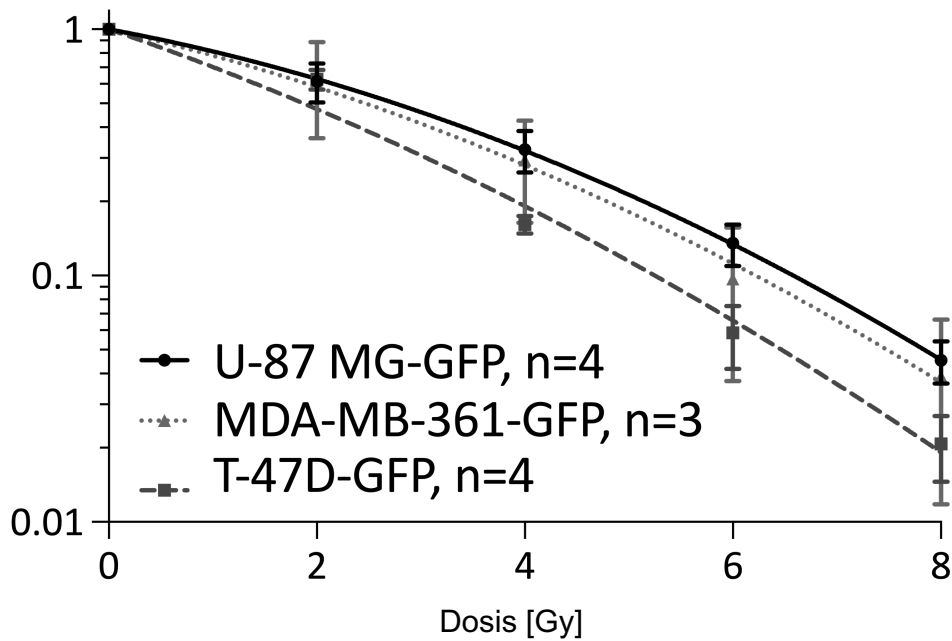


Abb. 11: Überlebenskurven der Tumorzellen im Koloniebildungstest.

Tabelle 11 gibt einen Überblick über die α - und β -Werte der einzelnen Zelllinien. Die daraus generierten D50 und D10 Werte zeigten sich am höchsten für die U-87 MG-GFP Zelllinie (2,75 Gy und 6,58 Gy). Niedrigere Werte zeigten sich bei der MDA-MB-361-GFP Zelllinie (2,47 Gy und 6,22 Gy) und bei der T-47D-GFP Zelllinie (1,87 Gy und 5,52 Gy).

Tabelle 11: Alpha und beta Werte des linear quadratischen Modells der getesteten Zelllinien sowie deren D50 und D10 Werte.

	α	β	D50	D10
U-87 MG-GFP	0,1812	0,02562	2,75 Gy	6,58 Gy
MDA-MB-361-GFP	0,2221	0,02382	2,47 Gy	6,22 Gy
T-47D-GFP	0,3324	0,02022	1,87 Gy	5,25 Gy

4.2 Ergebnisse der 3D Hanging Drop Versuche

Auch die 3D Hanging Drop Methode wurde verwendet, um die Strahlenempfindlichkeit der drei verwendeten Zelllinien (MDA-MB-361-GFP, T-47D-GFP, U-87 MG-GFP) zu bestimmen. Nach der in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Bestrahlung wurde das Wachstum der Sphäroide bis zum Endpunkt an Tag 10 beobachtet (s. Abb. 12) und ausgewertet. Diese Ergebnisse stellen den zweiten Teil der in Kapitel 4.3. aufgestellten Korrelation der zwei verglichenen Labormodelle dar.

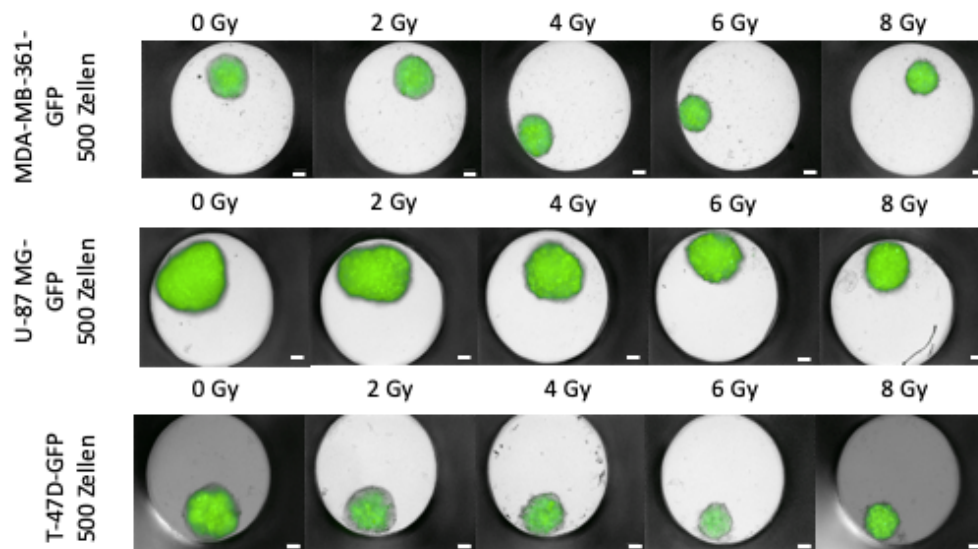


Abb. 12: 3D Hanging Drop Sphäroide der drei getesteten Zelllinien 10 Tage nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen. Skala: 100 μm .

Tabelle 12 zeigt den Vergleich des Wachstums der Sphäroide nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen an Tag 10.

Tabelle 12: Größe der 3D Sphäroide in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis 10 Tage nach Bestrahlung.

MDA-MB-361-GFP	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy
500 Zellen	100 %	91 %	83 %	74 %	69 %
1.000 Zellen	100 %	91 %	85 %	76 %	71 %
2.000 Zellen	100 %	95 %	89 %	83 %	78 %
T-47D-GFP	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy
200 Zellen	100 %	99 %	83 %	83 %	70 %
500 Zellen	100 %	87 %	79 %	73 %	65 %
1.000 Zellen	100 %	97 %	88 %	88 %	79 %
U-87 MG-GFP	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy
200 Zellen	100 %	87 %	67 %	49 %	44 %
500 Zellen	100 %	94 %	81 %	65 %	56 %
1.000 Zellen	100 %	95 %	86 %	74 %	69 %

Der Prozentsatz gab Aufschluss über die Größe der bestrahlten Sphäroide in Bezug auf die unbestrahlte Kontrolle, errechnet aus den Mittelwerten der biologischen Replikate. Folgende Ergebnisse konnten beobachtet werden:

- Die Sphäroidgröße war abhängig von der Zelllinie (s. Abb. 12).
- Die Sphäroidgröße pro Dosis war abhängig von der Startzellzahl (s. Abb. 13).
- Je höher die Dosis der Bestrahlung, desto weniger wuchsen die Sphäroide im Gegensatz zu ihrer Kontrolle (s. Abb. 14).

- Das Wachstum der MDA-MB-361-GFP 3D Sphäroide war 10 Tage nach Bestrahlung mit 4-8 Gy signifikant reduziert, unabhängig von der Startzellzahl (500, 1.000, 2.000). Bei der Startzellzahl von 500 und 1.000 Zellen zeigte sich bereits bei 2 Gy Bestrahlung signifikante Wachstumsretardierung. Bei der höchsten Startzellnummer war dies nicht signifikant, was möglicherweise an der zu schnellen Wachstumsrate der Sphäroide mit 2.000 Zellen lag (s. Abb. 14).
- 3D Sphäroide der T47-D-GFP Zelllinie präsentierten ein signifikant vermindertes Wachstum unabhängig von der Startzellzahl 10 Tage nach Bestrahlung mit 4 – 8 Gy (s. Abb. 14).
- Bei den 3D Sphäroiden der U-87 MG-GFP Zelllinie ergab sich ebenfalls eine signifikante Wachstumsreduktion bei allen Startzellzahlen 10 Tage nach Bestrahlung mit 2 – 8 Gy (s. Abb. 14).

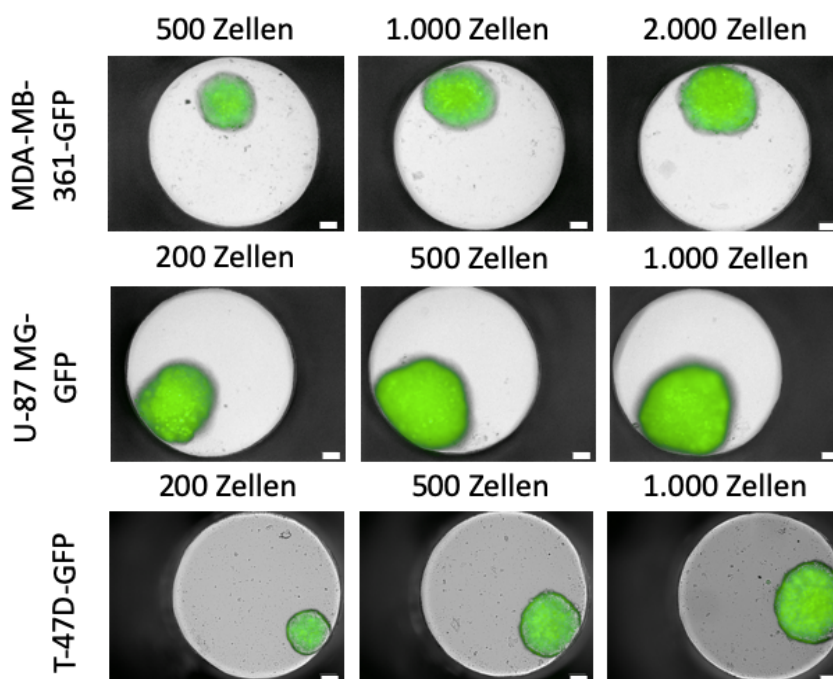


Abb. 13: Unterschiede in der Sphäroidgröße 10 Tage nach Scheinbestrahlung in Abhängigkeit der ausgesäten Startzellzahl der untersuchten Zelllinien. Skala: 100 μ m.

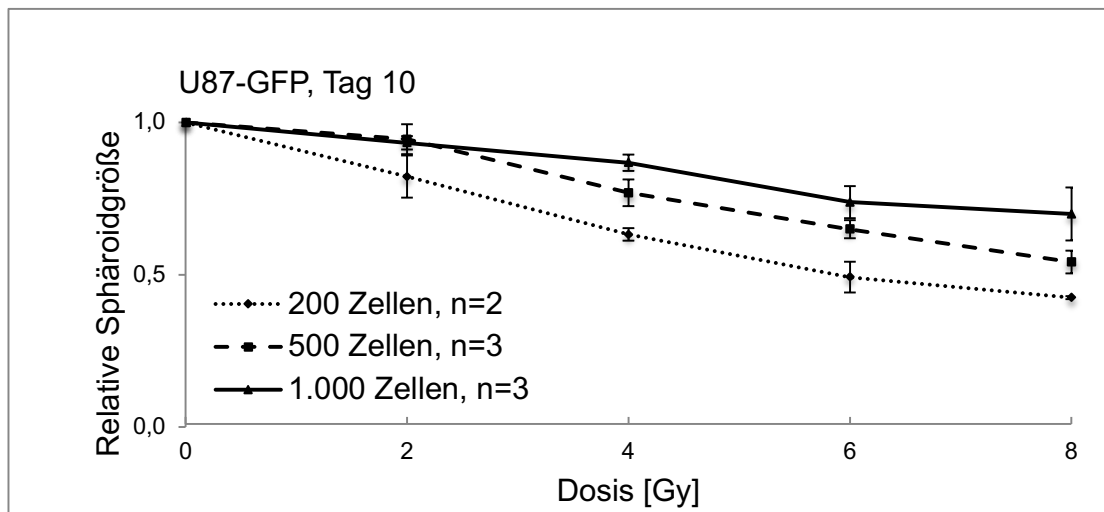
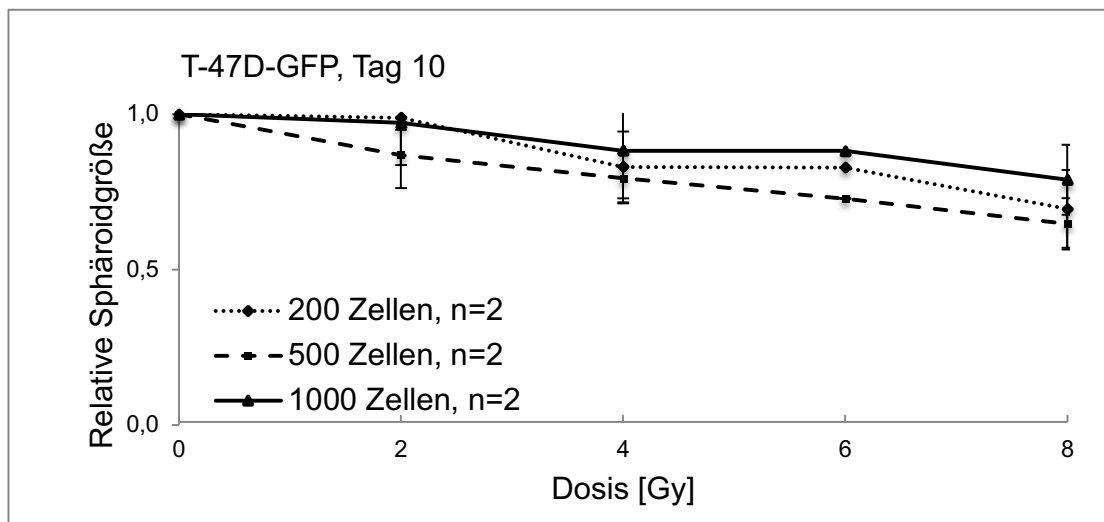
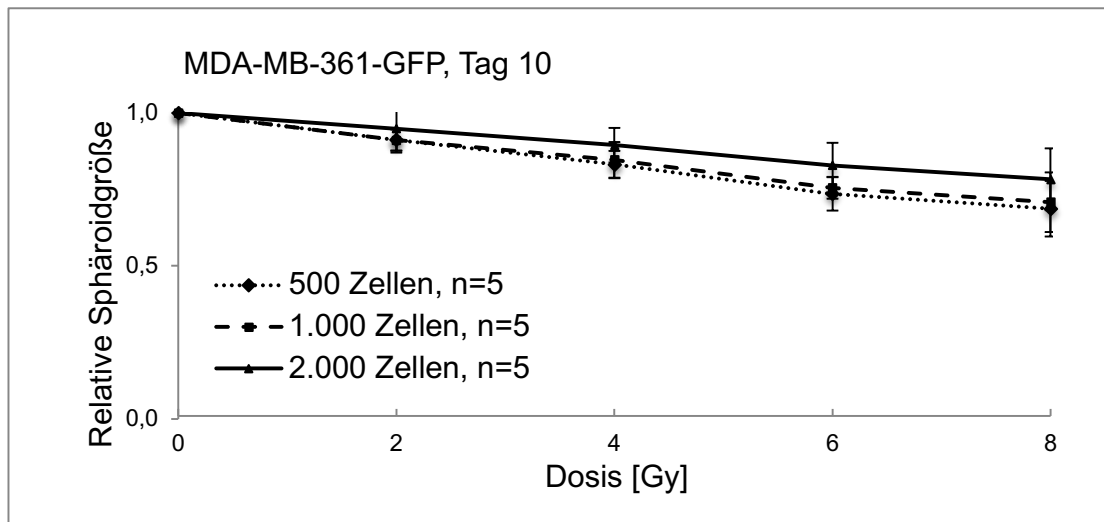


Abb. 14: Ergebnisse des 3D Hanging Drop Versuchs.

In den halblogarithmischen Graphen wurde die Größe der Zell-Sphäroide 10 Tage nach Bestrahlung in Abhängigkeit zur Bestrahlungsdosis dargestellt. n = Anzahl an biologischen Replikaten.

4.3 Korrelation der Ergebnisse der Koloniebildungstests und der 3D Hanging Drop Versuche

Der Koloniebildungstest gilt seit langem als Goldstandard zur Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit von Zellen. Die 3D Hanging Drop Methode ist ein neues Labormodell, welches noch nicht zur Bestimmung der Strahlensensibilität von Zellen etabliert ist (s. oben). Um zu testen, ob die 3D Hanging Drop Methode geeignet ist, die Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen mindestens genauso gut zu bestimmen, wie der konventionelle Koloniebildungstest, wurden in dieser Arbeit die Ergebnisse des Koloniebildungstests von drei verschiedenen Zelllinien mit den Ergebnissen der neuen 3D Hanging Drop Methode der gleichen Zelllinien auf Korrelation hin untersucht.

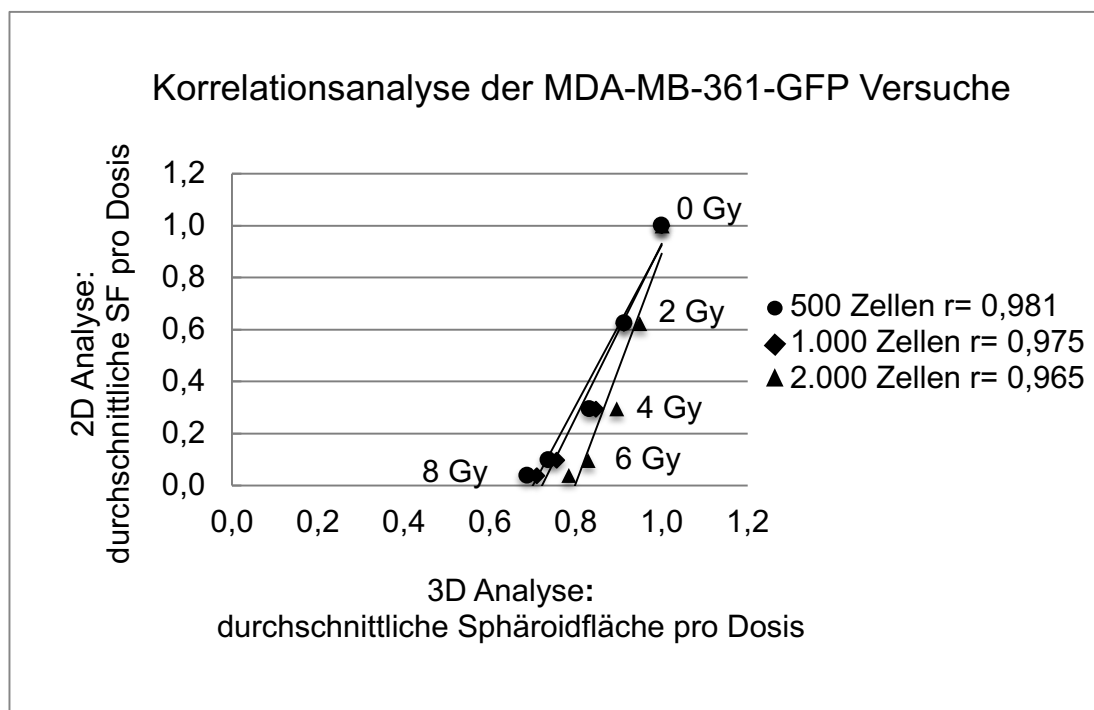
Die Korrelation zwischen den ermittelten Strahlensensibilitäten der verwendeten Zelllinien wurde anhand der normierten Mittelwerte der Sphäroidgrößen am Tag 10 in den 3D Hanging Drop Versuchen und der Überlebensfraktionen in den Koloniebildungstests errechnet. Tabelle 13 gibt einen Überblick über die errechneten Korrelationen. Alle Berechnungen zeigten eine stark positive Korrelation mit einem hohen Korrelationskoeffizienten r von $> 0,9$, unabhängig von der Startzellzahl oder der verwendeten Zelllinie. Das Gütemaß R^2 zeigte mit Werten von $\geq 0,8$ stets eine hohe lineare Regression. Das Signifikanzniveau lag immer unter dem angenommenen Wert von $p \leq 0.05$. Abb. 15 zeigt die einzelnen Korrelationsgeraden zwischen beiden Versuchsreihen je nach Zelllinie und Anfangszellzahl im 3D Versuch.

Tabelle 13: Korrelationen der Ergebnisse des CFA und der 3D Hanging Drop Methode.

r = Korrelationskoeffizient, R^2 = Gütemaß des linearen Zusammenhangs, p -Wert = Signifikanzniveau, SEE = Standardabweichung vom Schätzwert.

MDA-MB-361-GFP	r	R^2	p -Wert	SEE
500 Zellen	0,981	0,962	0,002	0,086
1.000 Zellen	0,975	0,951	0,002	0,102
2.000 Zellen	0,965	0,932	0,004	0,121

T-47D-GFP	r	R²	p-Wert	SEE
200 Zellen	0,901	0,811	0,019	0,214
500 Zellen	0,962	0,926	0,004	0,134
1.000 Zellen	0,916	0,839	0,015	0,198
U-87 MG-GFP	r	R²	p-Wert	SEE
200 Zellen	0,995	0,989	0,001	0,046
500 Zellen	0,956	0,914	0,006	0,132
1.000 Zellen	0,956	0,914	0,006	0,132



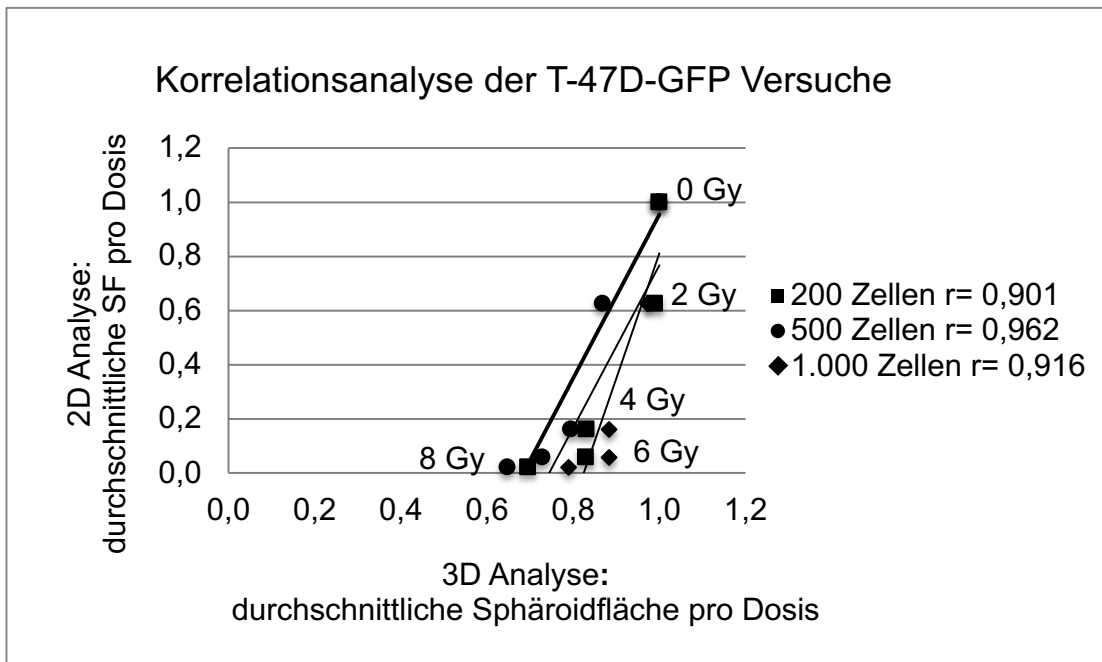
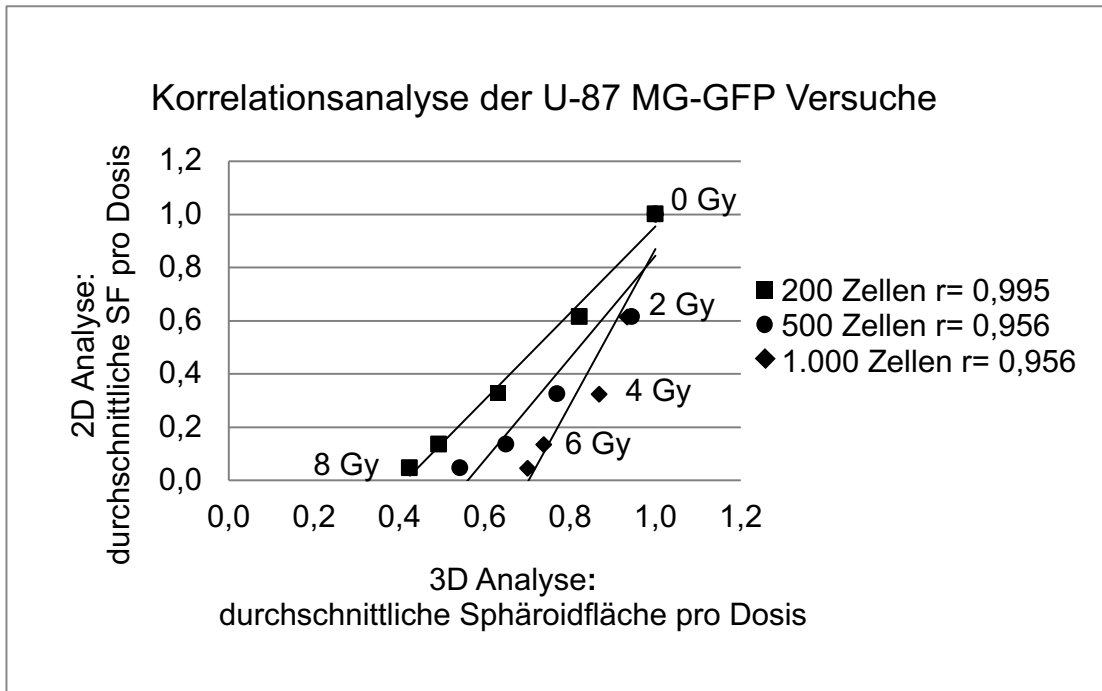


Abb. 15: Korrelationsgeraden der beiden Versuchsreihen.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Nach Durchführung von zwei Versuchsreihen, dem konventionellen Koloniebildungstest und der neuen 3D Hanging Drop Technik, wurden beide

Methoden hinsichtlich ihrer Vergleichbarkeit zur Bestimmung der Strahlensensibilität von Tumorzelllinien verglichen. Dafür wurden einerseits die Überlebenskurven der drei Tumorzelllinien MDA-MB-361-GFP, T-47D-GFP und U-87 MG-GFP nach Bestrahlung mit unterschiedlicher Dosis durch den Koloniebildungstest erhoben. Andererseits wurde mit dem 3D Hanging Drop Versuch getestet, wie sich das Wachstum der Tumorzellsphäroide nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Strahlendosen verändert. Die Ergebnisse beider Experimente wurden miteinander korreliert. Es zeigte sich bei allen getesteten Zelllinien eine starke Korrelation der erhobenen Werte. Damit wurde belegt, dass sich die 3D Hanging Drop Technik genauso gut eignet, um die Strahlensensibilität der getesteten Tumorzelllinien zu bestimmen, wie der konventionelle Koloniebildungstest.

5.2 Diskussion der Methoden

5.2.1 Diskussion des Koloniebildungstests

Als Vergleichsgrundlage der Ergebnisse der 3D Hanging Drop Methode dienen die Ergebnisse des konventionellen Koloniebildungstests. Dieser ist aktuell der Goldstandard zur Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen (Puck, Marcus, 1956) (Schmitz, 2011, S. 239). Die Zellen wachsen in diesem Modell in einem 2D Monolayer (Breslin, O'Driscoll, 2013). Ein Vorteil des Koloniebildungstests liegt in seiner einfachen Handhabung. Außerdem kann mit diesem Test nicht nur die Toxizität von Strahlung bestimmt werden, sondern es können auch die Auswirkungen einer Kombination von Chemotherapeutika und Bestrahlung auf das Zellüberleben gemessen werden (Franken et al., 2006). Ein Nachteil in der Anwendung der Methode ist, dass sie sehr zeit- und arbeitsintensiv ist und sich auch nicht auf alle Tumorzelllinien anwenden lässt (Anastasov et al., 2015) (Liu et al., 2015) (Schmitz, 2011, S. 239). Der größte Nachteil des Koloniebildungstests ist sein zweidimensionaler Aufbau. Durch Kultivierung der Zellen in einem Monolayer werden die im lebenden Organismus vorhandenen, dreidimensionalen, Zell-Zell- und Zell-EZM-Interaktionen vernachlässigt. Es zeigte sich, dass sich Zellen, die in einem Monolayer wachsen, in vielen Punkten von den Zellen *in vivo* unterscheiden.

Dazu gehören z. B. die Zell Morphologie, die Expression von Rezeptoren und Onkogenen, und die Zellarchitektur (Breslin, O'Driscoll, 2013).

Viele Jahre konnten Fortschritte in der Tumorthherapie durch diesen Test erzielt werden. In den letzten Jahren häufen sich jedoch Veröffentlichungen, die den Koloniebildungstest aufgrund der eingeschränkten Übertragbarkeit seiner *in vitro* Ergebnisse auf die Situation im lebenden Organismus (s. unten) kritisieren (Abbott, 2003) (Eke et al., 2016). Es könnte sein, dass der Koloniebildungstest aufgrund dieser Entwicklung schon bald an Bedeutung verlieren wird.

5.2.2 Diskussion des 3D Hanging Drop Systems

In dieser Arbeit wurde auch das 3D Hanging Drop System verwendet, um die Vitalität von Tumorzellen nach Bestrahlung zu messen. Dafür wurde das Wachstum der bestrahlten 3D Zellsphäroide mit dem der unbestrahlten Kontrolle verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die 3D Hanging Drop Methode eignet, um die Strahlensensibilität von Tumorzellen zu messen. Die 3D Hanging Drop Technik zeichnet sich durch eine einfache Handhabung aus und ist mit den standardmäßig vorhandenen Laborgeräten kompatibel (Anastasov et al., 2015) (Breslin, O'Driscoll, 2013). Durch die Möglichkeit des Einsatzes von 96 Well Platten und Multi-Channel Pipetten kann in kurzer Zeit eine Vielzahl an Versuchen durchgeführt werden. Ein Nachteil der Technik ist, dass nicht alle Tumorzelllinien Sphäroide bilden (Anastasov et al., 2015) (Vinci, 2012).

Eine andere, derzeit verwendete 3D Sphäroid Technik ist die „forced floating“ Methode. Dabei werden die Wells einige Tage vor Zugabe der Zellen mit einer Schicht aus poly-2-hydroxethyl methacrylate oder Agarose beschichtet. Dies hindert die Zellen daran, auf der Oberfläche der Wells anzuhafte. Durch anschließende Zentrifugation können sich Zellsphäroide bilden. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Brustkrebszelllinien eignen sich auch für diese einfache und günstige Methode. Ein Nachteil ist jedoch der höhere Zeitaufwand zur Beschichtung der Versuchsplatten bzw. der höhere Kostenaufwand beim Kauf von vorgefertigten Platten (Breslin, O'Driscoll, 2013).

Die 3D Matrix basierte Zellkultur ist eine weitere beliebte 3D Methode, vor allem für Brustkrebszellen. Die Tumorzellen können hier dreidimensional auf bzw. in einer EZM wachsen und mit ihr interagieren (Lee et al., 2007). Dadurch können die Zellen leichter die komplexe Struktur der Brustdrüse mit ihrem kommunizierenden Gangsystem aufbauen (Breslin, O'Driscoll, 2013). Vorteilhaft bei dieser Methode ist, dass man die Zusammensetzung der EZM, z. B. die Menge an Wachstumsfaktoren, variieren kann (Lee et al., 2007). Ein Nachteil ist, dass die EZM biologischen Ursprungs ist und deshalb die genaue Zusammensetzung der einzelnen Chargen variieren kann (Breslin, O'Driscoll, 2013). Außerdem sind die Anschaffungskosten für groß angelegte Medikamentenscreenings sehr hoch (Sodunke et al., 2007). In der Bestimmung der Radiosensibilität von Tumorzellen zeigt die 3D Hanging Drop Methode gegenüber der 3D Matrix Methode den Unterschied, dass nicht das klonogene Überleben der Tumorzellen durch Auszählung von Kolonien bestimmt wird (Eke et al., 2016). Vielmehr werden durch Quantifizierung des reduzierten Wachstums der Sphäroide nach Bestrahlung im Vergleich zu ihrer Kontrolle Rückschlüsse auf die Radiosensibilität der Tumorzellen gezogen.

Auch die „Microfluidic cell culture“ Plattform wurde für den Einsatz von 3D Kulturen weiterentwickelt. Dabei wird eine Zellsuspension über ein Feld, bestehend aus den sog. „micropillars“ (=Vertiefungen), gegeben. Die Zellen sammeln sich in den micropillars an, wachsen und bilden Zell-Zell-Interaktionen. Durch Zugabe einer Kollagenmatrix können die Zellen auch in Kommunikation mit der EZM treten. Der Einbau von Einlass- und Auslasswells in den Versuchsplatten erlaubt eine konstante Perfusion der Zellkultur mit Medium (Chen et al., 2011) (Tan et al., 2001). Diese Methode eignet sich auch für Hochdurchlaufscreenings und bedarf nur wenig Medium. Ein Nachteil dieser Technik ist die mangelnde Beeinflussbarkeit in der Formung und die Reproduzierbarkeit der Sphäroide (Breslin, O'Driscoll, 2013) (Chen et al., 2011) (Wu et al., 2010).

Für die Weiterentwicklung der in dieser Arbeit verwendeten 96 Well 3D Hanging Drop Technik von InSphero schlage ich vor, die unterschiedlichen 3D Methoden zu kombinieren, um deren Vorteile zu addieren. Beispielsweise könnte das Modell auf eine 384 Well Platte zur gleichzeitigen Durchführung von mehreren Versuchen erweitert werden. In der Methodik könnte eine Weiterentwicklung

des Imaging Systems und der Harmony Software eine exaktere Vermessung der Sphäroide ermöglichen, z.B. durch Vermessung der Sphäroide in drei Dimensionen. So könnte man nicht nur die Sphäroidfläche in μm^2 , sondern das ganze Volumen der Sphäroide in μm^3 bestimmen. Sinnvoll wäre es auch, in Folgeversuchen nicht nur die Reaktion von Zellen in Medium, sondern auch in EZM zu untersuchen. Tabelle 14 stellt die in dieser Arbeit verwendeten Methoden noch einmal gegenüber.

Tabelle 14: Vergleich des Koloniebildungstests mit der 3D Hanging Drop Methode.

	Koloniebildungstest	3D Hanging Drop Methode
Anwendung	Derzeitiger Goldstandard zur Bestimmung der Radiosensibilität (Puck, Marcus, 1956) (Schmitz, 2011, S. 239)	Verwendung bereits für Medikamentenscreenings (Lama et al., 2013), jedoch noch nicht etabliert für die Erforschung der Radiosensitivität Andere 3D Methoden werden für diesen Zweck schon verwendet (Eke et al., 2016)
Charakteristik	2D, spiegelt nicht die <i>in vivo</i> Situation des Tumors wieder (Abbott, 2003) (Eke et al., 2016)	3D, spiegeln die <i>in vivo</i> Situation des Tumors besser wieder (Abbott, 2003) (Eke et al., 2016)
Vorteile		Weniger zeitintensiv bei Aussäen und Auswertung durch Automatisierung (Hochdurchsatzverfahren) (Anastasov et al., 2015) (Breslin, O'Driscoll, 2013)
		Verschiedene Zellzahlen und Zelllinien können gleichzeitig auf einer 96 Well Platte untersucht werden (Anastasov et al., 2015)
		Hohe Reproduzierbarkeit (Tung et al., 2011) (Vinci, 2012)
	Kombination mit Medikamenten möglich (Franken et al., 2006)	Kombination mit Medikamenten möglich (Anastasov et al., 2015) (Tung et al., 2011)
Nachteile	Nicht alle Tumorzelllinien bilden Kolonien (Liu et al., 2015)	Nicht alle Tumorzelllinien bilden Sphäroide (Anastasov et al., 2015) (Vinci, 2012)
	Arbeits- und zeitintensiv (Schmitz, 2011, S. 240)	

5.3 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde validiert, dass das 3D Hanging Drop System die Strahlensensibilität von zwei Brustkrebszelllinien (MDA-MB-361-GFP, T-47D-GFP) und einer Glioblastomzelllinie (U-87 MG-GFP) genauso gut abbildet, wie der konventionelle Koloniebildungstest. Alle drei Zelllinien eigneten sich für die Durchführung dieser beiden Versuche. Sie formten feste Sphäroide und bildeten Kolonien. Sowohl am Korrelationskoeffizienten r als auch an den Korrelationsgeraden in Abb. 15 kann man sehen, dass die ermittelten Werte in den 2D und 3D Versuchen stets gut miteinander korrelieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit können den Ausgangspunkt für zukünftige 3D Hanging Drop Experimente bilden, in denen die getesteten Zelllinien einer Kombination aus Bestrahlung und Radiosensitizern ausgesetzt und die Effekte der Behandlung untersucht werden. Auch könnte man weitere Tumorzelllinien in die Untersuchungen mit einbeziehen. Sollten sich aus diesen Folgeexperimenten erfolgsversprechende Therapieoptionen ergeben, so könnte es sein, dass sich diese Therapien auch wirksamer in den Tierversuchen und klinischen Studien zeigen, als dies bei der Übertragung der Ergebnisse des Koloniebildungstests der Fall war.

5.4. Stand der Forschung und Ausblick

In verschiedenen Forschungsgruppen konnte gezeigt werden, dass sich Tumorzellen, die zweidimensional kultiviert wurden, anders verhielten und unterschiedlich auf eine Therapie reagierten, als dies in der dreidimensionalen Kultivierung der Fall war. Zum Beispiel zeigten Tumorzellen, die als Sphäroide kultiviert wurden, eine stärkere Metastasierung und Invasion in umliegendes Gewebe, als Tumorzellen in Form eines Monolayers (Chandrasekaran et al., 2012).

In anderen Experimenten ergaben sich Unterschiede in der Sensitivität gegenüber den Chemotherapeutika 5-Fluoruracil (5-FU) und Tirapazamine (TPZ) bei Kultur in 2D und 3D Hanging drops. Während sich die Zellen in der 3D Kultur gegenüber dem antiproliferativen 5-FU wesentlich resistenter zeigten als in der 2D Kultur, war es gegenüber Tirapazamine genau anders herum. Grund dafür war wahrscheinlich die im Zentrum der Sphäroide vorherrschende

Hypoxie, die die Aktivierung des Hypoxie abhängigen TPZ steigerte. Hier wurde deutlich, dass die Anzucht von Zellen in einem dreidimensionalen Modell nicht gezwungenermaßen mit einer höheren Resistenzrate einhergeht. Jedoch ergaben sich aus der Architektur der Sphäroide unterschiedliche Angriffspunkte. Bei Anwendung einer Kombination beider Chemotherapeutika zeigte sich in den Tumorzellsphäroiden ein additiver Effekt. 5-FU wirkte auf die proliferativen peripheren Zellen der Sphäroide, wohingegen TPZ am hypoxischen Zentrum angriff (Tung et al., 2011).

Aus anderen Forschungen ging hervor, dass die Aufnahme und Verteilung von Antikörpern gegen Tumoren anhand von Hanging Drop Sphäroiden sehr gut untersucht werden konnte (Thurber, Wittrup, 2008).

Aus geschilderten Gründen wurden in den letzten Jahren in der Tumorforschung neben den konventionellen 2D Modellen immer mehr der unterschiedlichen 3D Modelle eingesetzt. Durch Anwendung von 3D Modellen in der präklinischen Forschung erwartet man eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf darauffolgende Tierexperimente und klinische Studien. Dadurch kann in der enorm teuren Forschung nach neuen Tumorthérapien Zeit, Geld und Arbeit eingespart werden (Eke et al., 2016).

Bisher gab es noch keine Festlegung auf ein perfektes 3D Modell. Unter den bekannteren Modellen gibt es das „forced floating“ Modell, die „agitation-based“ Methode, das Matrix Modell, das „Scaffold“ Modell, die „microfluidic cell-culture platform“ sowie das 3D Hanging Drop Model (s.o.). Wichtig ist zu berücksichtigen, dass sich verschiedene Zelllinien für einige 3D Modelle besser eignen, als für andere 3D Modelle (Breslin, O'Driscoll, 2013).

Für das 3D Hanging Drop System gibt es bereits Experimente zur Untersuchung der Wirkung von etablierten Krebsmedikamenten (Anastasov et al., 2015). In dieser Arbeit wurde erstmals die Sensitivität dieser Methode zur Bestimmung der Radiosensibilität von Tumorzelllinien getestet. Dank dieser Ergebnisse kann die Methode künftig auch für andere Zelllinien eingesetzt und die Wirkung verschiedener Chemotherapeutika in Kombination mit Bestrahlung getestet werden. Außerdem hilft es, ein tieferes Verständnis zu biologischen Grundlagen zu gewinnen. Durch die Möglichkeit des Einsatzes von

Automatisierungen eignet sich die neue Methode für zeit- und materialsparende Hochdurchlaufverfahren.

Verschiedene Studien hatten gezeigt, dass die Kultivierung von Brustkrebszellen zusammen mit Fibroblasten die Heterogenität des Tumors und folglich auch die Reaktion auf eine Therapie besser abbilden (Chandrasekaran et al., 2012). Die Eignung der 3D Hanging Drop Methode zur Durchführung von Experimenten, in denen Tumorzellen im Verbund mit humanen Fibroblastenzellen auftreten und die Komplexität des humanen Brustkrebs widerspiegeln, wurde bereits gezeigt (Anastasov et al., 2015). Eine Möglichkeit zur weitergehenden Forschung in diesem Bereich wäre die Durchführung von Experimenten, in denen auch andere Tumorzelllinien mit Fibroblasten kombiniert werden, um deren in vivo Wachstum noch genauer wiederzugeben.

Sollen künftig flächendeckend dreidimensionale Kulturen verwendet werden, so müssten diese Methoden einfach handhabbar und mit Standardlaborautomaten kompatibel sein. Wichtig ist außerdem eine internationale Vergleichbarkeit der verschiedenen dreidimensionalen Zellkulturmodelle. Voraussetzung für die Etablierung ist weiterhin ein Erkenntnisgewinn gegenüber den konventionellen 2D Zellkulturen. Ein Ziel aller 3D Modelle könnte sein, die Vaskularisierung als extrem wichtigen Bestandteil in der Tumorgenese mit zu berücksichtigen (Breslin, O'Driscoll, 2013).

6 Literaturverzeichnis

- Abbott, A. (2003). Biology's new dimension. *Nature*, 424(6951), 870-872. doi: 10.1038/424870a.
- Anastasov, N., Höfig, I., Radulović, V., Ströbel, S., Salomon, M., Lichtenberg, J., Rothenaigner, I., Hadian, K., Kelm, J. M., Thirion, C., Atkinson, M. J. (2015). A 3D-microtissue-based phenotypic screening of radiation resistant tumor cells with synchronized chemotherapeutic treatment. *BMC Cancer*, 15(1), 466. doi: 10.1186/s12885-015-1481-9.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., Dewhirst, M. W., Bigner, D. D., Rich, J. N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444(7120), 756-760. doi: 10.1038/nature05236.
- Barnes, B., Bertz, J., Buttman-Schweiger, N., Fiebig, J., Jordan, S., Kraywinkel, K., Niemann, H., Nowossadeck, E., Poethko-Müller, C., Prütz, F., Rattay, P., Schönfeld, I., Starker, A., Wienecke, A., Wolf, U., Castell, S., Deleré, Y., Grabow, D., Kaatsch, P., Multmeier, J., Spix, C., Tenckhoff, B. (2016). Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016,

- Robert Koch Institut, URL:
https://www.bundesgesundheitsministerium.de/fileadmin/Dateien/3_Downloads/K/Krebs/Krebsgeschehen_RKI.pdf, aufgerufen am: 14.02.2020.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424. doi: 10.3322/caac.21492.
- Bray, F., Soerjomataram, I., (2015). The Changing Global Burden of Cancer: Transitions in Human Development and Implications for Cancer Prevention and Control. *Cancer: Disease Control Priorities, Dritte Edition*, Kapitel 2.
- Breslin, S., O'Driscoll, L. (2013). Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 18(5-6), 240-249. doi: 10.1016/j.drudis.2012.10.003.
- Brown, J. M., Attardi, L. D. (2005). The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nature Reviews Cancer*, 5(3), 231-237. doi: 10.1038/nrc1560.
- Castaneda, S. A., Strasser, J. (2017). Updates in the Treatment of Breast Cancer with Radiotherapy. *Surgical Oncology Clinics*, 26(3), 371-382. doi: 10.1016/j.soc.2017.01.013.
- Chandrasekaran, S., Geng, Y., DeLouise, L. A., King, M. R. (2012). Effect of homotypic and heterotypic interaction in 3D on the E-selectin mediated adhesive properties of breast cancer cell lines. *Biomaterials*, 33(35), 9037-9048. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.08.052.
- Chen, S. Y. C., Hung, P. J., Lee, P. J. (2011). Microfluidic array for three-dimensional perfusion culture of human mammary epithelial cells. *Biomed Microdevices*, 13(4), 753-758. doi: 10.1007/s10544-011-9545-3.
- Clarke, M., Collins, R., Darby, S., Davies, C., Elphinstone, P., Evans, V., Godwin, J., Gray, R., Hicks, C., James, S., MacKinnon, E., McGale, P., McHugh, T., Peto, R., Taylor, C., Wang, Y. (2005). Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *The Lancet*, 366(9503), 2087-2106. doi: 10.1016/s0140-6736(05)67887-7.
- Diener, H.C., Gliom/Glioblastom, Pschyrembel online, (2016) URL: <https://www.pschyrembel.de/gliom/K08V8/doc/>, aufgerufen am 10.02.2020.
- Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., Yang, L. (2014). Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and drug development technologies*, 12(4), 207-218. doi: 10.1089/adt.2014.573.
- Eke, I., Hehlhans, S., Sandfort, V., Cordes, N. (2016). 3D matrix-based cell cultures: Automated analysis of tumor cell survival and proliferation. *International Journal of Oncology*, 48(1), 313-321. doi: 10.3892/ijo.2015.3230.
- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., Mery, L., Piñeros, M., Znaor, A., Soerjomataram, I., Bray, F. (2018). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. URL: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-factsheet.pdf> <https://gco.iarc.fr/today>, aufgerufen am 16.02.2020 .
- Ferneborn, U. (2014). 3D-Zellkultur. URL: <http://www.git-labor.de/forschung/life-sciences-biotechnologie/3d-zellkultur>, aufgerufen am: 14.02.2020.

- Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1(5), 2315-2319. doi: 10.1038/nprot.2006.339.
- Galata, R., Scheid, S. (2012). *Deskriptive und Induktive Statistik für Studierende der BWL: Zweidimensionale Häufigkeitsverteilungen*. Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG.
- Goerlich, O. (2014). Zulassungsverfahren für gentechnische Anlagen und gentechnische Arbeiten. URL: https://www.lgl.bayern.de/rubrikenuebergreifende_themen/gentechnik/gentechnische_anlagen_zulassungsverfahren.htm, aufgerufen am 16.12.2014.
- Hablützel, J., (2009). *Hirntumoren und Tumoren des Zentralnervensystems*, Krebsliga Schweiz.
- Haffty, B. G., Fischer, D., Beinfield, M., McKhann, C. (1991). Prognosis following local recurrence in the conservatively treated breast cancer patient. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 21(2), 293-298. doi: 10.1016/0360-3016(91)90774-X.
- Iacob, G., Dinca, E. B. (2009). Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *Journal of Medicine and Life*, 2(4), 386-393.
- Joiner, M., van der Kogel, A. (2009). *Basic Clinical Radiobiology*, 4. Auflage, Hodder Arnold Verlag.
- Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., Hentschel, S., Luttmann, S., Stegmaier, C., Caspritz, S., Christ, M., Ernst, A., Folkerts, J., Hansmann, J., Klein, S., Kranzhöfer, K., Kunz, B., Manegold, K., Penzkofer, A., Treml, K., Weg-Remers, S., Wittenberg, K., Baras, N., Barnes, B., Bertz, J., Buttman-Schweiger, N., Dahm, S., Fiebig, J., Franke, M., Haberland, L., Kraywinkel, K., Wienecke, A., Wolf, U. (2015). *Krebs in Deutschland 2011/2012*. 10. Ausgabe. Robert Koch Institut, URL: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2015/krebs_in_deutschland_2015.pdf?__blob=publicationFile, aufgerufen am: 14.02.2020.
- Lama, R., Zhang, L., Naim, J. M., Williams, J., Zhou, A., Su, B. (2013). Development, validation and pilot screening of an in vitro multi-cellular three-dimensional cancer spheroid assay for anti-cancer drug testing. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21, 922-931. doi: 10.1016/j.bmc.2012.12.007.
- Laperriere, N., Zuraw, L., Cairncross, G. (2002). Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiotherapy & Oncology*, 64(3), 259-273. doi: 10.1016/S0167-8140(02)00078-6.
- Lasch, L., Fillenber, S., (2017). *Basiswissen Gynäkologie und Geburtshilfe*. Springer-Verlag GmbH Deutschland. doi: 10.1007/978-3-662-52809-9.
- Ledford, H. (2011). Translational research: 4 ways to fix the clinical trial. *Nature*, 477, 526-528. doi: 10.1038/477526a.
- Lee, G. Y., Kenny, P. A., Lee, E. H., Bissell, M. J. (2007). Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nature Methods*, 4, 359-365. doi: 10.1038/nmeth1015.
- Leist, M., Lidbury, B. A., Yang, C., Hayden, P. J., Kelm, J. M., Ringeissen, S., Detroyer, A., Meunier, J. R., Rathman, J. F., Jackson, G. R. Jr., Stolper, G., Hasiwa, N. (2012). Novel Technologies and an Overall Strategy to Allow Hazard Assessment and Risk Prediction of Chemicals, Cosmetics, and Drugs with Animal-Free Methods. *ALTEX (Alternatives to animal experimentation)*. 29(4):373-88. doi: 10.14573/altex.2012.4.373.

- Liu, Q., Wang, M., Kern, A. M., Khaled, S., Han, J., Yeap, B. Y., Hong, T. S., Settleman, J., Benes, C. H., Held, K. D., Efstathiou, J. A., Willers, H. (2015). Adapting a drug screening platform to discover associations of molecular targeted radiosensitizers with genomic biomarkers. *Molecular cancer research: MCR*, 13(4), 713-720. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0570.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., Scheithauer, B. W., Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, 114, 97-109. doi: 10.1007/s00401-007-0243-4.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. 131, 803-820. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.
- Lowry, R. (2020). VassarStats: Website for Statistical Computation: Correlation and Regression. URL: <http://vassarstats.net/>, aufgerufen am: 14.02.2020.
- Mogilner, A., Odde, D. (2011). Modeling cellular processes in 3D. *Trends in Cell Biology*, 21(12) 692–700. doi: 10.1016/j.tcb.2011.09.007.
- N. N. (2016). Amercian Type Culture Collection (ATCC).
 -MDA-MB-361 (ATCC® HTB-27™), General information. URL: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-27.aspx?geo_country=de, aufgerufen am: 14.02.2020.
 -T-47D (ATCC® HTB-133™), Culture method. URL: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-133.aspx?geo_country=de#culturemethod, aufgerufen am: 14.02.2020.
 -T-47D (ATCC® HTB-133™), General information. URL: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-133.aspx?geo_country=de, aufgerufen am: 14.02.2020.
 -U-87 MG (ATCC® HTB-14™), General information. URL: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-14.aspx?geo_country=de, aufgerufen am: 14.02.2020.
- N. N. (2013). Arzneimittelentwicklung. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte. URL: http://www.bfarm.de/DE/Buerger/Arzneimittel/Arzneimittelentwicklung/_node.html, aufgerufen am 16.02.2020.
- N. N. (s.a.). Der lange Weg eines Medikaments. Interpharma. URL: <https://www.interpharma.ch/forschung/6004-der-weg-zu-einem-neuen-medikament-ist-lang>, aufgerufen am 16.02.2020.
- N. N. (2014). Product Manual GravityPLUS™ Kit. InSphero AG Schweiz.
- Owen, J. R., Ashton, A., Bliss, J. M., Homewood, J., Harper, C., Hanson, J., Haviland, J., Bentzen, S. M., Yarnold, J. R. (2006). Effect of radiotherapy fraction size on tumour control in patients with early-stage breast cancer after local tumour excision: long-term results of a randomised trial. *The Lancet Oncology*, 7(6), 467-471. doi: 10.1016/s1470-2045(06)70699-4.
- Pampaloni, F., Reynaud, E. G., Stelzer, E. H. K. (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 839-45. doi: 10.1038/nrm2236.
- Puck, T. T., Marcus, P. I. (1956). Action of x-rays on mammalian cells. *Journal of Experimental Medicine*, 103(5), 653-666. doi: 10.1084/jem.103.5.653.
- Rottmann, H., Auer, B. R., Kamps, U. (2018) Bestimmtheitsmaß. *Gabler Wirtschaftslexikon*, Springer, URL:

- <https://wirtschaftslexikon.gabler.de/definition/bestimmtheitsmass-31758/version-255309>, aufgerufen am 16.02.2020.
- Sakuma T., Barry M. A., Ikeda Y. (2012). Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochemical Journal*, 443(3): 603-18. doi: 10.1042/BJ20120146.
- Sauer, R. (2010). *Strahlentherapie und Onkologie* (5. Auflage). Elsevir GmbH München: Urban & Fischer Verlag.
- Schmitz, S. (2011). *Der Experimentator, Zellkultur*. (3. Auflage). Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Schwarz, J. (2020). *Methodenberatung: Korrelation nach Bravais-Pearson*. Universität Zürich. URL: https://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse_spss/zusammenhaenge/korrelation.html, aufgerufen am 16.02.2020.
- Sodunke, T. R., Turner, K. K., Caldwell, S. A., McBride, K. W., Reginato, M. J., Noh, H. M. (2007). Micropatterns of Matrigel for three-dimensional epithelial cultures. *Biomaterials*, 28(27), 4006-4016. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.05.021.
- Stöver, I., Feyer, P., (2018). *Praxismanual Strahlentherapie* (2. Auflage). Springer Verlag GmbH Deutschland.
- Tan, W., Krishnaraj, R., Desai, T. A. (2001). Evaluation of Nanostructured Composite Collagen–Chitosan Matrices for Tissue Engineering. *Tissue Engineering*, 7(2), 203-210. doi: 10.1089/107632701300062831.
- Thurber, G. M., Wittrup, K. D. (2008). Quantitative spatiotemporal analysis of antibody fragment diffusion and endocytic consumption in tumor spheroids. *Cancer Research*, 68(9), 3334-3341. doi: 10.1158/0008-5472.Can-07-3018.
- Tung, Y. C., Hsiao, A. Y., Allen, S. G., Torisawa, Y. S., Ho, M., Takayama, S. (2011). High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst*, 136(3), 473-478. doi: 10.1039/c0an00609b.
- Vinci, M., Gowan S., Boxall, F., Patterson, L., Zimmermann, M., Court, W., Lomas, C., Mendiola, M., Hardisson, D., Eccles, S. A. (2012). Advances in establishment and analysis of threedimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biology incorporating Journal of Biology*, 10(29), doi: 10.1186/1741-7007-10-29.
- Wang, J., Wakeman, T. P., Latha, J. D., Hjelmeland, A. B., Wang, X. F., White, R. R., Rich, J. N., Sullenger, B. A. (2010). Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells*, 28(1), 17-28. doi: 10.1002/stem.261.
- Wehner, J. (s.a.) *Arzneimittelsicherheit: Der Weg eines Arzneimittels von der Forschung bis zur Zulassung*. URL: <http://www.medizinfo.de/arzneimittel/recht/arzneimittelpruefung.shtml>, aufgerufen am 16.02.2020.
- Williams, C. T. (2016). Food and Drug Administration Drug Approval Process: A History and Overview. *Nursing Clinics of North America*, 51(1), 1-11. doi: 10.1016/j.cnur.2015.10.007.
- Wu, M. H., Huang, S. B., Lee, G. B. (2010). Microfluidic cell culture systems for drug research. *Lab on a Chip*, 10(8), 939-956. doi: 10.1039/b921695b.

7 Zusammenfassung

Weltweit steigt die Kritik an zweidimensionalen Zellkulturen in der *in vitro* Tumorforschung. Es mangelt an der Übertragbarkeit dieser Modelle auf die *in vivo* Situation in Tumoren. In vielen neuen Studien mit unterschiedlichen dreidimensionalen Modellen konnten unterschiedliche Ergebnisse in Versuchen mit zweidimensionalen und dreidimensionalen Modellen gezeigt werden. Durch den zukünftigen Einsatz von 3D Modellen in der Tumorforschung hofft man, unter Einsparung von Zeit, Geld und Arbeit, wirksame Therapien zu finden. Eines dieser neuen 3D Modelle ist das in dieser Arbeit untersuchte 3D Hanging Drop Modell.

Mit der Durchführung von zwei Versuchsreihen, dem konventionellen Koloniebildungstest und dem neuen 3D Hanging Drop Modell, wurden beide Modelle hinsichtlich ihrer Vergleichbarkeit zur Bestimmung der Strahlensensibilität von Tumorzelllinien verglichen. Dafür wurden einerseits die Überlebenskurven der drei Tumorzelllinien MDA-MB-361-GFP, T-47D-GFP und U87 MG-GFP nach Bestrahlung mit unterschiedlicher Dosis durch den Koloniebildungstest erhoben. Andererseits wurde mit der 3D Hanging Drop Methode getestet, wie sich das Wachstum der zuvor genannten Zelllinien, in Form von Tumorzellsphäroiden, nach Bestrahlung mit den gleichen Strahlendosen verändert. Die Ergebnisse beider Experimente wurden miteinander korreliert. Es zeigte sich bei allen getesteten Zelllinien eine starke Korrelation der erhobenen Werte. Damit wurde belegt, dass sich die 3D Hanging Drop Technik genauso gut eignet, um die Strahlensensibilität der getesteten Tumorzelllinien zu bestimmen, wie der konventionelle Koloniebildungstest. Dank dieser Ergebnisse kann die Methode künftig auch für andere Zelllinien eingesetzt werden und die Wirkung verschiedener Chemotherapeutika in Kombination mit Bestrahlung getestet werden. Außerdem kann es in weiteren Versuchen helfen, ein tieferes Verständnis zu den biologischen Grundlagen zu gewinnen. Durch die Möglichkeit des Einsatzes von Automatisierungen eignet sich die neue Methode für zeit- und materialsparende Hochdurchlaufverfahren.

8 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Stephanie E. Combs und Frau Dr. Nataša Anastasov für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas, ihre konstruktive Kritik und Anregungen.

Meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Thomas Schmid danke ich sehr für die hervorragende Unterstützung.

Vielen Dank an Frau Dr. Daniela Schilling für die Hilfestellungen, ihre Anregungen zu den Experimenten und deren Auswertung.

Meiner Mitdotorandin Sabine Richter danke ich ganz besonders für die nette Zusammenarbeit im Labor sowie ihrer Hilfe bei der Computerarbeit.

Besonderer Dank gilt Marlon Stein für seine Unterstützung im Labor.

Vielen Dank den Labormitarbeitern Dr. Katharina Teiluf, Jürgen Schultheiss, Katarina Ilicic, Rosemarie Kell, Alexandra Semmler, Lily Nguyen und Michaela Wank für die Einführung in die Labormethoden sowie die ständige Hilfestellung und Unterstützung bei den Experimenten.

Zuletzt danke ich meiner Familie, die mir meine ganze Ausbildung ermöglicht und mich stets unterstützt haben. Ein großes Dankeschön gilt auch Martin Bauer für seine emotionale Unterstützung und Geduld mit mir.

9 Veröffentlichungen

- 2016: Kongress: 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie (DEGRO) in Mannheim, **Vortrag:** Vergleich der Sensitivität des 3D Hanging Drop Systems mit dem konventionellen 2D Zellüberlebenstest nach Bestrahlung
- 2019: **Paper:** 3D-microtissue assays as a viable alternative to clonogenic assays for predicting the radiation sensitivity of tumor cells, S.I. Rupp, S.A. Richter, D. Schilling, M.J. Atkinson, S.E. Combs, T.E. Schmid, N. Anastasov, **eingereicht** bei: Radiation Oncology