

Universität  
Rostock



Traditio et Innovatio



Universitätsmedizin  
Rostock

AUS DER KLINIK UND POLIKLINIK FÜR ALLGEMEIN-, VISZERAL-, THORAX-, GEFÄß- UND

TRANSPLANTATIONSSCHIRURGIE

ARBEITSGRUPPE MOLEKULARE ONKOLOGIE UND IMMUNTHERAPIE (M.O.I)

DIREKTOR: PROF. DR. CLEMENS SCHAFMAYER

# Optimierung der Etablierung von kolorektalen Tumorzelllinien

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER MEDIZIN

DER

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

Vorgelegt von

Sven Peters geb. am 03.10.1990 in Rostock

aus Magdeburg

Magdeburg 2024



Dieses Werk ist lizenziert unter einer  
Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz.

**Gutachter:**

PD Dr. rer. nat. Michael Linnebacher, Universitätsmedizin Rostock, Chirurgische Klinik und Poliklinik

Prof. Dr. med. habil. Robert Jaster, Universitätsmedizin Rostock, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin

Prof. Dr. Timo Gemoll, Universität zu Lübeck, Klinik für Chirurgie

**Jahr der Einreichung:** 2024

**Datum der Verteidigung:** 19.11.2024

# Inhaltsverzeichnis

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 1      | Abkürzungsverzeichnis .....  | 6  |
| 2      | Einleitung .....   | 7  |
| 2.1    | Zielstellung und Gliederung der Arbeit.....                            | 7  |
| 2.2    | Grundlagen zum kolorektalen Karzinom .....                             | 8  |
| 2.2.1  | Epidemiologie .....  | 8  |
| 2.2.2  | Ätiologie.....   | 9  |
| 2.2.3  | Tumorgenese .....  | 10 |
| 2.2.4  | Klinik.....  | 11 |
| 2.2.5  | Diagnostik .....   | 12 |
| 2.2.6  | Metastasierung .....   | 13 |
| 2.2.7  | Grading.....   | 13 |
| 2.2.8  | TNM-Klassifikation des CRC (UICC 2010).....                            | 14 |
| 2.2.9  | UICC-Stadien des kolorektalen Karzinoms .....                          | 14 |
| 2.2.10 | Therapie.....  | 15 |
| 2.2.11 | Darmkrebsfrüherkennung und Vorsorge.....                               | 17 |
| 2.3    | Zelllinien.....  | 18 |
| 2.3.1  | Grundlagen .....   | 18 |
| 2.3.2  | Anwendung .....  | 19 |
| 2.4    | Extrazelluläre Matrix und Anoikis .....                                | 20 |
| 2.5    | Xenotransplantation.....   | 20 |
| 2.6    | NSG-Mäuse .....  | 21 |
| 2.7    | Cyclooxygenasen, Prostaglandine, cAMP und deren Einfluss auf CRCs..... | 22 |
| 2.8    | Choleratoxin (CTX).....  | 23 |
| 2.9    | Rho-assoziierte Proteinkinasen (ROCKs) und Y-27632 .....               | 23 |
| 2.9.1  | Allgemeines.....   | 23 |
| 2.9.2  | Signalkaskade.....   | 24 |
| 2.9.3  | Einblick in die Regulation der ROCK-Aktivität .....                    | 24 |
| 2.9.4  | Tumorinvasion und Metastasierung .....                                 | 24 |
| 2.9.5  | ROCK in Tumorstammzellen (CSCs).....                                   | 25 |
| 3      | Material und Methoden .....  | 26 |
| 3.1    | Material.....  | 26 |
| 3.1.1  | Tumorpräparate .....   | 26 |
| 3.2    | Methoden .....   | 28 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 3.2.1  | Xenografts .....                            | 28 |
| 3.2.2  | Zellbiologische Methoden.....               | 28 |
| 3.2.3  | Molekulare Methoden .....                   | 34 |
| 4      | Ergebnisse .....                            | 36 |
| 4.1    | Mykoplasmen-PCR .....                       | 36 |
| 4.2    | Auswertung der einzelnen Zellkulturen ..... | 38 |
| 4.2.1  | HROC29 fT1 M2 .....                         | 38 |
| 4.2.2  | HROC48Met1 fT1 M2 .....                     | 38 |
| 4.2.3  | HROC50 fT1 M4 .....                         | 39 |
| 4.2.4  | HROC50 fT1 M5 .....                         | 39 |
| 4.2.5  | HROC68 T2 M1 .....                          | 40 |
| 4.2.6  | HROC68 T2 M2.....                           | 41 |
| 4.2.7  | HROC71 fT1 M7 .....                         | 41 |
| 4.2.8  | HROC113 fT1 M1 .....                        | 43 |
| 4.2.9  | HROC117 fT1 M3 .....                        | 43 |
| 4.2.10 | HROC123 fT1 M4 .....                        | 43 |
| 4.2.11 | HROC130 fT1 M1 .....                        | 44 |
| 4.2.12 | HROC135 fT1 M2 .....                        | 45 |
| 4.2.13 | HROC143 fT1 M2 .....                        | 45 |
| 4.2.14 | HROC169 fT1 M2 .....                        | 45 |
| 4.2.15 | HROC170 fT1 M1 .....                        | 46 |
| 4.2.16 | HROC190 T1 M2.....                          | 46 |
| 4.2.17 | HROC203 T1 M1.....                          | 46 |
| 4.2.18 | HROC204 fT2 M1 .....                        | 47 |
| 4.2.19 | HROC248 fT1 M1 .....                        | 47 |
| 4.2.20 | HROC250 T2 M1 .....                         | 48 |
| 4.2.21 | HROC253Met1 fT0 M3 .....                    | 48 |
| 4.2.22 | HROC277 fT2 M1 .....                        | 49 |
| 4.2.23 | HROC277Met2 fT0 M1 .....                    | 49 |
| 4.2.24 | HROC288 T2 M3.....                          | 49 |
| 4.2.25 | HROC300 fT1 M1 .....                        | 50 |
| 4.2.26 | HROC300Met1 T2 M1 .....                     | 50 |
| 4.2.27 | HROC347.....                                | 51 |
| 4.2.28 | HROC348.....                                | 51 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 4.2.29 | HROC348Met1 .....   | 52 |
| 4.2.30 | HROC349.....  | 53 |
| 4.2.31 | HROC352.....  | 53 |
| 4.2.32 | HROC355Met1 .....   | 55 |
| 4.3    | Erfolgsquote.....   | 55 |
| 4.4    | Statistik.....  | 56 |
| 4.4.1  | Übersichtstabellen .....                                    | 56 |
| 4.4.2  | Boxplot.....  | 58 |
| 4.4.3  | Mann-Whitney-U-Test.....                                    | 60 |
| 4.4.4  | Interpretation .....  | 63 |
| 5      | Diskussion .....  | 63 |
| 5.1    | Biobank.....  | 63 |
| 5.2    | Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit.....                    | 64 |
| 5.2.1  | Barrierefunktion von Epithelzellen .....                    | 64 |
| 5.2.2  | Präsystemische Elimination .....                            | 64 |
| 5.3    | Vergleich Primärtumor und korrespondierende Metastase ..... | 65 |
| 5.4    | In vivo vs. in vitro.....                                   | 65 |
| 5.5    | Etablierung der Zelllinien.....                             | 66 |
| 5.5.1  | Einfluss von Y-27632 auf die Tumorzellproliferation.....    | 68 |
| 5.5.2  | Verwendung von ROCK-Inhibitoren.....                        | 71 |
| 5.5.3  | Ausblick und patient-derived organoids (PDOs) .....         | 71 |
| 6      | Zusammenfassung.....  | 72 |
| 7      | Literaturverzeichnis.....                                   | 74 |
| 8      | Tabellenverzeichnis.....                                    | 80 |
| 9      | Abbildungsverzeichnis .....                                 | 80 |
| 10     | Anhang .....  | 81 |
| 10.1   | Medium MOITUM.....  | 81 |
| 10.2   | Mastermix .....   | 81 |
| 10.3   | Materialliste .....   | 81 |
| 11     | Danksagung.....   | 82 |
| 12     | Erklärung.....  | 83 |
| 13     | Lebenslauf.....   | 84 |

## 1 Abkürzungsverzeichnis

|       |  |
|-------|--|
| ADF   | Adenosindiphosphat                         |
| APR   | abdominoperineale Rektumexstirpation       |
| ASS   | Acetylsalicylsäure                         |
| ATP   | Adenosintriphosphat                        |
| cAMP  | cyclisches Adenosinmonophosphat            |
| CEA   | carcinoembryonales Antigen                 |
| CIN   | chromosomale Instabilität                  |
| CNV   | Kopienzahlvariation                        |
| COX   | Cyclooxygenase                             |
| CRC   | kolorektales Karzinom                      |
| CSC   | Tumorstammzellen                           |
| CTX   | Choleratoxin                               |
| DMSO  | Dimethylsulfoxid                           |
| DNA   | Desoxyribonukleinsäure                     |
| dNTPs | Desoxynukleosidtriphosphat                 |
| ECM   | extrazelluläre Matrix                      |
| EDTA  | Ethylendiamintetraacetat                   |
| EGF   | epidermale Wachstumsfaktor                 |
| EGFR  | epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor       |
| FAP   | familiäre adenomatöse Polyposis            |
| FCS   | fötales Kälberserum                        |
| FOBT  | fäkaler okkultter Bluttest                 |
| GDP   | Guanosindiphosphat                         |
| GTP   | Guanosintriphosphat                        |
| HEK   | humane embryonale Nierenzellen             |
| HIPEC | hypertherme intraperitoneale Chemotherapie |
| HTS   | Hochdurchsatz-Screening                    |
| IEN   | intraepitheliale Neoplasie                 |
| IAP-2 | Apoptose-Inhibitor 2                       |
| IL    | Interleukin                                |
| ITH   | intratumorale Heterogenität                |
| LS    | Lynch-Syndrom                              |

|               |  |
|---------------|--|
| MLC           | Myosin leichte Ketten                    |
| MMP           | Matrix-Metalloproteasen                  |
| M.O.I         | Molekulare Onkologie und Immuntherapie   |
| MSI           | Mikrosatelliteninstabilität              |
| MSI-H         | hohe Mikrosatelliteninstabilität         |
| NSG           | NOD scidgamma                            |
| PBS           | Phosphat-gepufferter Salzlösung          |
| PCR           | Polymerase-Kettenreaktion                |
| PDO           | patient-derived organoid                 |
| PDX           | patient-derived xenograft                |
| RFA           | Radiofrequenzablation                    |
| PGE2          | Prostaglandin E2                         |
| ROCK          | Rho-assoziierte Proteinkinase            |
| RNA           | Ribonukleinsäure                         |
| SCID          | schwerer kombinierter Immundefekt        |
| SSA           | sessile serratierte Adenom               |
| TACE          | transarterielle Chemoembolisation        |
| TME           | totale mesorektale Exzision              |
| TEM           | transanale endoskopische Mikrochirurgie  |
| UICC          | Union international contre le cancer     |
| VEGF          | vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor |
| 2D-Zellkultur | zweidimensionale Zellkultur              |
| 3D-Zellkultur | dreidimensionale Zellkultur              |

## 2 Einleitung

### 2.1 Zielstellung und Gliederung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Optimierung der Etablierung von Zelllinien humaner kolorektaler Karzinome (CRCs). Das CRC gehört zu den häufigsten Karzinomen in den westlichen Industrienationen. Außerdem ist es die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache in Europa. Nicht zuletzt aus diesen Gründen ist es Gegenstand intensiver Forschungen.

Zellen des CRC können unter bestimmten Bedingungen auch außerhalb des Organismus kultiviert werden. Dies bezeichnet man als Zellkultur. Eine Primärkultur ist dabei eine nicht immortalisierte Zellkultur, welche direkt aus einem Gewebe gewonnen wurde. Im Gegensatz

dazu sind etablierte oder unsterbliche Zelllinien in der Lage, sich unendlich zuteilen. Diese Fähigkeit können die Zellen durch Mutation oder gezielte Immortalisierung erlangen. Eine etablierte Zelllinie kann dann aufgrund der Vergleichbarkeit des Ausgangsmaterials zur Untersuchung verschiedener wissenschaftlicher Fragestellungen verwendet werden. Problematisch ist die vergleichbar niedrige Quote, eine permanente Zelllinie des CRC zu generieren.

In der Literatur werden Etablierungsraten von 10 % [1] und 17 % [2] angegeben. Im Gegensatz dazu können beispielsweise Zelllinien vom kleinzelligen Lungenkarzinom mit einer Rate von 72 % [3] etabliert werden.

Das primäre Ziel dieses Versuchs war es, mit verschiedenen Ansätzen die Etablierung von Zelllinien humaner CRCs zu optimieren. Zu diesen gehörte die Verwendung von ROCK-Inhibitor Y-27632, Cholera toxin (CTX), unterschiedlichen Feeder-Zellen, konditioniertem Nährmedium oder der Kombination verschiedener dieser Ansätze. Diese Arbeit ist gegliedert in

- die Beschreibung der Grundlagen des CRC sowie der Grundlagen zu Zelllinien,
- die Erläuterung der Methoden,
- die Darstellung der Ergebnisse und
- die Diskussion des Themas.

In der Beschreibung der Grundlagen zum CRC sind besonders die Tumorgenese, die Ätiologie und die Metastasierung von Bedeutung.

Im Methodenteil wird vor allem das Vorgehen zur Herstellung einer Zellkultur erläutert. Die hergestellten Zelllinien werden im Ergebnisteil beschrieben und die Resultate des Versuches geschildert. In der abschließenden Diskussion werden die zuvor dargelegten Ergebnisse zur Optimierung der Etablierung von CRC-Zelllinien erörtert. Zusätzlich werden eine Optimierung der Methodik sowie mögliche weiterführende Versuche erläutert.

## **2.2 Grundlagen zum kolorektalen Karzinom**

### **2.2.1 Epidemiologie**

CRCs sind maligne epitheliale Tumoren der kolorektalen Schleimhaut. Sie gehören zu den häufigsten Karzinomen in den westlichen Industrienationen, wobei die Inzidenz weltweit variiert.

Pro Jahr wird deutschlandweit bei etwa 60 000 Menschen solch eine Diagnose gestellt, gleichwohl die Anzahl der Neuerkrankungen in den letzten Jahren leicht rückläufig gewesen ist. Damit betrifft hierzulande etwa jede achte Krebserkrankung den Darm. In Deutschland ist

das CRC das dritthäufigste Karzinom des Mannes (nach dem Prostata- und Lungenkarzinom) sowie das zweithäufigste Karzinom der Frau (nach dem Mammakarzinom) und stellt insgesamt die dritthäufigste tumorbedingte Todesursache dar.

Das Risiko, an Darmkrebs zu erkranken, steigt bis in das hohe Alter stetig an. Etwa 90 % der CRCs finden sich bei Patienten nach dem 50. Lebensjahr. Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten liegen für Frauen und Männer um 65 % bzw. 63 % (Zentrum für Krebsregisterdaten RKI 2017/2018).

### **2.2.2 Ätiologie**

Es sind verschiedene prädisponierende Faktoren bekannt, welche die Entstehung eines CRC begünstigen können. Zu den wichtigsten gehören das Alter und das Vorkommen von kolorektalen Adenomen. Dies gilt besonders für große [4] wie auch multiple Adenome [5]. Maßgebliche Ursachen sind überdies bestimmte Lebens- und Ernährungsgewohnheiten. Aufgeführt werden eine ballaststoffarme, fett- und fleischreiche Ernährung sowie Übergewicht und Bewegungsmangel. Langjähriges Zigarettenrauchen [6] sowie ein hoher Alkoholkonsum stellen weitere Risikofaktoren dar.

Genetische Faktoren spielen in circa 10 % der Fälle eine Rolle. Verwandte ersten Grades eines Patienten mit CRC erkranken selbst überdurchschnittlich häufig, wobei das mittlere Risiko 2- bis 3-fach erhöht ist [7].

Daneben existiert eine Reihe hereditärer Polyposis-Syndrome, zu deren Komplikation eine karzinomatöse Entartung zählt. Die familiäre adenomatöse Polyposis (familial adenomatous polyposis, FAP) ist das häufigste intestinale Polyposis-Syndrom und ist durch die Entstehung zahlreicher kolorektaler Adenome gekennzeichnet. Es handelt sich um eine obligate Präkanzerose mit einem hohen Entartungsrisiko ab dem 15. Lebensjahr. Ungefähr 1 % aller CRCs entsteht auf dem Boden einer FAP. Adenome respektive Adenokarzinome können sich gleichermaßen in anderen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts entwickeln; und auch eine extraintestinale Krankheitsmanifestation ist möglich. Die FAP sowie ihre phänotypischen Varianten werden autosomal dominant-vererbt. Ursache sind Mutationen des APC-Tumorsuppressorgens (adenomatous polyposis coli), was unter anderem zu einer Störung der Zellzyklusregulation führt.

Das Lynch-Syndrom (LS, früher auch: Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer, HNPCC) ist die häufigste genetisch determinierte Tumorerkrankung des Kolons. Etwa 3 % aller CRCs entstehen im Rahmen eines LS. Mit einem medianen Alter von circa 45 Jahren bei Diagnosestellung treten sie deutlich früher als sporadische Karzinome auf. Die bevorzugte

Tumorlokalisation ist das rechte Hemikolon. Zugleich besteht ein erhöhtes Risiko für extrakolonische Neoplasien. Dazu zählen z. B. Endometrium-, Ovarial-, Urothel-, Magen- und Dünndarmkarzinome. Das LS wird autosomal-dominant vererbt und durch Keimbahnmutationen in DNA-Mismatch-Reparatur-Genen (MMR-System) verursacht. Am häufigsten sind MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2 betroffen. Bedingt durch die fehlende Beseitigung von Basenfehlpaarungen kommt es zur Akkumulation von Mutationen und schließlich zur Entwicklung von Krebserkrankungen. Typischerweise findet sich eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI). Zur klinischen Erfassung von LS-Patienten dienen die überarbeiteten Amsterdam- bzw. Bethesda-Kriterien. Die Diagnosestellung erfolgt anhand molekulargenetischer und immunhistochemischer Untersuchungen.

Auch bei einer Reihe anderer Erkrankungen kommt es gehäuft zum Auftreten von CRCs. Es besteht eine Koinzidenz mit anderen Malignomen, wie Mamma-, Ovarial- oder Magenkarzinom.

Überdies ist eine langjährig bestehende chronisch-entzündlichen Darmerkrankung mit einem erhöhten Entartungsrisiko behaftet. Insbesondere Patienten mit Colitis ulcerosa und einer high grade intraepithelialen Neoplasie (IEN) sind gefährdet.

Die Referenzen zur Prävention des CRC beziehen sich in erster Linie auf die bislang identifizierten Risikofaktoren. Protektiv wirken sich regelmäßige körperliche Aktivität sowie eine fett- und fleischarme Ernährung aus. Eine hohe Ballaststoffaufnahme und eine schnelle Stuhlpassage sind ebenfalls mit einem verminderten Darmkrebsrisiko verbunden. Die Ursache dafür soll der verkürzte Kontakt von Karzinogenen mit der kolorektalen Schleimhaut sein. Klinische Studien schreiben auch einem hohen Vitamin-D-Spiegel einen vorbeugenden Effekt zu [8]. Umfassende Daten zur medikamentösen Prophylaxe liegen für die Acetylsalicylsäure (ASS) vor. Die langfristige Einnahme von ASS in einer Dosis von mindestens 75 mg täglich reduziert nachhaltig die Inzidenz und Mortalität des CRC [9]. Derzeit besteht allerdings noch keine Empfehlung hinsichtlich der Einnahme von Supplementen und Mikronährstoffen zur Primärprävention des CRC. Dies gilt beispielsweise auch für Vitamin C, Folsäure, Kalzium und Magnesium.

### **2.2.3 Tumorgenese**

CRCs entstehen in einem mehrstufigen Prozess. Adenome des Gastrointestinaltrakts sind Vorläuferläsionen, aus denen sich Adenokarzinome entwickeln können. Makroskopisch sind Adenome gestielte oder breitblasig aufsitzende Schleimhautpolypen. Die meisten sind rektosigmoidal lokalisiert (66-77 %) [10]. Sie treten häufig multipel auf und bleiben meist

klinisch stumm. Wegen des Entartungsrisikos (fakultative Präkanzerose) sollten kolorektale Adenome vollständig entfernt werden. Die klassischen Adenome lassen sich je nach histologischem Wachstumsmuster in tubuläre, tubulovillöse oder rein villöse Adenome unterscheiden. Des Weiteren gibt es Adenome mit „sägezahnartiger“ oder „serratiertes“ Architektur. Die Entstehung eines CRC kann einige Jahre dauern. Die Progression vom Normalgewebe zum Karzinom wird durch eine Akkumulation verschiedener genetischer Veränderungen verursacht. Dabei handelt es sich um die Aktivierung von Onkogenen und/oder die Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen [11]. Sobald eine kritische Zahl genetischer Veränderungen aufgetreten ist, kann das anfangs noch kontrollierte Wachstumsverhalten in ein unkontrolliertes malignes Wachstum übergehen. Man spricht von einer malignen Transformation.

Etwa 60 % der CRCs entstehen im Rahmen der Adenom/Dysplasie-Karzinom-Sequenz. Die primäre Schlüsselmutation betrifft dabei das APC-Tumorsuppressor-Gen. Sekundäre genetische Alterationen sind Mutationen des K-RAS-Onkogens, des DCC-Tumorsuppressor-Gens (deleted in colorectal cancer) und des p53-Suppressor-Gens. Chromosomale Instabilität (CIN) sowie der Verlust der Heterozygotie sind wichtige Schritte in diesem Prozess. Alternativ dazu entstehen etwa 20 % der CRCs auf dem serratierten Karzinogeneseweg. Die primäre Schlüsselmutation für die serratierte Route liegt dabei im BRAF-Gen mit Störungen der Apoptose der Kryptenepithelien. Darauf folgend kommt es zur Entwicklung einer meist hohen Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H). Als Vorläuferläsion wird hier das sessile serratierte Adenom (SSA) angesehen. Des Weiteren existiert noch ein sogenannter Mischtyp, der verschiedene molekulare Charakteristika beider Karzinogenesewege aufweist.

Bei MSI liegt ein Defekt der DNA-Mismatch-Reparatur vor. Der Defekt führt zu einer Längenveränderung innerhalb kurzer, repetitiver DNA-Sequenzen. Er ist bei sporadischen Karzinomen meist auf einen epigenetisch bedingten Expressionsverlust (Promotor-Hypermethylierung) des DNA-Mismatch-Reparatur-Proteins MLH1 zurückzuführen. Eine MSI-H findet sich vermehrt beim LS [12]. Hier wird die MSI durch eine Keimbahnmutation in einem der DNA-Mismatch-Reparatur-Gene verursacht.

#### **2.2.4 Klinik**

Das CRC kann lange symptomlos bleiben und verursacht gerade in frühen Stadien nur uncharakteristische Beschwerden. Die Patienten können über Allgemeinsymptome, wie Leistungsminderung, Müdigkeit und Abgeschlagenheit, klagen. Infolge der Tumorerkrankung kommt es oftmals zu einem Gewichtsverlust und eventuell zu Fieber (B-Symptomatik).

Auch Symptome wie Schmerzen oder Darmkrämpfe sind sehr unspezifisch. Erst Tumorblutungen oder relevante Stenosen bedingen eine nennenswerte Symptomatik.

Blutbeimengungen im Stuhl finden sich am häufigsten bei Rektumkarzinomen, aber nur bei einem Teil der Kolonkarzinome. Okkulte Blutungen lassen die Patienten oft nur durch eine chronische hypochrome Anämie auffällig werden. Überdies sollte jede Änderung der Stuhlgewohnheiten nach dem 40. Lebensjahr an die Möglichkeit eines CRC denken lassen. Der ungewollte Abgang von Stuhl bei der Flatulenz (Symptom des „falschen Freundes“) infolge eines schlaffen Sphinktertonus tritt vermehrt auf, wenn das Tumorleiden bereits fortgeschritten ist. Typisch ist eine Kombination mit konstant üblen Windgerüchen, Obstipation und Diarrhoe oder Bleistiftstühlen. Sollte der Tumor das Darmlumen signifikant einengen, können Ileuserscheinungen beobachtet werden. Ein akutes Abdomen durch stenosierende Prozesse stellt eine lebensbedrohliche Komplikation dar.

### **2.2.5 Diagnostik**

An erster Stelle stehen eine sorgsame Anamneseerhebung und eine allgemeine körperliche Untersuchung. Inbegriffen ist eine digital-rektale Untersuchung, da der Tumor gegebenenfalls durch rektale Austastung bereits palpabel ist. Okkulte Blutungen können mit Stuhltests festgestellt werden. Ein weiteres wichtiges diagnostisches Mittel ist die Rektosigmoidoskopie, durch welche sich ein großer Teil aller CRCs erfassen lässt. Der übrige Anteil ist nur durch eine komplette Koloskopie nachweisbar. Daher ist derzeit eine sichere Frühdiagnose mit guter Heilungschance nur durch die prophylaktische Koloskopie möglich. Falls eine vollständige Koloskopie nicht möglich sein sollte, besteht die Möglichkeit, eine Spiral-CT oder eine MRT als „virtuelle Koloskopie“ durchzuführen.

Zur Bestimmung des Tumorstaging ist eine Reihe zusätzlicher Untersuchungen notwendig, welche entscheidend für die Therapieplanung und zur Prognoseabschätzung sind.

Die Abdomensonographie dient zum Ausschluss von Lebermetastasen. Ein Röntgen-Thorax in zwei Ebenen wird durchgeführt, um nach Lungenmetastasen zu suchen. Zur Beurteilung der Tumorausdehnung und der lokalen Operabilität bei Rektumkarzinomen nützt die rektale Endosonographie. Die hier aufgeführten Methoden sind nur ein paar Beispiele für ergänzende Diagnostik. Bei unklarem Befund oder speziellen Fragestellungen können weitere Diagnoseverfahren zum Einsatz kommen.

Dem Tumormarker CEA (carcinoembryonales Antigen) kommt in der Nachsorge von Patienten mit CRC eine gewisse Bedeutung zu. Bei einem Teil der Patienten finden sich

präoperativ erhöhte Serumspiegel, die sich nach kompletter Tumorentfernung normalisieren. Ein Wiederanstieg der CEA-Konzentration spricht für das Auftreten eines Rezidivs.

### **2.2.6 Metastasierung**

Zum Diagnosezeitpunkt eines Kolonkarzinoms finden sich bereits bei 25 % der Patienten Fernmetastasen. Für das Rektumkarzinom beträgt die Häufigkeit immerhin 18 %.

Die Verschleppung von Tumorzellen über das Blut ist zunächst durch den Verlauf der Gefäße vorgegeben. Das CRC liegt im Einflussbereich der Vena portae (Pfortader-Typ) und metastasiert infolgedessen bevorzugt in die Leber. Eine Ausnahme bildet das distale Rektumkarzinom, welches über die Vena cava inferior (Cava-Typ) direkt in die Lunge streuen kann. Im Verlauf ist die Entstehung einer hämatogenen Metastasierungskaskade möglich, wodurch sich weitere Tochtergeschwülste in anderen Organen absiedeln können.

Die lymphogene Metastasierung erfolgt vor allem in regionäre (perikolische, perirektale) Lymphknoten. Die Lokalisation des Primärtumors und der dazugehörige Lymphabfluss sind entscheidend dafür, welche Lymphknotenregionen befallen werden. Beim Kolonkarzinom erfolgt die Ausbreitung entlang der versorgenden Arterien, wodurch zugleich das Ausmaß der Darmresektion determiniert wird. In Abhängigkeit vom Tumorsitz existieren auch beim Rektumkarzinom verschiedene Metastasenstraßen. Neben paraaortalen Lymphknoten kann der Abfluss zusätzlich über die Beckenwand sowie über inguinale Lymphknoten erfolgen. Karzinome des unteren Rektumdrittels haben eine ungünstigere Prognose, weil die Lymphe über alle drei Stationen abfließen kann.

### **2.2.7 Grading**

Die Tumorgraduierung beinhaltet die Einstufung des Malignitätsgrades aufgrund histologischer und zytologischer Kriterien. Wichtige Bestimmungsparameter sind Kernatypien, die Teilungsaktivität der Zellen sowie deren Differenzierung. Der Differenzierungsgrad charakterisiert die Ähnlichkeit der Zellen zum Ursprungsgewebe. Je höher der Differenzierungsgrad der Tumorzellen ist, desto mehr ähnelt der Tumor noch dem gesunden Gewebe. Das Grading hat prognostische Relevanz.

**Tabelle 1: Tumorgraduierung (Grading) nach WHO des CRC**

|             |                        |
|-------------|------------------------|
| Grad 1 (G1) | gut differenziert      |
| Grad 2 (G2) | mäßig differenziert    |
| Grad 3 (G3) | schlecht differenziert |
| Grad 4 (G4) | undifferenziert        |

### 2.2.8 TNM-Klassifikation des CRC (UICC 2010)

Die TNM-Klassifikation dient zur Einteilung maligner Tumoren. Sie besteht aus drei zentralen Bestandteilen. „T“ (Tumor) steht für die Ausdehnung und das Verhalten des Primärtumors. „N“ (Nodus) beschreibt den Befallstatus regionärer Lymphknoten, „M“ (Metastase) das Fehlen bzw. das Vorhandensein von Fernmetastasen.

**Tabelle 2: TNM-Klassifikation des CRC**

| TNM | Ausdehnung   |
|-----|--|
| Tis | Carcinoma in situ  |
| T1  | Infiltration der Submukosa   |
| T2  | Infiltration der Muscularis propria  |
| T3  | Infiltration der Subserosa oder Infiltration des perikolischen, perirektalen Fettgewebes |
| T4  | Infiltration des viszeralen Peritoneums (T4a) oder anderer Organe/Strukturen (T4b)       |
| N0  | keine regionären Lymphknotenmetastasen   |
| N1  | Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten   |
| N2a | Metastasen in 4-6 regionären Lymphknoten   |
| N2b | Metastasen in $\geq 7$ regionären Lymphknoten  |
| M0  | keine Fernmetastasen   |
| M1a | Fernmetastasen: nur ein Organ betroffen  |
| M1b | Fernmetastasen: mehr als ein Organ betroffen oder Peritonealkarzinose                    |

### 2.2.9 UICC-Stadien des kolorektalen Karzinoms

Die UICC (Union internationale contre le cancer) ist eine internationale Organisation, deren Ziel die Bekämpfung bösartiger Krebserkrankungen ist. Sie widmet sich der Förderung von Erforschung, Prävention und Behandlung von Krebserkrankungen. Unter Einbeziehung der

TNM-Klassifikation entwickelt die UICC eine Stadieneinteilung, in welcher Therapiemöglichkeiten und Prognose einzelner maligner Tumoren Berücksichtigung finden.

**Tabelle 3: Vereinfachte Darstellung der UICC-Stadien des kolorektalen Karzinoms**

| UICC-Stadium | TNM                     |
|--------------|-------------------------|
| 0            | Tis (Carcinoma in situ) |
| I            | Bis T2, N0, M0          |
| II           | T3 oder T4, N0, M0      |
| III          | Jedes T, N1/N2, M0      |
| IV           | Jedes T, jedes N, M1    |

### 2.2.10 Therapie

Die Therapie des CRC richtet sich primär nach der Tumorlokalisation und dem Staging. Zu den kurativen chirurgischen Therapien des Rektumkarzinoms gehört die tiefe anteriore Rektumresektion mit totaler mesorektaler Exzision (TME). Dieses Verfahren bewahrt den Schließmuskel und damit zugleich die Kontinenz. Indes sollte der Abstand zwischen distalem Tumorrand und Anokutanlinie 5 cm nicht überschreiten, weshalb die starre Rektoskopie zur Bestimmung der Höhenangabe des Tumorunterrandes empfohlen wird. Sie ist zuverlässiger als die Messung mit dem flexiblen Endoskop und sollte daher obligater Bestandteil der präoperativen Diagnostik beim Rektumkarzinom sein (S3 –Leitlinie Kolorektales Karzinom 2019).

Bei tiefliegenden Tumoren, die nicht sphinktererhaltend operiert werden können, bietet sich die abdominoperineale Rektumexstirpation (APR) mit Stomaanlage an.

Die transanale endoskopische Mikrochirurgie (TEM) kommt bei Low-grade-T1-Karzinomen ohne Lymphgefäßinvasion zum Einsatz und beinhaltet die lokale Exzision rektaler Neoplasien. Der kurative chirurgische Therapieansatz beim Kolonkarzinom umfasst die offene oder laparoskopische En-bloc-Resektion des tumortragenden Darmabschnitts und die regionale Lymphadenektomie. Zu beachten ist auch die Blutversorgung des betroffenen Darmabschnittes. Unter Einhaltung eines angemessenen Sicherheitsabstandes sowie in Abhängigkeit von der exakten Tumorlokalisation bedeutet dies eine Hemikolektomie, eine Transversumresektion oder eine Sigmaresektion. Befindet sich der Tumor im Bereich der Flexuren, wird eine erweiterte Hemikolektomie rechts bzw. links vorgenommen.

Resektable Fernmetastasen der Leber und der Lunge können in kurativer Absicht entfernt werden. Möglicherweise ist zuvor eine neoadjuvante Chemotherapie notwendig. Einige

Patienten mit isolierter Peritonealkarzinose können von einer zytoreduktiven Chirurgie in Kombination mit einer hyperthermen intraperitonealen Chemotherapie (HIPEC) profitieren.

Um eine verbesserte Ausgangssituation für die Operation zu schaffen, kommen neoadjuvante Therapiekonzepte zur Anwendung. Diese können zu einer signifikanten Tumorverkleinerung führen und eine R0-Resektion sowie einen Sphinktererhalt noch ermöglichen. Beim fortgeschrittenen Rektumkarzinom im UICC-Stadium II und III wird zu einer Radio- oder Radiochemotherapie vor dem chirurgischen Eingriff angeraten. Die präoperative Bestrahlung in Kombination mit einer 5-Fluorouracil-Monochemotherapie kann die Gabe von Folinsäure beinhalten. Im Anschluss an die Operation ist dann eine adjuvante Chemotherapie unabhängig vom postoperativen Tumorstadium indiziert. Dieses Behandlungsschema steigert die 5-Jahresüberlebensrate und senkt die Wahrscheinlichkeit eines Lokalrezidivs.

Nach vollständiger operativer Entfernung eines Kolonkarzinoms im UICC-Stadium III ist eine adjuvante Chemotherapie angebracht. Im Stadium II kann diese Vorgehensweise erwogen werden. Diesbezüglich sollte das zytostatisch wirksame Oxaliplatin aus der Gruppe der Platin-Derivate eingesetzt werden. Es ist gemeinsam mit 5-FU und Folinsäure Bestandteil des FOLFOX-Behandlungsregimes und wird zusammen mit Capecitabin im XELOX-Schema verwendet. Ziel ist, die Rückfallrate zu verringern und die Heilungschance zu erhöhen.

Die Vorgehensweise in palliativer Situation umfasst verschiedene Optionen. Grundsätzlich ist eine medikamentöse Tumortherapie indiziert, da ein Überlebensvorteil nachgewiesen ist und tumorbedingte Symptome reduziert werden können. Dementsprechend sollten die Patienten unter Berücksichtigung ihres Allgemeinzustandes eine möglichst effektive Kombinationstherapie erhalten. Hierfür stehen unterschiedliche Strategien zur Verfügung. Basis der Polychemotherapie ist die Applikation von 5-FU mit Folinsäure oder die Gabe eines Fluoropyrimidin-haltigen Prodrugs (Capecitabin). Häufig werden zusätzlich Irinotecan bzw. Oxaliplatin verabreicht. Vielfach verwendete Behandlungsschemata sind bekanntlich FOLFOX und FOLFIRI. Letzteres besteht aus einer Kombination von 5-FU, Folinsäure und Irinotecan.

Unlängst wurden auch einige monoklonale Antikörper zur Behandlung eines fortgeschrittenen CRC zugelassen. Beispielsweise richtet sich Bevacizumab gegen VEGF (vascular endothelial growth factor) und hemmt auf diese Weise die Angiogenese. Dagegen zielt die Therapie mit Cetuximab auf den EGF-Rezeptor (epidermal growth factor receptor, EGFR) ab und ist nur wirksam, wenn das KRAS-Gen nicht mutiert ist.

Bei Lebermetastasen können lokale Therapieverfahren zu einer Verbesserung der Lebensqualität führen und potenziell die Lebenszeit verlängern. Die transarterielle

Chemoembolisation (TACE) ist eine Methode aus dem Gebiet der interventionellen Radiologie, welche eine lokale Chemotherapie und die gezielte Embolisation von tumorversorgenden Gefäßen inkludiert. Hingegen nutzt die Radiofrequenzablation (RFA) hochfrequenten elektrischen Strom, um das Gewebe in einem eng umschriebenen Areal durch Hitze zu zerstören. Einzelne Lungenmetastasen können ebenfalls durch minimalinvasive Ablationsverfahren beseitigt werden.

Zur Palliation des Rektumkarzinoms werden endoskopische Techniken und Methoden angewendet, die eine hohe lokale Effektivität besitzen und für den Patienten wenig belastend sind. Zu den möglichen Eingriffen zählt beispielsweise die Lasertherapie, die Argonplasmakoagulation oder die Stentimplantation. Wichtig ist neben funktionellen Ergebnissen auch das subjektive Wohlbefinden der Patienten. Ferner können beim Kolonkarzinom folgenschwere Komplikationen durch die Anlage einer palliativen Umgehungsanastomose vermieden werden.

### **2.2.11 Darmkrebsfrüherkennung und Vorsorge**

Personen, die keiner Risikogruppe für das Auftreten eines CRC angehören, sollten ab dem Alter von 50 Jahren eine Untersuchung zur Früherkennung wahrnehmen. Da die vollständige, hohe Koloskopie die höchste Sensitivität und Spezifität für das Auffinden von Karzinomen und Adenomen besitzt, gilt sie als Goldstandard für die Darmkrebsprävention. Bei unauffälligem Befund ist es angeraten, die Koloskopie nach 10 Jahren zu wiederholen. Patienten, die diese Untersuchung ablehnen, wird die Durchführung einer Sigmoidoskopie empfohlen; zusätzlich sollte jährlich ein fäkaler okkultter Bluttest (FOBT) veranlasst werden. Endoskopische Verfahren bieten den Vorteil, Adenome therapeutisch abtragen zu können und dadurch die Entstehung von Karzinomen zu verhindern [13,14]. Auf diese Weise lässt sich ebenfalls die CRC-bedingte Mortalität senken [15].

Übliche FOBT verwenden mit Guajakharz imprägnierte Filterpapiere. Nach Zugabe von Wasserstoffperoxid und bei Anwesenheit von Blut im Stuhl kommt es zur Blaufärbung des Testfeldes, wodurch die Pseudoperoxidaseaktivität des Hämoglobins nachgewiesen wird. Nachteilig am Guajak-Test sind die mäßige Spezifität sowie die relativ niedrige Sensitivität. Überdies bluten viele CRCs intermittierend [16], wodurch lediglich die wiederholte Testung zu einem verlässlicheren Screening führt [17,18]. Jeweils zwei Proben von drei aufeinanderfolgenden Stuhlgängen werden untersucht. Falls mindestens eines der Testfelder eine Blaufärbung anzeigt, gilt der Test als positiv; und eine vollständige Koloskopie zur Abklärung ist erforderlich. Von Vorteil sind die einfache Durchführbarkeit sowie die

Kosteneffektivität. Alternativ zum Guajak Test können Immunologische FOBT (iFOBT) mit nachweislich hoher Spezifität und Sensitivität durchgeführt werden. Die digital-rektale Untersuchung gehört ebenfalls zu den unerlässlichen Maßnahmen der Früherkennung.

Stuhluntersuchungen auf DNA-Veränderungen und der M2-Pyruvatkinase (M2PK)-Test sollten derzeit nicht für die zuverlässige Darmkrebsvorsorge eingesetzt werden. Das Gleiche gilt für die Kapsel-Koloskopie.

Bei einem Teil der Bevölkerung besteht aufgrund prädisponierender Faktoren eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines CRC. Eine Risikogruppe bilden Personen, die familiär ein erhöhtes Risiko aufweisen. Eingeschlossen sind etwa Verwandte ersten Grades eines Patienten mit CRC. Zu der zweiten Risikogruppe gehören erwiesene oder potenzielle Anlageträger für ein hereditäres CRC, zur dritten zählen Individuen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (siehe Ätiologie). Hier gelten besondere Empfehlungen für die Darmkrebsfrüherkennung. Beispielsweise sollte bei LS-Patienten die erste Koloskopie im Alter von 25 Jahren erfolgen. Anschließend ist ein jährliches Untersuchungsintervall empfohlen. Abweichend davon sollte die erste Koloskopie 5 Jahre vor dem jüngsten Manifestationsalter in der Familie erfolgen. Zusätzlich sind Vorsorgeuntersuchungen auf extrakolonische Tumoren nötig. Bei FAP-Patienten sollten Vorsorgeuntersuchungen bereits ab dem 10. Lebensjahr veranlasst werden. Dazu gehört auch eine humangenetische Beratung (S3 –Leitlinie Kolorektales Karzinom 2019).

## **2.3 Zelllinien**

### **2.3.1 Grundlagen**

Als Zellkultur wird die Kultivierung lebender Zellen außerhalb des Organismus bezeichnet. Als Primärkultur bezeichnet man eine nicht immortalisierte Zellkultur, die direkt aus einem Gewebe gewonnen wurde. Erlangen jedoch Zellen einer Gewebeart die Fähigkeit, unbegrenzt zu proliferieren, sind sie de facto immortalisiert. Dann konnte aus einer Primärkultur eine Zelllinie etabliert werden [19]. Bei schlecht wachsenden Zelltypen können beispielsweise Fütterzellen oder Bestandteile der extrazellulären Matrix verwendet werden, um die Zellen zu Teilung anzuregen.

In der Regel kultiviert man tierische Zellen im Inkubator bei 37 °C mit einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub>. Durch den Inkubator werden unter anderem eine optimale Luftfeuchtigkeit, um ein Austrocknen der Zellkultur zu verhindern, und optimale Temperatur gewährleistet. Zur Kultivierung von Zellen benötigt man außerdem spezielle Nährmedien. Das Nährmedium muss so beschaffen sein, dass es den Zellen der Zellkultur entweder die Proliferation oder die

Differenzierung ermöglicht. Die genaue Zusammensetzung des Nährmediums ist dabei stark vom Zelltyp abhängig. Klassische Bestandteile eines Mediums sind Aminosäuren, Vitamine, anorganische Salze und Puffergemische. Als Zusätze können beispielsweise Glutamin, fötales Kälberserum (FCS), Antibiotika, Antimykotika sowie pH-Indikatoren zugefügt werden. Das FCS liefert Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone, Bindungs- und Transportproteine, Anheftungs- und Ausbreitungsfaktoren sowie zusätzliche Aminosäuren, Vitamine, Spurenelemente, Fettsäuren und Lipide [20]. Antibiotika und Antimykotika werden zugesetzt, um mögliche Kontaminationen zu bekämpfen. Jeder zelluläre Prozess hat ein pH-Optimum. Die meisten Zellkulturmedien nutzen das Kohlensäure-Bicarbonat-Puffersystem, um dieses aufrechtzuerhalten. Der konstante CO<sub>2</sub>-Gehalt im Inkubator spielt eine entscheidende Rolle, um diese Pufferkapazität in der Zellkultur zu gewährleisten [20]. Ist die Pufferkapazität des Systems durch die Anreicherung saurer Stoffwechselprodukte der Zellen überschritten, liegt ein beginnender Nährstoffmangel vor. Um den Verbrauch des Mediums sichtbar zu machen, wird deshalb ein pH-Indikator verwendet. Das häufig verwendete Phenolrot zeigt dies durch einen Farbumschlag von Rotviolett nach Gelb an [20].

Man kann des Weiteren zwischen adhärent, nicht adhärent und semi-adhärent wachsenden Zellen unterscheiden. In der konventionellen zweidimensionalen Zellkultur (2D-Zellkultur) breiten sich adhärente Zellen auf einer Plastik- oder Glasunterlage als sogenannter „Monolayer“ aus. Nicht adhärent wachsende Zellen werden flotierend in einer Suspensionskultur gehalten, während semi-adhärente Zellen in einer Matrix als Zellcluster auswachsen [19]. Von der 2D-Zellkultur lässt sich deshalb die 3D-Zellkultur abgrenzen. Letztere beachtet die Dreidimensionalität von Gewebe und versucht, organspezifische Bedingungen weitgehend zu berücksichtigen. Dies geschieht hauptsächlich in Form von Hydrogelen aus Gerüstproteinen wie etwa Kollagen, Gelatine-Methacrylat oder Matrigel [21].

### **2.3.2 Anwendung**

Zelllinien werden vor allem in Forschung und Entwicklung eingesetzt. Der Stoffwechsel der Zellen, die Zellteilung sowie viele weitere zelluläre Prozesse können mit ihrer Hilfe erforscht werden. Die kultivierten Zellen können weiterhin als Testsysteme genutzt werden. Wenn es gelingt, Tumorzellen dauerhaft zu vermehren und eine Zelllinie zu etablieren, steht genug Material zur Testung neuer Therapien zur Verfügung. Man kann die Wirkung von Substanzen auf die Signaltransduktion und die Toxizität der Zellen untersuchen. Dies ist auch beim CRC von entscheidender Bedeutung.

## **2.4 Extrazelluläre Matrix und Anoikis**

Eine schwache Adhäsion von Zellen auf Gewebekulturoberflächen stellt in der Zellkultur ein häufiges Problem dar. Für gewöhnlich sind Zellen in Geweben organisiert und an Substrate, wie die Basalmembran oder lockeres Bindegewebe, gebunden. Zum Gewebe gehört – abgesehen von den Zellen – auch die extrazelluläre Matrix (extracellular matrix, ECM). Zusammen mit der interstitiellen Flüssigkeit füllt sie die Interzellularräume. Sie umfasst die Gesamtheit der Makromoleküle, die von Zellen synthetisiert und sezerniert werden und im Extrazellularraum ein komplexes räumliches Netzwerk bilden. Neben Strukturfunktionen reguliert sie auch zelluläre Funktionen. Die ECM dient einerseits als Substrat für Zelladhäsion und -wanderung und beeinflusst andererseits Zelldifferenzierung, Zellproliferation sowie Apoptose. Bedeutsam ist die wechselseitige Interaktion zwischen Zellen und der ECM. Damit sie ihre korrekten Funktionen ausüben können, ist die Ausbildung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten notwendig. Wichtige zelluläre Rezeptoren, die ECM-Proteine binden, sind die Integrine. Über diese werden verschiedene Signalkaskaden in Gang gesetzt und sie ermöglichen in vielen Fällen erst, dass Wachstumsfaktoren ihre Wirkung entfalten können [22].

Zellen, die ihren Kontakt zur ECM verloren haben, durchlaufen normalerweise eine Form des programmierten Zelltodes, die Anoikis genannt wird [23]. Anoikis garantiert üblicherweise, dass „heimatlose“ Zellen eliminiert werden. Ein wichtiger Schritt in der Tumorprogression ist, dass Tumorzellen eine gewisse Zeit ohne die korrekten Signale der ECM überleben können. Diese Fähigkeit wird als „anchorage-independent growth (AIG)“ bezeichnet. Sie ermöglicht es, Tumorzellen zu disseminieren, und erlaubt invasives Wachstum [24]. Auch Rho-assoziierte Proteinkinasen haben Einfluss auf die ECM sowie die Ausbildung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten. Dies wird genauer in Abschnitt 2.9 erläutert.

Um der schwachen Adhäsion der Tumorzellen auf den Gewebekulturoberflächen entgegenzuwirken, wurden diese mit Kollagen beschichtet, welches ein wichtiger Bestandteil der ECM ist. Es ist das am häufigsten verwendete ECM-Protein, das zur Kultivierung von Zellen verwendet wird.

## **2.5 Xenotransplantation**

In der vorliegenden Arbeit diente die Xenotransplantation zur Tumorproliferation in immundefizienten Mäusen, um das Tumorgewebe im weiteren Verlauf zu explantieren und davon Zellkulturen anzulegen. Die Definition einer Xenotransplantation ist die Übertragung von lebens- und funktionstüchtigen Zellen oder Zellverbänden zwischen verschiedenen

Spezies. Diese Zellen, Gewebe oder Organe werden dann als Xenografts bezeichnet. Wenn Tumorgewebe direkt vom Patienten in immundefiziente Mäuse übertragen wird, spricht man von patient-derived xenografts (PDX). Das Ziel ist die Vermehrung der Tumorzellen. Die Mäuse müssen dazu immundefizient sein, damit das körperfremde Gewebe nicht abgestoßen wird und proliferieren kann. Für die Forschung stehen verschiedene Mäusespezies zur Xenotransplantation zur Verfügung. Bei einer Xenotransplantation ist auch der Transplantationsort zu beachten. Von einer orthotopen Transplantation spricht man, wenn Explantations- und Transplantationsort übereinstimmen. Bei der heterotopen Transplantation ist das nicht der Fall.

## 2.6 NSG-Mäuse

NOD scid gamma (NSG)-Mäuse sind ebenso bekannt als NOD-scid IL2Rg<sup>null</sup> oder NOD-scid IL2Rgamma<sup>null</sup>. Neben den athymischen Nacktmäusen gehören sie auch zu den Inzuchtstämmen immundefizienter Mäuse und werden häufig als Modellorganismus eingesetzt. Aufgrund der Kombination verschiedener genetischer Immundefekte können Tiere Fremdgewebe nicht effizient abstoßen. Auch hier kamen sie im Rahmen der Xenotransplantation zum Einsatz.

Der genetische Hintergrundstamm dieser Tiere ist der NOD/ShiLtJ-Mausstamm. Sie sind gekennzeichnet durch eine Funktions- und Differenzierungsstörung von antigenpräsentierenden Zellen sowie eine fehlerhafte Komplementaktivierung [25]. Doch NSG-Mäuse besitzen nicht nur Defekte in der unspezifischen Immunabwehr, sondern weisen außerdem Merkmale des schweren kombinierten Immundefekts (SCID, severe combined immunodeficiency) auf. Die murine Prkdc<sup>scid</sup>-Mutation ist eine Loss-of-Function-Mutation. Damit ist die Funktionsfähigkeit des betroffenen Genprodukts eingeschränkt. Das betroffene PRKDC-Gen codiert für die katalytische Untereinheit einer DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK), welche für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen benötigt wird und ausschlaggebend für die sogenannte V(D)J-Rekombination ist [26]. Dies ist ein spezifischer Vorgang der genetischen Rekombination während der frühen T- und B-Zellreifung. Er sorgt für die hohe Variabilität produzierter Immunglobuline und T-Zell-Rezeptoren (TCRs). Damit spielt die V(D)J-Rekombination eine entscheidende Rolle für das adaptive/spezifische Immunsystem. Homozygotie für Prkdc<sup>scid</sup> führt folglich zu einer deutlich reduzierten Anzahl vollentwickelter T- und B-Zellen betroffener Tiere [25,27].

NSG-Mäuse besitzen weiterhin eine Nullmutation in dem Gen, welches für die Interleukin-2-Rezeptor (IL-2R) gamma chain ( $\gamma$ -chain) codiert. Diese targeted Mutation führt zu einer

vollständigen Zerstörung ihrer Funktion. Man spricht deshalb auch von Knockout-Mäusen. Die IL-2R  $\gamma$ -chain ist ein notwendiger Teil der hochaffinen Rezeptoren für IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 und IL-15. Sie ist entscheidend für die Signaltransduktion dieser Zytokine [28]. Genannte Interleukine spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der Immunabwehr. Das Fehlen der IL-2R  $\gamma$ -chain führt zur schweren Beeinträchtigung der Funktion und Entwicklung von T- und B-Zellen. Außerdem verhindert es die Entwicklung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) [29]. Die genannten Immundefekte führen zu einem sehr guten Anwachsen der transplantierten Zellen in den NSG-Mäusen.

## **2.7 Cyclooxygenasen, Prostaglandine, cAMP und deren Einfluss auf CRCs**

Cyclooxygenasen (COX) sind die wesentlichen Enzyme am Anfang der Prostaglandinsynthese. Sie werden in verschiedenen Geweben und Organen exprimiert. Das Isoenzym COX-2 kommt zudem in einer Reihe von Tumorzellen stark vermehrt vor. Dies ist auch bei bis zu 80 % der kolorektalen Adenome und Karzinome der Fall [30,31]. Das legt die Beteiligung der COX-2 und der Prostaglandine an intestinaler Karzinogenese nahe. Klinische Studien haben gezeigt, dass die langfristige Einnahme von COX-Inhibitoren die CRC-Inzidenz deutlich senken kann [32]. Dabei spielen verschiedene Faktoren eine Rolle. Einerseits hemmen NSAIDs die Proliferation und die Angiogenese [33] in kolorektalen Tumorzelllinien, andererseits induzieren sie Apoptose [34].

Das vorherrschende Prostaglandin in der Pathogenese von CRCs ist das PGE<sub>2</sub> [35]. Es bindet an G-Protein gekoppelte Membranrezeptoren und entfaltet darüber unterschiedliche Wirkungen. Die G-Proteine dienen als molekulare Schalter bei der Signaltransduktion. Der PGE<sub>2</sub>-Rezeptor EP<sub>4</sub> wird in humanen CRCs überexprimiert [36]. Über ihn wird mittels G<sub>αs</sub> die membranständige Adenylatcyclase aktiviert. Diese synthetisiert zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), wodurch es zu einem Anstieg dieses second messengers kommt [37]. Die PGE<sub>2</sub> vermittelte Signaltransduktion über EP<sub>4</sub>-Rezeptoren ist mit der Entstehung von CRCs assoziiert [36].

In vitro führte eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels zu einer Induktion des inhibitor of apoptosis protein 2 (IAP-2). Dieses hemmt wiederum direkt die Caspase-3, was zu einer Unterdrückung der Apoptose führt [38]. Durch die Zunahme dieses antiapoptotischen Faktors kann so der programmierte Zelltod in intestinalen Epithelzellen inhibiert werden. Verschiedene cAMP-Agonisten, wie PGE<sub>2</sub>, Cholera toxin oder ein cell-permeable cAMP analog, zeigten in vitro diesen Effekt [39].

## 2.8 Cholera toxin (CTX)

CTX ist ein Exotoxin, das von dem Bakterium *Vibrio cholerae*, dem Auslöser der Cholera, produziert wird. Das Toxin durchquert die Plasmamembran und führt dort zur ADP-Ribosylierung der  $\alpha$ -Untereinheit eines heterotrimeren  $G_s$ -Proteins, welches an die Adenylatcyclase gekoppelt ist [40]. Dies führt zur Hemmung der intrinsischen GTPase-Aktivität der  $G_{\alpha s}$ -Untereinheit. Guanosintriphosphat (GTP) kann nicht mehr in Guanosindiphosphat (GDP) + Pi hydrolysiert werden [41] und das  $G_s$ -Protein bleibt irreversibel aktiviert. Dadurch wird die Adenylatcyclase in einen permanent aktiven Zustand überführt und es kommt zu einem Überschuss des second messengers cAMP. Wie in Absatz 2.3 erwähnt, führt der Anstieg des cAMPs in vitro zu einer Induktion des IAP-2 bei intestinalen Epithelzellen [39]. Das Protein inhibiert direkt die Caspase-3, was eine Hemmung der Apoptose bewirkt [38]. Dieser Mechanismus liefert einen Erklärungsansatz für den protektiven Effekt von NSAIDs gegen die Entstehung von CRCs. Die verwendete Konzentration des CTX lag hier bei 250 ng/ml [39]. Über die Hemmung des programmierten Zelltodes ist es vorstellbar, dass sich das CTX positiv auf die Etablierung von kolorektalen Tumorzelllinien auswirkt. Durch den Einsatz von CTX konnte bereits das Wachstum anderer kultivierter Zelltypen gefördert werden [42].

## 2.9 Rho-assoziierte Proteinkinasen (ROCKs) und Y-27632

### 2.9.1 Allgemeines

Rho-assoziierte Proteinkinasen (ROCKs) sind Serin/Threonin-Kinasen. Sie sind Effektoren des kleinen GTPase-Proteins Rho (Ras homologue) und wesentlicher Bestandteil der Signaltransduktion. Die beiden ROCK-Isoformen ROCK1 und ROCK2 weisen eine starke Sequenzhomologie auf und werden ubiquitär exprimiert. Dennoch findet sich ROCK1 bei Mäusen vermehrt in Nieren, Lunge, Leber, Milz und Hoden. ROCK2 hingegen wird verstärkt in Gehirn und Herz exprimiert [43].

Durch ROCK-Aktivierung hervorgerufene Effekte werden über die Phosphorylierung von verschiedenen Substraten vermittelt. Sie spielen bei unterschiedlichen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle, wie der Zellkontraktilität, der Zellteilung, der Organisation des Aktinzytoskeletts oder der Bildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionen (focal adhesions) [44].

## 2.9.2 Signalkaskade

Verschiedene Substrate werden durch ROCKs phosphoryliert, einschließlich der LIM-Kinase, der Myosin leichten Ketten (MLC) und der MLC-Phosphatase. Die phosphorylierte und damit aktive LIM-Kinase phosphoryliert wiederum ADF/cofilin, wodurch weniger Aktinfilamente depolymerisiert werden. ROCKs führen so zu einer Stabilisierung und Zunahme der Mikrofilamente. Die Phosphorylierung der MLC durch ROCKs erhöht die ATPase-Aktivität vom Myosin II. Myosine sind Motorproteine und für die Kontraktilität von muskulären sowie nichtmuskulären Zellen verantwortlich. Sie verspannen Aktinfilamente und sind wichtig für das Entstehen von kontraktile Bündeln (Stressfasern), als Reaktion der Zelle auf starke Scherkräfte. Unter ATP-Spaltung führt Myosin zu einer Gleitbewegung der Aktinfilamente. Folglich bewirkt die vermehrte ATPase-Aktivität der Myosin Köpfe eine Zunahme der Kontraktilität. Des Weiteren inaktiviert ROCK die MLC-Phosphatase, woraus ebenfalls eine gesteigerte Verkürzungsfähigkeit der Filamente resultiert.

## 2.9.3 Einblick in die Regulation der ROCK-Aktivität

Die Regulation der ROCK-Aktivität ist ein komplexer Vorgang. Verschiedene microRNAs (miRNA oder miR) sind als nichtcodierende RNAs in die Genregulation der ROCKs involviert. Sie binden an die 3' untranslatierte Region (3'-UTR) der Messenger-RNA (mRNA) von Zielgenen und beeinflussen deren Stabilität. Die Funktion der miRNAs ist die Translationshemmung und der Abbau der mRNA. MiR 126 führt über diesen Mechanismus zur verminderten Transduktion des RhoA/ROCK-Signalweges beim CRC. Allerdings ist miR 126 bei dieser Tumorentität herunterreguliert (besonders beim metastasierten CRC) [45], wodurch sich eine vermehrte Migration von Tumorzellen sowie ein gesteigertes Zellwachstum zeigten [46].

## 2.9.4 Tumorinvasion und Metastasierung

Die meisten Studien sprechen der verstärkten ROCK-Aktivierung einen fördernden Effekt auf Tumorinvasion und Metastasierung zu. Die durch sie und ihre nachgeschalteten Effektorproteine hervorgerufenen Effekte führten zu Veränderungen im Bereich der Zelladhäsion und zur gesteigerten Zellmigration.

In anderen Studien konnte zugleich eine Hemmung der Tumorprogression durch eine ROCK-Inhibition gezeigt werden. Dem liegt unter anderem die reduzierte Ausbildung von Stressfasern zugrunde [47]. Auch die verminderte Formation fokaler Adhäsionen ist von

Bedeutung. Fokale Adhäsionen sind Zell-Matrix-Kontakte und koppeln das Aktin-Zytoskelett mechanisch an die ECM. Außerdem kommt ihrem dynamischen Auf- und Abbau bei der Zellmigration eine bedeutende Rolle zu.

Beim Prozess der Metastasierung ist außerdem der Verlust von Zell-Zell-Kontakten relevant, auf welchen ROCKs ebenfalls Einfluss haben. Zur molekularen Grundlage für die Dissoziation von Tumorzellen aus dem Primärtumorverband gehört der Verlust von Oberflächenmolekülen, welche die Adhäsion der Zellen untereinander vermitteln. Zur Gruppe dieser Adhäsionsmoleküle gehören unter anderem die Cadherine. Das epithelspezifische E-Cadherin fungiert als Suppressor von Invasion und Metastasierung. Eine reduzierte Expression von E-Cadherin in vivo ist mit einer schlechten Prognose der Patienten assoziiert [48–50]. Durch eine ROCK-Inhibition konnte hingegen eine Wiederherstellung der E-Cadherin vermittelten Adhärens-Kontakte gezeigt werden [51]. Daraus resultiert wiederum eine verminderte Dissemination von Tumorzellen.

Nach der Ablösung aus dem Primärtumor muss die Tumorzelle die ECM durchwandern. Hierbei bildet die Auflösung der ECM einen wesentlichen Teilschritt. Sie erfolgt durch eine ganze Reihe von Matrix-Metalloproteasen (MMPs), Serinproteinasen, Zysteinproteinasen und Aspartatproteinasen [52]. Die Inhibition von ROCK führte dagegen zu einer Hemmung der Expression von proteolytisch wirkenden Enzymen, wie MMP9 und Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator (uPA) [53].

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen gibt es Studien, in welchen ein förderlicher Effekt der ROCK Inhibition auf die Tumorinvasion beschrieben wurde. Bei einigen Zelllinien des CRC konnte durch eine ROCK-Inhibition, unter Beteiligung des AKT-Signalweges, eine verstärkte Migration der Tumorzellen beobachtet werden [54].

### **2.9.5 ROCK in Tumorstammzellen (CSCs)**

ROCK-Inhibitoren kommen ferner zur Kultivierung von Stammzellen zum Einsatz. Durch ihren Einsatz wurde zunächst ein erleichtertes in-vitro Wachstum von humanen embryonalen Stammzellen beobachtet. Mithilfe von Y-27632 in einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  konnten das Überleben verbessert werden und gesteigerte Klonierungsraten konnten erzielt werden [58]. Dieser Effekt ließ sich anschließend auch für andere Zelltypen aufzeigen. Als Grund dafür wird nicht zuletzt die Hemmung der durch Zelldissoziation induzierten Apoptose angegeben [59]. Auch die Hemmung der EMT [60] und die Wiederherstellung der E-Cadherin vermittelten Adhärens-Kontakte [51] sind von Bedeutung.

Des Weiteren kommt Y-27632 ebenso zur Kultivierung von Tumorstammzellen (CSCs) zum Einsatz. Solche CSCs besitzen Stammzeleigenschaften, wie die Selbsterneuerung und die Fähigkeit sich in unterschiedliche Zellen zu differenzieren. Allein diese spezielle Subpopulation der Tumorzellen soll zur Tumorgenese fähig sein. Ihnen wird außerdem eine Resistenz gegenüber Zytostatika zugeschrieben und sie werden für Tumorrezidive verantwortlich gemacht [61]. CSCs exprimieren Stammzellmarker. Auch beim CRC ist das Vorhandensein von CSCs beschrieben worden [62,63], welche charakteristische Zelltypmarker wie z.B. CD133, CD44, CD166 und ALDH1 exprimieren [64,65].

Eine Methode zur Kultivierung von Zellen mithilfe von Y-27632 und bestrahlten Fibroblasten wird als conditional reprogramming bezeichnet. Dieses Prinzip wird zur Vermehrung von Zellen unterschiedlicher Gewebe genutzt. Unter diesen Bedingungen nehmen die Zellen Eigenschaften von Stammzellen an [66]. Sie werden weniger gut differenziert und beginnen sich rasch zu teilen. Dieser Effekt ist reversibel.

Die Arbeitsgruppe um X. Liu konnte zeigen, dass eine ROCK Inhibition mit Y-27632, in Kombination mit Fibroblasten-Feeder-Zellen, eine unbegrenzte Teilung epithelialer Zellen von Mamma und Prostata nach sich zieht [67]. Die in dieser Arbeit verwendete Konzentration des Y-27632 betrug ebenfalls 10  $\mu\text{mol/l}$ . Zu erwähnen ist, dass das eingesetzte Nährmedium ebenso 8,4 ng/ml CTX enthielt. In Anlehnung an diese Studie wird das CTX hier im Versuch in der gleichen Konzentration verwandt.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

Die verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte sind im Anhang im Detail aufgeführt. Das zum Anlegen der Zellkulturen verwendete MOITUM Nährmedium wurde von der Arbeitsgruppe M.O.I der Universitätsklinik Rostock entwickelt, weshalb dessen genaue Zusammensetzung nicht aufgeführt wird (8 Medium MOITUM).

##### **3.1.1 Tumorpräparate**

Zur Optimierung der Etablierung humaner kolorektaler Karzinomzellen wurden insgesamt 32 Tumorpräparate untersucht. In Tabelle 4 ist deren Herkunft aufgeführt. Die Originaltumoren stammen stets von Patienten der Abteilung für Allgemeine-, Thorax-, Gefäß- und Transplantationschirurgie der Universität Rostock. Diese gaben ihr Einverständnis zur Beteiligung an der klinischen Forschung zur verbesserten Diagnose/Frühdia gnose, Therapie,

Nachsorge und Prognose im Rahmen der „Norddeutsche Tumorbank Darmkrebs“. Aus den Tumorpräparaten wurden vitale Areale von Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Rostock entnommen und zur Verfügung gestellt. Die Unterscheidung erfolgt zwischen primären Tumorgeweben und im Mausmodell vermehrten Tumorgeweben.

**Tabelle 4: Übersichtstabelle der verwendeten Tumorgewebe**

| Tumor              | Herkunft des Tumors |
|--------------------|---------------------|
| HROC29 fT1 M2      | Xenograft           |
| HROC48Met1 fT1 M2  | Xenograft           |
| HROC50 fT1 M4      | Xenograft           |
| HROC50 fT1 M5      | Xenograft           |
| HROC68 T2 M1       | Xenograft           |
| HROC68 T2 M2       | Xenograft           |
| HROC71 fT1 M7      | Xenograft           |
| HROC113 fT1 M1     | Xenograft           |
| HROC117 fT1 M3     | Xenograft           |
| HROC123 fT1 M4     | Xenograft           |
| HROC130 fT1 M1     | Xenograft           |
| HROC135 fT1 M2     | Xenograft           |
| HROC143 fT1 M2     | Xenograft           |
| HROC169 fT1 M2     | Xenograft           |
| HROC170 fT1 M1     | Xenograft           |
| HROC190 T1 M2      | Xenograft           |
| HROC203 T1 M1      | Xenograft           |
| HROC204 fT2 M1     | Xenograft           |
| HROC248 fT1 M1     | Xenograft           |
| HROC250 T2 M1      | Xenograft           |
| HROC253Met1 fT0 M3 | Xenograft           |
| HROC277 fT2 M1     | Xenograft           |
| HROC277Met2 fT0 M1 | Xenograft           |
| HROC288 T2 M3      | Xenograft           |
| HROC300 fT1 M1     | Xenograft           |
| HROC300Met1 T2 M1  | Xenograft           |

|             |         |
|-------------|---------|
| HROC347     | Patient |
| HROC348     | Patient |
| HROC348Met1 | Patient |
| HROC349     | Patient |
| HROC352     | Patient |
| HROC355     | Patient |

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Xenografts**

Es wurden Tumorstücke vom CRC subkutan in die Flanken von NSG-Mäusen transplantiert (heterotope Transplantation). Dies geschah in Narkose. Der Zustand der Mäuse wurde regelmäßig kontrolliert und das Wachstum des Tumorgewebes mindestens wöchentlich ausgemessen sowie dokumentiert. Nachdem die Xenografts einen Durchmesser von ca. 1 cm erreicht hatten, wurden sie explantiert. Die NSG-Mäuse wurden dazu fachgerecht narkotisiert und nach aktuell geltenden tierschutzrechtlichen Vorschriften getötet. Anschließend wurden die Xenografts, wie in 3.2.2 beschrieben, in Kultur genommen. Diese Arbeitsschritte wurden freundlicherweise unter Anwendung strenger Standardarbeitsanweisungen (SOPs) von Mitarbeitern der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt [109].

### **3.2.2 Zellbiologische Methoden**

Zur Kultivierung der Zelllinien wurde das zweidimensionale Zellkultursystem gewählt. Das Anlegen der Kultur erfolgte aus Zellsuspensionen. Das Prinzip des Herstellens dieser Zellsuspension ist im Folgenden erklärt.

#### **3.2.2.1 Herstellung einer Tumorzellsuspension**

Die entnommenen Tumorstückchen bzw. die Xenografts wurden zunächst mit 3 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) in ein steriles 6-Well gegeben. Kryokonservierte Proben wurden vorher aufgetaut. Anschließend erfolgte die mechanische Zerkleinerung des Gewebes. Dies geschah durch wiederholtes Schneiden mit zwei sterilen, über Kreuz gehaltenen Skalpellens. Mit einer 25 ml serologischen Pipette wurde die Tumorsuspension dann in ein steriles 100 µm Zellsieb überführt, welches zuvor auf ein 50 ml Falcon gesetzt wurde. Durch das Ausüben von Druck und leichten Drehbewegungen mit dem Stempel einer sterilen 5 ml Spritze wurde das Tumorgewebe durch das Zellsieb gepresst, bis sich die Gewebestücke nicht weiter

zerkleinern ließen. Die im Sieb befindlichen Zellen wurden durch das wiederholte Spülen mit Medium in Suspension gebracht.

### **3.2.2.2 Herstellung eines Zellpellets**

Die hergestellte Tumorzellsuspension wurde bei 1200 U/min für 10 min zentrifugiert. Dadurch setzten sich die Zellen am Boden des Falcon-Röhrchens ab und bildeten ein Pellet. Der Überstand wurde verworfen. Das hergestellte Zellpellet wurde genutzt, um eine 2D-Kultur anzulegen oder ein Backup zu erstellen.

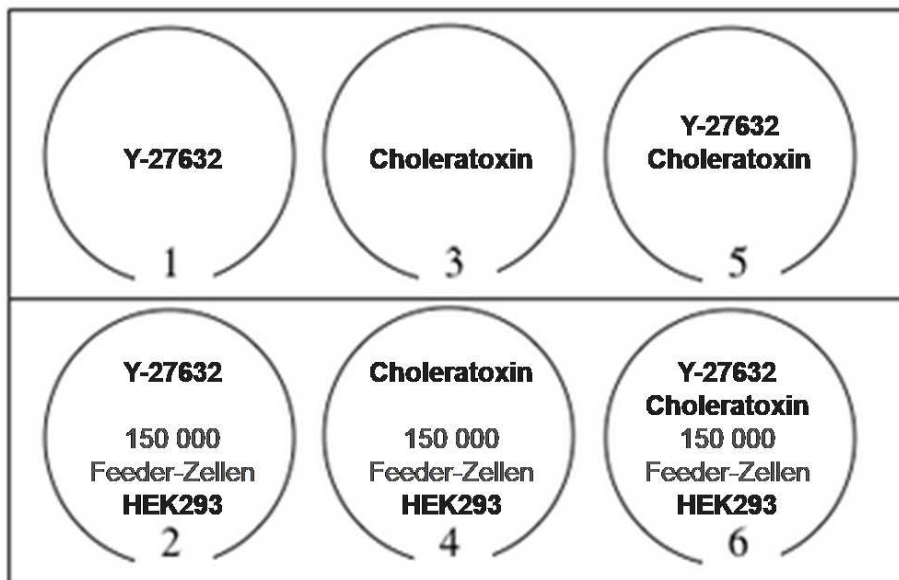
### **3.2.2.3 Anlegen der 2D-Kultur**

Für die zweidimensionalen Primärkulturen wurden Mikrotiterplatten verwendet. Pro Tumorpräparat wurden dafür je drei 6-Well-Platten angelegt. Da eine schwache Adhäsion von Zellen auf Gewebekulturoberflächen ein häufiges Problem darstellt, erfolgte zuvor eine Beschichtung der Kavitäten mit Kollagen. Kollagen ist ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix (ECM) [69]. Die ECM hat Einfluss auf die Proliferation der Zellen, ihre Form, die Migration sowie deren Entwicklung und Überleben [70,71]. Zu diesem Zweck ist Kollagen das am häufigsten verwendete ECM-Protein, welches für die Zellkultur genutzt wird.

Das hergestellte Zellpellet wurde in 36 ml frischem MOITUM Medium (0 % FCS) resuspendiert. Im Anschluss wurde in jedes einzelne Well der Mikrotiterplatten 2 ml der angefertigten Tumorzellsuspension gegeben. Komplettiert wurden die ersten beiden Mikrotiterplatten, wie in Abbildung 1 und Abbildung 2 dargestellt. Die dritte 6-Well-Platte verblieb als Kontrolle und die Kavitäten wurde lediglich mit 2 ml MOITUM Medium (0 % FCS) aufgefüllt.

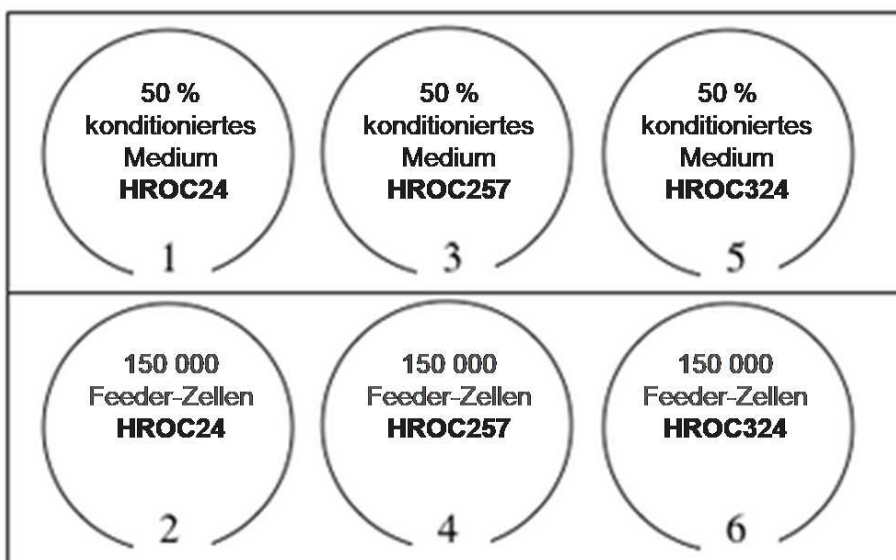
### Abbildung 1: Plattendefinition I der angelegten 6-Well-Platte

Jedes Well enthielt zunächst 2 ml der erzeugten Tumorzellsuspension. Die Wells 1, 3 und 5 wurden mit 2 ml MOITUM Medium (0 % FCS) aufgefüllt. In den Wells 2, 4 und 6 wurden 2 ml der in 3.2.2.6 hergestellten Suspension mit den 150 000 darin befindlichen Feeder-Zellen gegeben. Außerdem wurde Y-27632 in einer Konzentration von 10 µmol/l und CTX in einer Konzentration von 8,4 ng/ml zu den abgebildeten Wells beigefügt.



### Abbildung 2: Plattendefinition II der angelegten 6-Well-Platte

Jedes Well enthielt zunächst 2 ml der erzeugten Tumorzellsuspension. Die Wells 1, 3 und 5 wurden mit 2 ml des konditionierten Mediums der abgebildeten Zelllinien ergänzt. In den Wells 2, 4 und 6 wurden 2 ml der in 3.2.2.6 hergestellten Suspension mit den 150 000 darin befindlichen Feeder-Zellen gegeben.



Im Verlauf wurde die Plattendefinition II angepasst. Demnach wurden das konditionierte Medium und die Feeder-Zellen von HROC277 T0 M1, HROC112Met T0 M2 sowie HHC6548 T1 M1 eingesetzt.

#### **3.2.2.4 Feeder-Zellen**

Die bereits etablierten Zelllinien HEK293 Cambridge, HROC324, HROC24 T1 M1, HROC257 T0 M1, HROC277 T0 M1, HROC112Met T0 M2 und HHC6548 T1 M1 wurden als sogenannte Feeder-Zellen verwendet.

Feeder-Zellen werden schon seit längerem zur Kultivierung von humanen embryonalen Stammzellen verwendet. Sie fördern deren Wachstum und Überleben durch die Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Bei Feeder-Zellen handelt es sich um lebensfähige und bioaktive Zellen, die dagegen ihre Fähigkeit zur Zellteilung verloren haben. Außerdem erzeugen sie ECM, die sich positiv auf das Anheften der in Co-Kultur befindlichen Zellen auswirkt [72]. Um die Feeder-Zellen in ihrer Proliferation zu hemmen, wurden sie mit einer Dosis von 60 Gy radioaktiv bestrahlt. Durch die fehlende Möglichkeit zur Teilung besitzen die Zellen nur eine begrenzte Lebensdauer und sterben nach wenigen Tagen bis Wochen. Dadurch können die gefütterten Zellen typenrein isoliert werden, sobald sie in ausreichender Anzahl vorhanden sind. Bis zu diesem Zeitpunkt müssen in regelmäßigen Abständen neue Feeder-Zellen hinzugefügt werden, um die abgestorbenen zu ersetzen.

#### **3.2.2.5 Passagieren**

Die Zellen, die als Feeder-Zellen dienen sollten, vermehrten sich zunächst in großen Zellkulturflaschen mit 175 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche in Standardmedium (10 % FCS). Kultiviert wurden sie im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

Um sie der Bestrahlung zuzuführen, mussten sie vorher geerntet und gezählt werden. Um die adhären Zellen am Boden der Kulturflaschen zu lösen, wurde zunächst das flüssige Nährmedium abgenommen und in jeweils ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Dieses *konditionierte Medium wurde für den weiteren Versuch noch benötigt*. Hinterher wurde die jeweilige Kulturflasche mit 2 ml PBS-Puffer gewaschen, um alle Mediumreste zu entfernen. Diese würden die Wirkung von Trypsin inhibieren, welches zum Ablösen der Zellen vom Kulturflaschenboden diente. Je 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung wurden in die Kulturflaschen pipettiert. Ethylendiamintetraacetat (EDTA) beschleunigt dabei den Vorgang der Trypsinierung. Es entfernt durch Komplexbildung zweiwertige Ionen, wie Calcium und Magnesium, welche zellbindende Membranproteine stabilisieren [19]. Anschließend wurden die Zellen im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 10-20 min bebrütet. Wenn sich alle haftenden Zellen abgelöst hatten, wurden mittels einer 10 ml serologischen Pipette 8 ml

Standardmedium (10 % FCS) hinzugefügt. Danach wurde die Tumorzellsuspension zur Zellzahlbestimmung in ein Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellzählung erfolgte mit Trypanblau.

### 3.2.2.6 Zellzählung und Vitalitätstest mit Trypanblau

Trypanblau ist ein saurer Farbstoff aus der Gruppe der Azofarbstoffe. Er dringt selektiv in tote Zelle ein. Diese werden dabei tiefblau angefärbt. Lebende Zellen bleiben ungefärbt und erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell. Zu beachten ist, dass Trypanblau bei zu langer Einwirkzeit zytotoxisch wirkt. Aufgrund dieses unerwünschten Nebeneffekts steigt die Anzahl toter Zellen bei zu langer Einwirkdauer [19].

50 µl der hergestellten Tumorzellsuspension wurden mit 50 µl einer 0,4 %igen Trypanblau-Lösung gemischt, etwa 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und zum Füllen einer Neubauer-Zählkammer verwendet. Anschließend wurden zwei gegenüberliegende Großquadrate unter dem Mikroskop ausgezählt. Doch vor der eigentlichen Zählung wurde das gesamte Linienraster mit einer geringen Vergrößerung betrachtet und geprüft, ob sich die Teilchen einigermaßen gleichmäßig über die Quadrate verteilt hatten. Andernfalls wurde die Zellsuspension nochmals aufgeschüttelt und neu aufgebracht. Eine ungleichmäßige Verteilung resultierte in einer stark schwankende Teilchenzahlen pro ausgezähltem Quadrat.

Mit folgender Auswertungsformel ließ sich dann die Anzahl der vitalen Zellen pro Volumeneinheit berechnen.

#### Auswertungsformel:

$$\text{Teilchen pro } \mu\text{l Volumen} = \frac{\text{ausgezählte Teilchen}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{)} \times \text{Kammertiefe (mm)} \times \text{Verdünnung}}$$

- Ausgezählte Fläche: 2 Großquadrate entsprechen 2 mm<sup>2</sup>
- Kammertiefe: 0,1 mm
- Verdünnung: 1:2

Gemäß Abbildung 1 und Abbildung 2 wurden je 150 000 Zellen für die jeweiligen Wells benötigt. Das entsprechende Volumen an Zellsuspension wurde abgenommen, in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und zunächst bei 1 200 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet hingegen wurde in frischem MOITUM Medium (0 % FCS) resuspendiert. Pro 150 000 Zellen wurden dafür 2 ml dieses Nährmediums verwendet. Anschließend erfolgte die bereits erwähnte radioaktive Bestrahlung, um die Zellen an ihrer Teilung zu hindern. Hinterher mussten nur noch 2 ml der Suspension, mit den 150 000 darin befindlichen Feeder-Zellen, zu den entsprechenden Wells hinzugegeben

werden. Bei 9,6 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche entspricht das einer Zelldichte von 15 625 Feeder-Zellen/cm<sup>2</sup> pro Well.

Von je 1,5 Millionen vitalen Zellen wurde ein weiteres Zellpellet hergestellt. Die Resuspendierung erfolgte dagegen in 20 ml Standardmedium (10 % FCS), um die entstandene Tumorzellsuspension anschließend wieder in die jeweilige Kulturfläche zu überführen. In dieser konnten sich die Zellen im Brutschrank abermals vervielfältigen, bis abgestorbene Feeder-Zellen ersetzt werden mussten.

### **3.2.2.7 Konditioniertes Medium**

Sobald ein Kulturmedium mit Zellen inkubiert wurde, wird es als konditioniertes Medium bezeichnet. Es enthält zusätzlich zu zahlreichen Ursprungskomponenten des Mediums Faktoren, die vom Zelltyp sezerniert wurden. Dazu zählen unter anderem zelluläre Metabolite, Wachstumsfaktoren und extrazelluläre Proteine.

Das in 3.2.2.5 gesammelte konditionierte Medium wurde zunächst bei 1 200 U/min für 10 min zentrifugiert. Um das Medium von verbleibenden zellulären Bestandteilen zu reinigen, wurde es durch einen sterilen Spritzenvorsatzfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm gepresst. Anschließend wurde es aliquotiert und bei -20 °C asserviert.

### **3.2.2.8 Kryokonservierung**

In diesem Versuch diente die Kryokonservierung zur Erstellung von Backups. Andererseits wurde auch vital eingefrorenes Tumorgewebe aufgetaut und dem Proberöhrchen entnommen, um damit anschließend eine Tumorzellsuspension herzustellen (siehe 3.2.2.1).

Unter Kryokonservierung versteht man das Haltbarmachen von Zellen und organischen Geweben durch Einfrieren. Sie ist für die Forschung in vielen biologischen und medizinischen Laboren unentbehrlich, weil die Proben derart über einen langen Zeitraum in flüssigem Stickstoff (-196 °C) aufbewahrt werden können. Die niedrigen Temperaturen sind notwendig, um biochemische sowie physikalische Prozesse drastisch zu reduzieren und die Stoffwechselfvorgänge nahezu zum Stillstand zu bringen.

Die Optimierung sowie die Standardisierung der Vorgänge des Einfrierens, der Lagerung und des Auftauens von Zell- und Gewebeproben sind dabei von entscheidender Bedeutung. Es müssen ausreichend hohe Überlebensraten erreicht werden, um eine weitere Kultivierung der Zellen nach dem Auftauen zu ermöglichen.

Ein Problem stellt die intra- und extrazelluläre Entstehung von Eiskristallen dar, welche zur mechanischen Schädigung von Zellorganellen und der Zellmembran führt. Veränderte Salzkonzentrationen sowie die osmotische Schädigung der Zellen machen eine weitere Schwierigkeit während des Gefriervorganges aus [73]. Zu den vorherrschenden

Verfahrensweisen, um eine schonende Konservierung der Zellen zu gewährleisten, gehören das langsame Einfrieren und die Vitrifizierung. Letztere ist gekennzeichnet durch die Entstehung eines amorphen, glasähnlichen Materials, wobei eine Kristallisation ausbleibt. Dieser Prozess wird durch die Verwendung von Kryoprotektiva und einer sehr schnellen Kühlrate realisiert.

Um Tumorgewebe vital einzufrieren, wurde sich an dieser Stelle jedoch für das langsame Einfrieren entschieden. Bei  $-80\text{ °C}$  erkalteten die Proben unter Zuhilfenahme eines Freezing Containers mit einer konstanten Kühlrate von  $1\text{ °C/Minute}$ . Auch bei dieser Verfahrensweise ist die Verwendung von Kryoprotektiva notwendig. Sie senken den Gefrierpunkt, um die schädlichen Auswirkungen des Einfrierens zu minimieren. Dem Standardmedium (10 % FCS) wurde aus diesem Grund die kryoprotektive Substanz Dimethylsulfoxid (DMSO), zu einem Volumenanteil von 10 %, beigesetzt. DMSO ist membrangängig und kann intra- sowie extrazellulär seine Schutzfunktion entwickeln. Nachteilig ist dessen zytotoxische Wirkung in höheren Konzentrationen [74].

Letztlich können durch die Kryokonservierung Zell- und Gewebeproben über Jahrzehnte in Flüssigstickstofftanks aufbewahrt werden und nach dem Auftauen ihre normalen physiologischen Prozesse wieder aufnehmen.

### **3.2.3 Molekulare Methoden**

#### **3.2.3.1 Mykoplasmen-Kontamination**

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, sind gute Zellkultur-Bedingungen unverzichtbar. Eines der Hauptprobleme ist die Kontamination mit Mykoplasmen. Bakterien- und Pilzkontaminationen sind trotz ihrer Bedeutung meist offensichtlich sowie einfach zu detektieren.

Mykoplasmen dagegen sind klein und pleomorph. Ein wichtiger Unterschied zwischen ihnen und andere Bakterien ist das Fehlen einer Zellwand. Sie besitzen lediglich eine flexible Membran. Durch diese Tatsache und ihrer Adhärenz zur Oberfläche befallener Zellen sind sie auch unter dem Lichtmikroskop nicht erkennbar. Ihre geringe Größe spielt dabei ebenfalls eine Rolle. Sie sind sogar in der Lage, gebräuchliche Sterilisationsfilter mit einer Porengröße von  $0,22\text{ }\mu\text{m}$  zu passieren [75]. Ohne Zellwand bleiben sie zusätzlich von vielen gängigen Antibiotika, wie Penicillinen oder anderen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, die die Zellwandsynthese beeinflussen, unberührt. Ein weiteres Problem ist, dass Mykoplasmen hohe Konzentrationen im Medium infizierter Zellen erreichen können, ohne eine merkliche Trübung des Mediums hervorzurufen [76]. Obwohl Mykoplasmen den Zellen keine sichtbaren Schäden zufügen,

beeinflussen sie deren Wachstum und Proteinsynthese, die Sekretion von Zytokinen und können sogar die DNA und die RNA schädigen [77].

Etwa 5-30 % der Zellkulturen weltweit sind mit Mykoplasmen kontaminiert (5-16 % [78], 15 % [79], 25,7 % [80], 29 % [81], 28 % [82]).

### 3.2.3.2 Mykoplasmen Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um eine Kreuzkontamination zu vermeiden, mussten die Zelllinien HEK293 Cambridge, HROC324, HROC24 T1 M1, HROC257 T0 M1, HROC277 T0 M1, HROC112Met T0 M2 und HHC6548 T1 M1, die als Feeder-Zellen dienten, auf eine Verunreinigung mit Mykoplasmen untersucht werden. Zum Nachweis von Mykoplasmen wurde das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit anschließender Gelelektrophorese gewählt. Die PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung bestimmter Gen-Sequenzen innerhalb einer DNA-Kette. Dafür wurden weitere Zellpellets einer Größe von ca. 1 Million Zellen benötigt. Diese wurde bis zum Zeitpunkt ihrer Verwendung bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert. Für die PCR wurden sie dann in jeweils in 200 µl PBS resuspendiert und anschließend auf 95 °C für ca. 5-10 min erhitzt. Zusätzlich wurden noch 1:100 Verdünnungen der Proben hergestellt. Anschließend wurden je 2,5 µl der Zellsuspension bzw. 2,5 µl von der 1:100 verdünnten Zellsuspension mit 22,5 µl des Mastermix versetzt. Der eingesetzte Mastermix enthielt zwei Primer, den Forward Primer sowie den Reverse Primer, einzelne Desoxyribonukleosidtriphosphat-Moleküle (dNTPs) und die Taq-Polymerase. Seine genaue Zusammensetzung ist im Anhang aufgeführt (9 Mastermix). Nachfolgend sind die jeweiligen Sequenzen der eingesetzten Primer dargestellt.

**Tabelle 5: Sequenzen der Primer für die Mykoplasmen-PCR**

|                |                               |
|----------------|-------------------------------|
| Forward Primer | GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG   |
| Reverse Primer | CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G |

Der PCR-Prozess bestand aus 40 Zyklen und wurde apparativ in einem Thermocycler durchgeführt. Jeder Reaktionszyklus bestand dabei aus drei Schritten. Im ersten Schritt, der Denaturierung, wurde die doppelsträngige DNA für 1 min auf 94 °C erhitzt. Dadurch wurden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden DNA-Strängen aufgebrochen. Die Nukleinsäure muss nämlich zur Vervielfältigung als Einzelstrang vorliegen. Die Primerhybridisierung erfolgte dann bei einer Temperatur von 60 °C. Diese Annealing-Temperatur wurde für 1 min konstant gehalten. Die Annealing-Temperatur ist abhängig von der Länge und der Sequenz der eingesetzten Primer. Folglich kann sie bei unterschiedlichen

PCRs variieren. Der forward und der reverse Primer binden dabei an das 3'-Ende der Gensequenzen des komplementären Stranges. Während der Phase der Genamplifikation wurden die Einzelstränge nun durch den Zusatz einer DNA-Polymerase und dNTPs zum jeweiligen Doppelstrang komplettiert. Dies geschah im Thermocycler bei 72 °C über eine Dauer von 1,5 min. Die hitzestabile Taq-Polymerase katalysiert dabei den Einbau der einzelnen dNTPs vom 5'- zum 3'-Ende [83]. Die Amplifizierung ist mit dieser Methode sehr effektiv. Theoretisch ergibt sich eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA-Moleküle. Die amplifizierte DNA wurde anschließend in einer Gelelektrophorese aufgetrennt.

### **3.2.3.3 Gelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese dient der Trennung von DNA-Fragmenten. Große DNA-Fragmente durchlaufen Agarosegele langsamer als kleine. Das liegt an der Siebstruktur der Agarose, deren Poren kleineren Fragmenten weniger Widerstand bieten [83].

Als Erstes wurde ein 1 %iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurden 1,5 g Agarose in 150 ml TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) durch Erhitzen gelöst. Das flüssige Gel wurde mit 9 µl Ethidiumbromid versetzt. Das Ethidiumbromid wird benötigt, um Nukleinsäuren sichtbar zu machen. Unter Verwendung eines Gelschlittens und eines Kammes wurde das Gel gegossen. Dieses musste anschließend etwa 30 min aushärten. Das erstarrte Gel wurde in die Elektrophoresekammer gegeben und mit Elektrophoresepuffer übergossen, bis es knapp bedeckt war. Anschließend wurden 20 µl der Proben, die mit 5 µl Loading-Dye versetzt wurden, in die Taschen pipettiert. Die Zugabe des Loading-Dyes erhöht die Dichte einer Probe und färbt diese an, wodurch der Beladungsprozess vereinfacht wird. Zusätzlich wurden 3 µl des 100 bp Markers in die erste Tasche pipettiert, um die Größe der aufgetrennten Banden bestimmen zu können. Die DNA-Fragmente wurden bei einer angelegten Spannung von ungefähr 90 Volt eine Stunde lang aufgetrennt.

Die Auswertung erfolgte unter einer UV-Lampe. DNA, an die Ethidiumbromid gebunden hat, fluoresziert unter UV-Licht. Da UV-Strahlung schädlich für Augen und Haut ist, wurde sich das Gel indirekt am Rechner angesehen. Die Fluoreszenzbilder wurden als Fotos aufgezeichnet und abgespeichert.

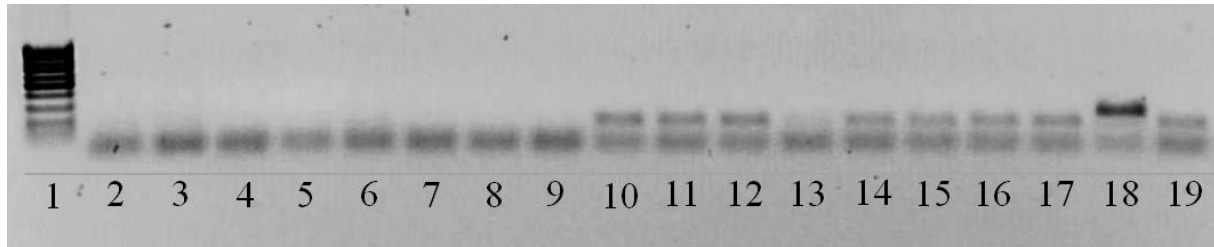
## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Mykoplasmen-PCR**

Die Mykoplasmen-PCR wurde durchgeführt, um eine mögliche Kreuzkontamination der neu angelegten Kulturen mit Mykoplasmen zu vermeiden. Deshalb wurden die Zelllinien HEK293

Cambridge, HROC324, HROC24 T1 M1, HROC257 T0 M1, HROC277 T0 M1, HROC112Met T0 M2 und HHC6548 T1 M1, die als Feeder-Zellen dienten, auf eine Verunreinigung mit Mykoplasmen untersucht.

**Abbildung 3: Gelelektrophorese der Mykoplasmen-PCR**



**Tabelle 6: Beschreibung und Ergebnis der Mykoplasmen-PCR**

| Tasche-Nr. | Zelllinie        | Nachweis des PCR-Produkts |         |
|------------|------------------|---------------------------|---------|
| 1          | Marker           | negativ                   |         |
| 2          | HEK293 Cambridge | negativ                   |         |
| 3          | HROC324          | negativ                   |         |
| 4          | HROC24 T1 M1     | negativ                   |         |
| 5          | HROC257 T0 M1    | negativ                   |         |
| 6          | HROC277 T0 M1    | negativ                   |         |
| 7          | HROC112Met T0 M2 | negativ                   |         |
| 8          | HHC6548 T1 M1    | negativ                   |         |
| 9          | X                | negativ                   |         |
| 10         | HEK293 Cambridge | Verdünnung 1:100          | negativ |
| 11         | HROC324          | Verdünnung 1:100          | negativ |
| 12         | HROC24 T1 M1     | Verdünnung 1:100          | negativ |
| 13         | HROC257 T0 M1    | Verdünnung 1:100          | negativ |
| 14         | HROC277 T0 M1    | Verdünnung 1:100          | negativ |
| 15         | HROC112Met T0 M2 | Verdünnung 1:100          | negativ |
| 16         | HHC6548 T1 M1    | Verdünnung 1:100          | negativ |
| 17         | X                | Verdünnung 1:100          | negativ |
| 18         | Positivkontrolle |                           | positiv |
| 19         | Negativkontrolle |                           | negativ |

Das amplifizierte PCR-Produkt mit einer Größe von ~0,5 kb konnte lediglich in Tasche 18 des Agarosegels nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um die Positivkontrolle. Die anderen Taschen enthielten kein PCR-Produkt, da keine entsprechend gefärbten DNA-Banden unter dem UV-Licht sichtbar waren. Folglich lag zu diesem Zeitpunkt keine Kontamination der Zelllinien mit Mykoplasmen vor. Die Zelllinie X wurde ebenfalls auf das Vorhandensein von Mykoplasmen-spezifischer DNA untersucht, wurde jedoch nicht für diesen Versuch verwendet.

## **4.2 Auswertung der einzelnen Zellkulturen**

### **4.2.1 HROC29 ft1 M2**

Während der ersten Tage in Kultur konnte eine stetige Proliferation der adhärennten Tumorzellen beobachtet werden, woraus eine Größenzunahme der Zellkolonien resultierte. Allerdings stagnierte das Wachstum in einigen Wells bereits nach kurzer Zeit. Die Zellen begannen zu sterben und schon an Kulturtag 12 wurden infolgedessen die beiden Wells mit dem konditionierten Medium von HROC24 und den HROC257 Feeder-Zellen eliminiert. Bedauerlicherweise musste die 6 Well-Platte, welche nach Plattendefinition II (Abbildung 2) angelegt wurde, an Kulturtag 17 aufgrund einer Kontamination mit Mikroorganismen vollständig entsorgt werden. An Tag 30 in Kultur wurden weitere Wells ausgesondert, sodass anschließend nur ein Kontroll-Well und die zwei Kavitäten mit dem Y-27632 + HEK293 und Y-27632 + CTX + HEK293 übrig blieben. Am 38. Kulturtag konnten vitale Tumorzellen einzig und allein in dem Well mit Y-27632 + CTX + HEK293 nachgewiesen werden, bis schließlich nur noch eine einzelne Kolonie Bestand hatte. An Kulturtag 125 wurde sich dazu entschlossen, die adhärennten Zellen durch Trypsinierung vom Boden der Mikrotiterplatte zu lösen und zu vereinzeln. Ziel sollte das erneute Anwachsen der Tumorzellen mit anschließender Proliferation sein. Diese Maßnahme brachte jedoch nicht den gewünschten Erfolg, woraufhin auch das letzte Well an Tag 151 eliminiert wurde.

### **4.2.2 HROC48Met1 ft1 M2**

Die Wells beinhalteten bereits an Kulturtag 8 nur noch vereinzelte adhärennte Tumorzellkolonien. Es war keine messbare Proliferation dieser Kolonien zu verzeichnen. Die Zelldichte nahm im Verlauf weiter ab, bis an Kulturtag 26 keine vitalen Tumorzellen mehr nachgewiesen werden konnten. Daraufhin wurden alle Mikrotiterplatten entsorgt.

### 4.2.3 HROC50 ft1 M4

Die 2D-Kultur von HROC50 ft1 M4 zeigte zu Anfang vereinzelte adhärenente Tumorzellkolonien. Es war keine messbare Proliferation zu verzeichnen und die Zellen starben allmählich ab. An Kulturtag 25 wurden schließlich folgende Wells eliminiert: Y-27632, CTX, Y-27632 + CTX, konditioniertes Medium HROC24 T1 M1, konditioniertes Medium HROC257 T0 M1, konditioniertes Medium HROC324 und HROC257 T0 M1 Feeder-Zellen. Die übrigen Kavitäten der Plattendefinition I und die Kontroll-Wells folgten an Kulturtag 33. Nachdem auch in den Wells mit den HROC324 und den HROC24 T1 M1 Feeder-Zellen keine vitalen Tumorzellen mehr nachgewiesen werden konnten, wurden diese schließlich an Kulturtag 54 eliminiert.

### 4.2.4 HROC50 ft1 M5

Bei der Kultivierung von HROC50 ft1 M5 dauerte es einige Zeit, bis sich Unterschiede in Koloniedichte und -größe zwischen den einzelnen Wells erkennen ließen. An Kulturtag 33 sahen einige Kontroll-Wells sehr erfolgversprechend aus, sodass das Well mit der höchsten Zelldichte in eine kleine beschichtete Zellkulturflasche mit 25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche passagiert wurde. Dagegen boten einige andere Kavitäten keinen so aussichtsreichen Anblick. Dies zeigen exemplarisch Abbildung 4 und Abbildung 5.

Abbildung 4: HROC50 ft1 M5 + CTX  
(Kulturtag 43)

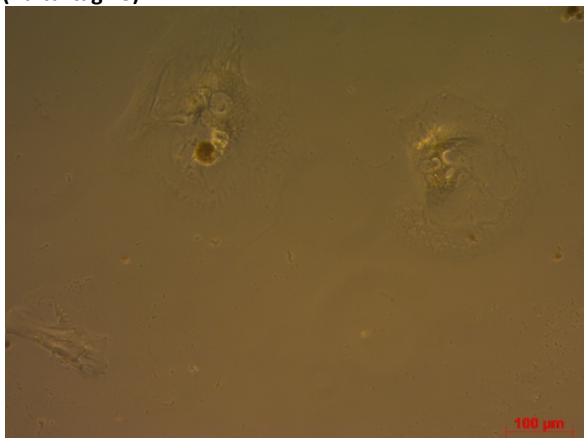
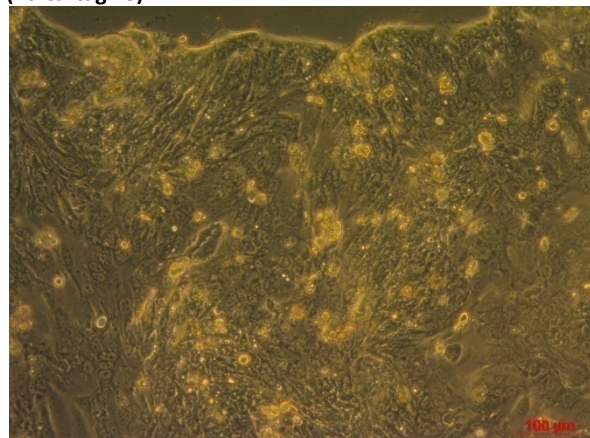


Abbildung 5: HROC50 ft1 M5 Kontrolle  
(Kulturtag 43)



An Kulturtag 62 wurden schließlich die Kavität mit dem CTX, das Well mit dem CTX + HEK293 und dasjenige mit den HROC257 Feeder-Zellen entsorgt. Auch die Wells mit Y-27632 + CTX+ HEK293 und Y-27632 + HEK293 wiesen nur noch vereinzelt adhärenente Kolonien auf, wobei keinerlei messbare Proliferation zu verzeichnen war. Gleichwohl war zu diesem Zeitpunkt die Oberfläche der kleinen Zellkulturflasche bereits größtenteils mit

adhärenten Tumorzellen bedeckt. Deshalb konnten die Zellen, welche ursprünglich aus einem Kontroll-Well stammten, in eine mittlere Zellkulturflasche passagiert werden.

Zugleich starben auch die Tumorzellen, denen Y-27632 zugesetzt wurde, zunehmend ab. Daraufhin wurden die Zellen dieses Wells an Tag 85 trypsiniert und vereinzelt, um ein erneutes Anwachsen zu ermöglichen. Dieser Versuch blieb erfolglos, weshalb die Kavität an Kulturtag 111 beseitigt wurde. Andererseits konnte zuvor ein weiteres Kontroll-Well in eine kleine Zellkulturflasche überführt werden.

An Kulturtag 113, dem letzten Tag der Dokumentation und des Experiments, waren im Well mit Y-27632 + HEK293 nur noch vereinzelt kleine Kolonien am äußeren Rand der Kavität erkennbar. Auch im Well mit Y-27632 + CTX+ HEK293 war lediglich eine einzelne Tumorzellkolonie übrig. Der Zustand hatte sich folglich im Vergleich zu Tag 62 nicht gebessert.

Zudem konnte in den drei Wells mit den konditionierten Medien sowie denjenigen mit den HROC324 und HROC24 Feeder-Zellen ebenfalls keine Konfluenz erreicht werden. Die Kavität mit den HROC324 Feeder-Zellen war zusätzlich mit Fibroblasten verunreinigt. Angesichts dessen wurden sämtliche Mikrotiterplatten entsorgt.

Im Gegensatz dazu waren die Tumorzellen aus der mittleren Zellkulturflasche mittlerweile in eine unbeschichtete große Zellkulturflasche mit 175 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche überführt worden. Bei Passage 6 erfolgte die Umstellung des MOITUM-Mediums auf Standardmedium. Es war eine stetige Zunahme der Anzahl der Zellen von HROC50 ft1 M5 zu erkennen. Weiterhin wurden Backups von jeder Passage der weitergeführten Kulturen erstellt. Das Ergebnis war die erfolgreiche Etablierung der HROC50 ft1 M5-Zelllinie aus den Kontroll-Wells.

#### **4.2.5 HROC68 T2 M1**

Zwei Tage nach der Inkulturnahme von HROC68 T2 M1 waren nur wenige kleine Tumorzellkolonien in den einzelnen Schächten der Mikrotiterplatten mikroskopisch fassbar. Über den darauffolgenden Zeitraum nahm die Größe der Kolonien weiter ab. An Kulturtag 41 wurde die Kontrollplatte entsorgt. An Kulturtag 51 folgte die Mikrotiterplatte, welche schematisch nach Plattendefinition I (Abbildung 1) angelegt wurde. Schließlich wurde nach 55 Tagen der Kultivierung auch die 6 Well-Platte gemäß Plattendefinition II (Abbildung 2) eliminiert. Der Grund dafür war jeweils das Fehlen vitaler Tumorzellen in den entsprechenden Kavitäten.

#### 4.2.6 HROC68 T2 M2

In der 2D-Kultur von HROC68 T2 M2 zeigte sich zunächst die Ausbildung von adhärennten Tumorzellkolonien. Diese unterschieden sich mikroskopisch nicht wesentlich in Hinsicht auf die Koloniegröße und -dichte. In den darauffolgenden Tagen konnte mikroskopisch eine Abnahme der Zellzahl registriert werden, bis schließlich keine vitalen Tumorzellen mehr in den Kavitäten nachweisbar waren. Aus diesem Grund wurde an Kulturtag 33 die Mikrotiterplatte, welche schematisch nach Plattendefinition I (Abbildung 1) angelegt wurde, entsorgt. Nach 43 Tagen der Kultivierung wurden letztlich auch alle Kavitäten der Plattendefinition II und sämtliche Kontroll-Wells eliminiert.

#### 4.2.7 HROC71 ft1 M7

Nach 25 Tagen in Kultur zeichnete sich bereits eine Tendenz ab. Die Wells mit dem konditionierten Medium von HROC24, dem konditionierten Medium von HROC324, die Kontroll-Wells und auch das Well, welchem CTX zugesetzt wurde, beinhalteten zu diesem Zeitpunkt nur vereinzelte, kleine Tumorzellkolonien. Im Gegensatz dazu wiesen die Wells, welchen Y-27632 zugegeben wurde, eine deutlich höhere Koloniedichte auf. Dies lässt sich exemplarisch sehr gut auf Abbildung 6 und Abbildung 7 erkennen.

Abbildung 6: HROC71 ft1 M7 + CTX  
(Kulturtag 25)

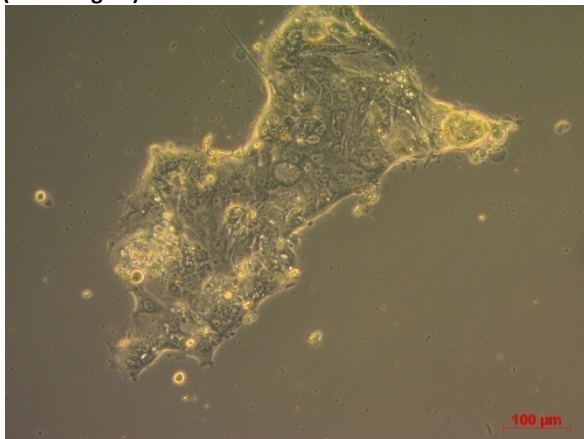
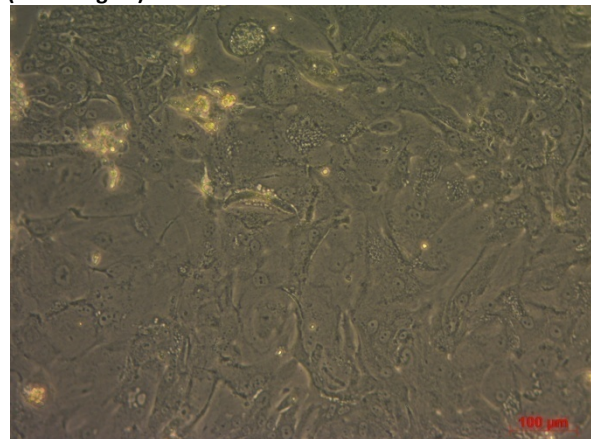


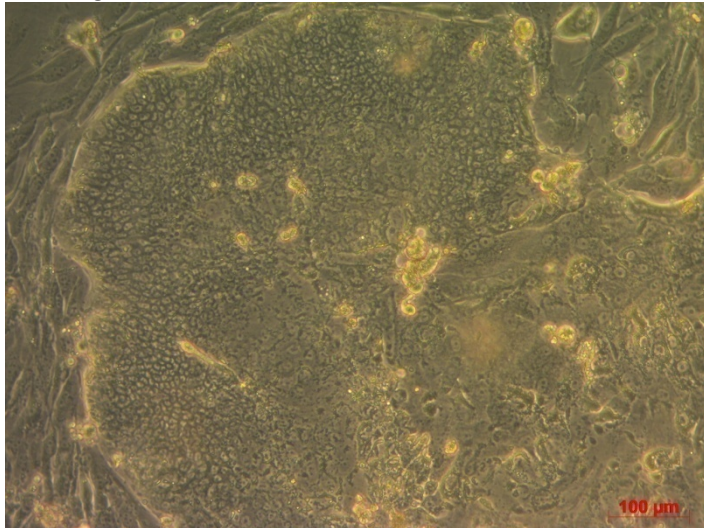
Abbildung 7: HROC71 ft1 M7 + Y-27632 + CTX + HEK 293  
(Kulturtag 25)



Die Tumorzellkolonie auf Abbildung 7 umfasst den gesamten Bildausschnitt. So wurden die Kavitäten Y-27632 + CTX + HEK293 und Y-27632 + HEK293 an Kulturtag 27 in jeweils eine Zellkulturflasche mit einer Wachstumsoberflächen von 25 cm<sup>2</sup> passagiert. Eine Woche später wurden auch die Tumorzellen, welchen lediglich Y-27632 beigegeben wurde, in solch eine kleine Zellkulturflasche subkultiviert.

An Kulturtag 53 wurden dann die ersten Wells eliminiert, da in diesen keine vitalen Tumorzellen mehr verzeichnet werden konnten. Wie abzusehen war, handelte es sich um die beiden Kavitäten mit CTX und dem konditionierten Medium von HROC24. Demgegenüber zeigte sich in den drei Zellkulturflaschen ein stetiges Wachstum der adhärennten Tumorzellen. Problematisch war einzig und allein die Tatsache, dass die Wachstumsfläche durch das Vorhandensein zahlreicher Fibroblasten eingeschränkt wurde.

**Abbildung 8: HROC71 ft1 M7 + Y-27632**



Dennoch konnten die Tumorzellen aus den zwei kleinen Zellkulturflaschen mit den Zusätzen Y-27632 + HEK293 und Y-27632 in je eine mittlere Zellkulturflasche mit 75 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche passagiert werden. In der darauffolgenden Zeit ist mehrfach versucht worden, selektiv die adhärennten Fibroblasten abzutrypsinieren und auszuwaschen, um die Zelldichte in den Kulturgefäßen zu verringern. Es gelang jedoch nie, alle Fibroblasten zu beseitigen, sodass diese rasch wieder nachwuchsen.

In einigen anderen Wells stagnierte die Proliferation hingegen und die Tumorzellen begannen zunehmend, abzusterben. So wurden an Kulturtag 101 die Kavität mit CTX+ HEK293, dasjenige mit dem konditionierten Medium von HROC324 als auch die Kontroll-Wells eliminiert. An Kulturtag 119 folgte das Well mit den HROC324 Feeder-Zellen und an Tag 125 das Well mit den HROC257 Feeder-Zellen. Bis inklusive des Kulturtags 153, des letzten Tags der Dokumentation und des Versuches, waren vitale Tumorzellen auch in den Schächten der Mikrotiterplatten mit dem konditionierten Medium von HROC257, den HROC24 Feeder-Zellen und Y-27632 + CTX erfassbar. Allerdings konnte in diesen keine Konfluenz erreicht werden. Die Zelldichte war nie hoch genug für eine Subkultivierung. Deshalb wurden an Kulturtag 153 sämtliche Mikrotiterplatten entsorgt und lediglich die

Tumorzellen in den Kulturflaschen weiterkultiviert. Am Ende konnte eine permanente Zelllinie auch durch die Arbeitsgruppe der M.O.I. nicht etabliert werden.

#### **4.2.8 HROC113 ft1 M1**

Die Tumorzellen der Primärkultur von HROC113 ft1 M1 bildeten anfänglich adhärente Kolonien in den angelegten Mikrotiterplatten aus. In den darauffolgenden Tagen musste mikroskopisch eine Größenregredienz der Kolonien verzeichnet werden. 26 Tage nach dem Anlegen der Primärkulturen wurden alle Mikrotiterplatten aufgrund des fehlenden Nachweises vitaler Tumorzellen beseitigt.

#### **4.2.9 HROC117 ft1 M3**

Die 2D-Kultur zeigte anfänglich kaum adhärente Zellkolonien. Weiterhin war keinerlei messbare Proliferation zu verzeichnen und die Kolonien starben rasch ab. Sobald mikroskopisch keine vitalen Tumorzellen mehr nachweisbar waren, wurde die entsprechende Kavität eliminiert. Bereits an Kulturtag 6 wurden die Wells mit Y-27632, Y-27632 + CTX, CTX, sämtliche Kontroll-Wells und die Kavitäten mit den konditionierten Medien entsorgt. Übrig blieben dementsprechend die Wells, welche zusätzlich die unterschiedlichen Feeder-Zellen beinhalteten. Zu diesem Zeitpunkt ließ sich nicht mit absoluter Sicherheit sagen, ob zwischen den Feeder-Zellen noch Kolonien vitaler Zellen von HROC117 ft1 M3 existierten, weshalb die Zellen zunächst weiterkultiviert wurden. Bei Wechsel des Nährmediums erfolgte jedoch keine erneute Zugabe von Feeder-Zellen zu den jeweiligen Kavitäten. Aufgrund ihrer Unfähigkeit zur Proliferation nahm die Anzahl der Feeder-Zellen über die weitere Dauer der Kultivierung stetig ab. An Kulturtag 26 wurden schließlich die restlichen Wells eliminiert, da sich mikroskopisch keine vitalen Zellen mehr erfassen ließen.

#### **4.2.10 HROC123 ft1 M4**

Am Tag nach der Inkulturnahme waren nur kleine Kolonien und wenig adhärente Tumorzellen in den Schächten der Mikrotiterplatten zu erkennen. Im Verlauf war keinerlei Proliferation zu verzeichnen und die Zellen starben rasch ab. Schon an Kulturtag 6 wurden die Wells mit Y-27632, Y-27632 + CTX, CTX, sämtliche Kontroll-Wells und die Kavitäten mit den konditionierten Medien von HROC324 und HROC24 T1 M1 entsorgt. Im Well mit dem konditionierten Medium von HROC257 T0 M1 ließen sich mikroskopisch nur noch einzelne adhärente Tumorzellen erkennen. Abgesehen davon wurden lediglich die Wells, welchen Feeder-Zellen hinzugefügt wurden, weiterkultiviert. Zu diesem Zeitpunkt ließ sich nicht mit

absoluter Sicherheit sagen, ob zwischen den Feeder-Zellen noch Kolonien vitaler Zellen von HROC123 ft1 M4 existierten. Bei Wechsel des Nährmediums erfolgte fortan keine erneute Zugabe von Feeder-Zellen zu den entsprechenden Kavitäten. Aufgrund ihrer begrenzten Lebensdauer nahm die Anzahl der Feeder-Zellen über den weiteren Kultivierungszeitraum ab. An Kulturtag 26 wurden schließlich alle verbliebenen Wells eliminiert, da mikroskopisch keine vitalen Zellen mehr nachweisbar waren.

#### 4.2.11 HROC130 ft1 M1

Die Tumorzellen der 2D-Kultur von HROC130 ft1 M1 bildeten zunächst adhärente Kolonien in den angelegten Mikrotiterplatten aus. Die Kolonien unterschieden sich anfangs nicht wesentlich in Hinblick auf ihre Größe und Dichte, wobei im darauffolgenden Zeitraum eine abnehmende Zellzahl registriert werden konnte. Das Absterben der Tumorzellen von HROC130 ft1 M1 verlief in den einzelnen Schächten der Mikrotiterplatten jedoch unterschiedlich schnell. Die Wells wurden eliminiert, sobald mikroskopisch keine vitalen Tumorzellen mehr nachweisbar waren. An Kulturtag 23 wurden schließlich sämtliche Kontroll-Wells, alle Kavitäten mit darin enthaltenen Feeder-Zellen sowie das Well mit dem konditionierten Medium von HROC257 T0 M1 entsorgt. Nach insgesamt 48 Tagen in Kultur wurden auch die Wells mit den konditionierten Medien von HROC277 T0 M1, HROC112Met T0 M2 und HHC6548 T1 M1 eliminiert. An Kulturtag 50, dem letzten Tag des Versuchs und der Dokumentation, waren in den beiden übrig gebliebenen Wells mit Y-27632 und Y-27632 + CTX lediglich vereinzelt adhärente Tumorzellen übrig. Aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Etablierung wurden beide Kavitäten beseitigt. Vergleich:

Abbildung 9: HROC130 ft1 M1 + Y-27632 + CTX  
(Kulturtag 14)

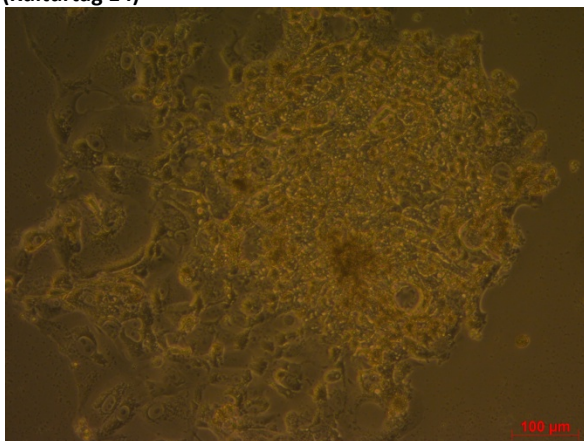
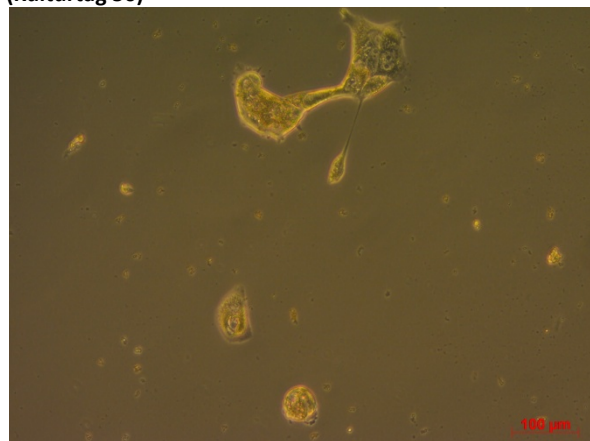


Abbildung 10: HROC130 ft1 M1 + Y-27632 + CTX  
(Kulturtag 50)



#### **4.2.12 HROC135 ft1 M2**

Zunächst bildeten die Tumorzellen der Primärkultur von HROC135 ft1 M2 adhärenente Kolonien in den Wells aus. Allerdings war im weiteren Verlauf eine Größenabnahme der Tumorzellkolonien unter dem Lichtmikroskop zu registrieren. Nach 13 Tagen der Kultivierung wurden letztlich sämtliche Mikrotiterplatten entsorgt, da keine vitalen Tumorzellen mehr erfasst werden konnten.

#### **4.2.13 HROC143 ft1 M2**

Die Tumorzellen der Primärkultur von HROC143 ft1 M2 bildeten zunächst adhärenente Kolonien in den Kavitäten der Mikrotiterplatten aus. Anfänglich blieb deren Größe relativ konstant, im Verlauf war jedoch eine Abnahme der Zellzahl zu verzeichnen und die Tumorzellen starben fortwährend ab. An Kulturtag 50 wurden schließlich sämtliche Wells, abgesehen von der Kavität mit dem konditionierten Medium von HHC6548 T1 M1, dem Well mit dem konditionierten Medium von HROC277 T0 M1 und den Kontroll-Wells, entsorgt. Schlussendlich wurden nach 64 Tagen in Kultur alle Kontroll-Wells eliminiert. Die anderen beiden aufgeführten Kavitäten, mit den beinhaltenden konditionierten Medien, waren bereits an Kulturtag 62 entsorgt worden. Grund für die Eliminierung war stets das Fehlen vitaler Tumorzellen in den entsprechenden Wells.

#### **4.2.14 HROC169 ft1 M2**

Nach dem Anlegen der 2D-Kultur bildeten die Tumorzellen adhärenente Kolonien in den Kavitäten der Mikrotiterplatten aus. Anfänglich blieb die Koloniegröße relativ konstant, im Verlauf war mikroskopisch jedoch eine Abnahme der Zellzahl zu verzeichnen. Allerdings starben die Tumorzellen von HROC169 ft1 M2 in den einzelnen Wells unterschiedlich schnell ab. Die entsprechenden Kavitäten wurden eliminiert, sobald mikroskopisch keine vitalen Tumorzellen mehr nachweisbar waren. An Kulturtag 35 wurde zunächst die Mikrotiterplatte, die nach Plattendefinition I angelegt wurde (Abbildung 1), entsorgt. An Kulturtag 45 folgten die beiden Wells mit dem konditionierten Medium von HROC257 T0 M1 und dem konditionierten Medium von HROC24 T1 M1. Nach insgesamt 53 Tagen in Kultur wurden sämtliche Kontroll-Wells eliminiert. Zu diesem Zeitpunkt waren in den übriggebliebenen Wells der Plattendefinition II auch nur noch einzelne kleine Tumorzellkolonien vorhanden. Letztendlich wurde diese Mikrotiterplatte an Kulturtag 73 entsorgt.

#### **4.2.15 HROC170 ft1 M1**

In den Wells der Primärkultur von HROC170 ft1 M1 bildeten die Tumorzellen zunächst einzelne adhärente Zellverbände aus. Allerdings war keinerlei messbare Proliferation zu registrieren und die Zellen starben rasch ab. Nach neun Tagen in Kultur waren in den Kavitäten beinahe keine überlebenden Tumorzellen, sondern fast ausschließlich Zelltrümmer zu detektieren. An Kulturtag 13 wurde schließlich ein Großteil der Wells eliminiert. In den verbliebenen drei Kavitäten mit den Feeder-Zellen von HROC257, HROC324 und HROC24 waren mikroskopisch nur vereinzelt adhärente Zellen und kleine Zellkolonien zu erkennen. Die visuelle Unterscheidung zwischen Tumorzellen und Feeder-Zellen war nicht sicher möglich. Schließlich wurden diese drei Wells an Kulturtag 33 eliminiert, da sämtliche Zellen abgestorben waren.

#### **4.2.16 HROC190 T1 M2**

Die Tumorzellen der Primärkultur von HROC190 T1 M2 bildeten zunächst adhärente Kolonien in den Wells der Mikrotiterplatten aus. Im weiteren Verlauf wurde eine langsame Abnahme der Koloniegröße und -dichte beobachtet.

An Kulturtag 47 wurden zunächst die Kavitäten mit den konditionierten Medien und sämtliche Kontroll-Wells eliminiert. Bereits einen Tag später folgten das Well mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632, das Well mit dem zugesetzten CTX sowie dasjenige mit CTX + HEK293.

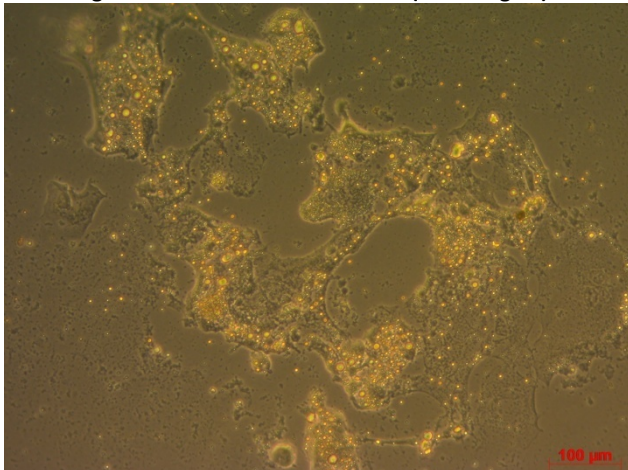
In der Kavität mit den Feeder-Zellen von HROC324 blieb die Größe der Kolonien zunächst relativ konstant. In den übrigen Kavitäten schritt das Absterben der Tumorzellen weiter voran. Nach insgesamt 61 Tagen in Kultur wurden die restlichen Kavitäten der Plattendefinition I (Abbildung 1) beseitigt. Aufgrund der geringen Koloniegröße war am Ende die Differenzierung zwischen den Feeder-Zellen und den HROC190 T1 M2-Tumorzellen schwierig. Zuletzt wurden an Kulturtag 71 die übrigen drei Wells mit den Feeder-Zellen HROC324, HROC257 und HROC24 entsorgt, nachdem mikroskopisch keine vitalen Zellen mehr nachweisbar gewesen waren.

#### **4.2.17 HROC203 T1 M1**

Die HROC203 T1 M1-Tumorzellen bildeten anfänglich adhärente Kolonien aus. Diese waren künftig größenregredient und eine Abnahme der Zellzahl wurde registriert. Nach 27 Tagen Kultivierung wurden zunächst alle Ansätze mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 entsorgt. An

Kulturtag 40 waren vitale Tumorzellen nur noch in vier Kontroll-Wells nachweisbar, weshalb alle anderen Wells beseitigt wurden. Die letzten vier Wells mit den Tumorzellen von HROC203 T1 M1 wurden nach einer Kultivierungsdauer von 64 Tagen (siehe Abbildung 11) an die Arbeitsgruppe der Molekularen Onkologie und Immuntherapie (M.O.I) übergeben. Eine permanente Zelllinie konnte letztendlich nicht etabliert werden.

**Abbildung 11: HROC203 T1 M1 Kontrolle (Kulturtag 64)**



#### **4.2.18 HROC204 ft2 M1**

Am Tag nach dem Anlegen der Primärkultur konnten am Boden der einzelnen Wells keine vitale Tumorzelle eruiert werden. Das Nährmedium erschien, bedingt durch die abgestorbenen Zellen, trübe verfärbt. Angesichts dessen wurden sämtliche Mikrotiterplatten an Kulturtag 1 eliminiert.

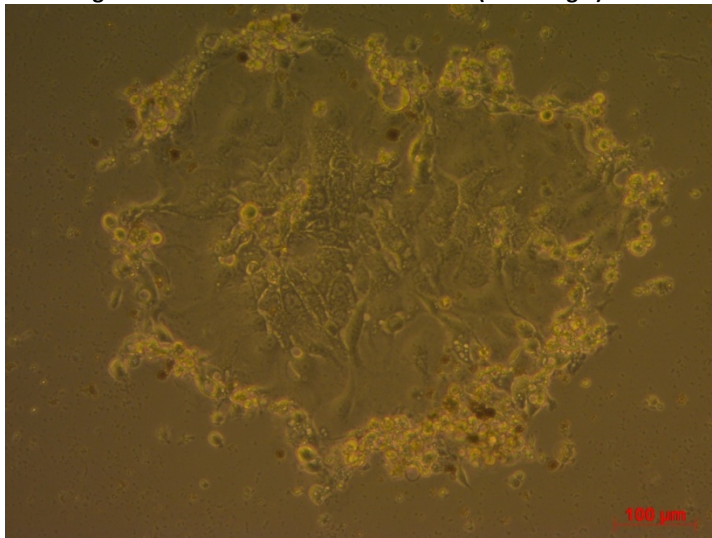
#### **4.2.19 HROC248 ft1 M1**

Nach dem Anlegen der 2D-Kultur bildeten die HROC248 ft1 M1-Tumorzellen adhärente Kolonien in den Kavitäten der Mikrotiterplatten aus. Im weiteren Verlauf wurde mikroskopisch eine langsame Abnahme der Koloniegröße und -dichte beobachtet. An Kulturtag 33 waren in den Kontroll-Wells, dem Well mit dem konditionierten Medium von HROC324 und in der Mikrotiterplatte, welche nach Plattendefinition I angelegt wurde, keine vitalen Tumorzellen mehr vorhanden. Infolgedessen wurden diese vernichtet. In den Kavitäten der letzten Mikrotiterplatte, welche nach Plattendefinition II angelegt wurde, schritt das Absterben der Zellen weiter voran. Diese wurde schließlich nach einer Kultivierungsdauer von 43 Tagen entsorgt.

#### 4.2.20 HROC250 T2 M1

Am Tag nach der Inkulturnahme von HROC250 T2 M1 waren mikroskopisch nur kleine Tumorzellkolonien in den Kavitäten der Mikrotiterplatten zu erkennen. Im Anschluss war keinerlei Proliferation zu verzeichnen und die Zellen starben besonders am Rand der Kolonien rasch ab (siehe Abbildung 12).

Abbildung 12: HROC250 T2 M1 + Y-27632 + CTX (Kulturtag 8)



Bereits an Kulturtag 8 ließ sich nicht sicher sagen, ob in den drei Wells mit den HROC277 T0 M1, HROC112Met T0 M2, HHC6548 T1 M1 Feeder-Zellen noch vitale HROC250 T2 M1-Tumorzellen vorhanden waren. Aus diesem Grund erfolgte zunächst keine erneute Zugabe von Feeder-Zellen zum Nährmedium dieser Wells. Da Feeder-Zellen nicht proliferieren und nur eine begrenzte Lebensdauer besitzen, nahm ihre Zellzahl über den weiteren Zeitraum der Kultivierung ab. An Kulturtag 13 wurden aufgrund des fehlenden Nachweises vitaler Tumorzellen alle anderen Kavitäten eliminiert. Die verbliebenen drei Wells mit den Feeder-Zellen wurden letztlich an Kulturtag 36 eliminiert.

#### 4.2.21 HROC253Met1 fT0 M3

Die Tumorzellen der Primärkultur von HROC253Met1 fT0 M3 bildeten anfänglich adhärente Kolonien aus. Fortan war eine Abnahme der Zellzahl und der Koloniegröße zu verzeichnen. An Tag 27 der Kultivierung wurden sowohl die Wells mit den Feeder-Zellen als auch die mit den konditionierten Medien von HROC257 T0 M1, HROC277 T0 M1 und HHC6548 T1 M1 eliminiert. Die Kavität mit Y-27632 + CTX + HEK293 wurde ebenfalls entsorgt. Die

restlichen Kulturansätze wurden an Kulturtag 29 der Arbeitsgruppe der M.O.I übergeben. Eine permanente Zelllinie konnte abschließend nicht etabliert werden.

#### **4.2.22 HROC277 ft2 M1**

Die Tumorzellen von HROC277 ft2 M1 bildeten zunächst adhärente Kolonien in den Kavitäten der Mikrotiterplatten aus. Zum Zeitpunkt des Versuchsendes betrug die Dauer der Kultivierung lediglich 16 Tage. Es erfolgte die Übergabe der Mikrotiterplatten an die Arbeitsgruppe der M.O.I. Die Größe der Kolonien blieb bis dahin vergleichsweise konstant und unterschied sich in von Well zu Well nicht merklich.

#### **4.2.23 HROC277Met2 ft0 M1**

Nach der Inkulturnahme von HROC277Met2 ft0 M1 zeigte sich in sämtlichen Wells eine stetige Proliferation von adhärennten Tumorzellen. Die Wachstumsfläche war nach kürzester Zeit weitgehend lückenlos/fast vollständig von den kultivierten Zellen bedeckt. Dementsprechend stieg auch der Verbrauch an Nährmedium. Aus diesen Gründen erfolgte bereits an Kulturtag 14 die Subkultivierung der Zellen zweier Kontroll-Wells. Diese wurden in je eine kleine Zellkulturflasche mit 25 cm<sup>2</sup> Wachstumsoberfläche ausgesät. Auch im Anschluss war ein stetiges Wachstum der kultivierten Tumorzellen ersichtlich. An Kulturtag 27 erfolgten die Überführung in eine mittlere Zellkulturflasche und die Erhöhung der Passagezahl auf zwei. Am letzten Tag des Experiments, und damit nach 42 Tagen in der Zellkultur, sahen die Zellkulturflaschen so vielversprechend aus, dass Backups erstellt und die Mikrotiterplatten entsorgt wurden. Letztlich war die Etablierung der Zelllinie von HROC277Met2 ft0 M1 erfolgreich.

#### **4.2.24 HROC288 T2 M3**

Nach der Inkulturnahme von HROC288 T2 M3 zeigten sich ein stetiges Wachstum adhärenter Tumorzellen und die Bildung adhärenter Kolonien in allen Mikrotiterplatten. Erst an Kulturtag 14 ließen sich geringe Unterschiede in Koloniedichte und -größe zwischen den einzelnen Wells erkennen. Die Kavitäten mit den Feeder-Zellen von HROC257 T0 M1, HROC277 T0 M1, HROC112Met T0 M2 und HHC6548 sahen etwas erfolgversprechender aus als ihre jeweiligen Pendants mit den konditionierten Medien. Auch die Kontroll-Wells sowie die Kavität mit Y-27632 + HEK 293 wiesen eine hohe Dichte der adhärennten Tumorzellen auf. Zum Zeitpunkt des Versuchsendes betrug die Dauer der Kultivierung von HROC288 T2 M3 lediglich 29 Tage. Es erfolgte die Übergabe der Mikrotiterplatten an die

Arbeitsgruppe der M.O.I. Der Einfachheit halber wurden anschließend allein die Zellen aus den Kontroll-Wells weiterkultiviert. Vom Restbestand wurden mittels Kryokonservierung Backups hergestellt. Nach mehrmaligem Passagieren gelang es im Nachgang dieser experimentellen Arbeit, nachträglich eine permanente Zelllinie von HROC288 T2 M3 zu erhalten.

#### **4.2.25 HROC300 ft1 M1**

Die 2D-Kultur von HROC300 ft1 M1 wies zu Anfang vereinzelte adhärente Tumorzellkolonien auf. Es war im Verlauf keine messbare Proliferation zu verzeichnen und die Zellen starben rasch ab. Die Kavitäten wurden eliminiert, sobald mikroskopisch keine vitalen Tumorzellen mehr nachweisbar waren. An Kulturtag 8 wurden daraufhin sämtliche Wells, abgesehen von der Kavität mit Y-27632 + CTX+ HEK293, dem Well mit den Feeder-Zellen von HROC112Met T0 M2 und den Kontroll-Wells, entsorgt. Zu diesem Zeitpunkt ließ sich nicht mit abschließender Sicherheit sagen, ob in dem Well mit den HROC112Met T0 M2 Feeder-Zellen noch vitale Tumorzellen von HROC300 ft1 M1 vorhanden waren. Aus diesem Grund wurden die Zellen dieser Kavität zunächst weiterkultiviert. Fortan erfolgte der Wechsel des Nährmediums jedoch ohne die erneute Zugabe von Feeder- Zellen zu besagtem Well, um ihre Anzahl zu reduzieren. Zuletzt wurden an Kulturtag 21 alle restlichen Kulturansätze eliminiert.

Von HROC300 ft1 M1 konnte später aus einem anderen Xenotransplantat eine permanente Zelllinie etabliert werden.

#### **4.2.26 HROC300Met1 T2 M1**

Aufgrund der geringen Tumormasse wurde beim Anlegen der 2D-Kultur nur eine einzelne Mikrotiterplatte verwendet. Bei diesem reduzierten Versuchsansatz wurden zwei Kavitäten als Kontroll-Wells genutzt und je einem anderen Well wurden Y-27632 + CTX, Y-27632 + CTX + HEK293, das konditionierte Medium von HROC257 T0 M1 sowie HROC257 T0 M1-Feeder-Zellen zugegeben. Über die Dauer der Kultivierung nahm die Zellzahl konsequent ab. Aufgrund des fehlenden Nachweises vitaler Tumorzellen wurden an Kulturtag 33 alle Kontroll-Wells und die Kavität mit Y-27632 + CTX eliminiert. Die restlichen Wells wurden nach 53 Tagen Kultivierung entsorgt.

Von HROC300 ft1 M1 konnte später aus einem anderen Xenotransplantat eine permanente Zelllinie etabliert werden.

#### **4.2.27 HROC347**

Aufgrund zu geringer Tumormasse wurde beim Anlegen der 2D-Kultur von HROC347 nur eine einzelne Mikrotiterplatte verwendet. Bei diesem reduzierten Versuchsansatz wurden zwei Kavitäten als Kontroll-Wells genutzt und je einem anderen Well wurden Y-27632 + CTX, Y-27632 + CTX+ HEK293, das konditionierte Medium von HROC257 T0 M1 sowie HROC257 T0 M1-Feeder-Zellen zugegeben. Darauffolgend wurde mikroskopisch eine Größenregredienz der Kolonien registriert. An Kulturtag 14 wurden zunächst die beiden Kontroll-Wells sowie das Well mit Y-27632 + CTX entsorgt. Auch in den verbliebenden Wells waren nach 24 Tagen keine lebenden Tumorzellen mehr vorhanden, weshalb diese ebenfalls eliminiert wurden.

#### **4.2.28 HROC348**

Nach der Inkulturnahme von HROC348 waren mikroskopisch vereinzelte adhärente Tumorzellkolonien in den Schächten der Mikrotiterplatten zu erkennen, allerdings war keinerlei Proliferation dieser Kolonien zu verzeichnen und die Zellen starben rasch ab. An Kulturtag 8 wurden zunächst alle Kontroll-Wells eliminiert, da sich mikroskopisch keine vitalen Tumorzellen mehr nachweisen ließen. Zu diesem Zeitpunkt konnte nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden, ob in den Wells mit den Feeder-Zellen noch lebende Tumorzellen von HROC348 existierten. Deshalb erfolgte fortan keine erneute Zugabe von Feeder-Zellen zu den entsprechenden Kavitäten. Aufgrund der Unfähigkeit zur Proliferation nahm ihre Anzahl über die weitere Dauer der Kultivierung stetig ab. Nach insgesamt 11 Tagen in Kultur wurden schließlich das Well mit Y-27632, die Kavität mit dem CTX sowie die Wells mit den HROC24 T1 M1-Feeder-Zellen, dem konditionierten Medium von HROC324 und den HROC324 Feeder-Zellen entsorgt. Zuletzt wurden an Kulturtag 30 das Well mit den HROC257 T0 M1-Feeder-Zellen und die Kavität mit Y-27632 + HEK293 eliminiert, nachdem die restlichen Kulturansätze bereits an Tag 18 entsorgt worden waren. Grund für die Eliminierung der Wells war stets das Fehlen vitaler Tumorzellen.

Allerdings war es der Arbeitsgruppe der M.O.I bereits im Vorfeld gelungen, eine Zelllinie von HROC348 zu etablieren.

#### 4.2.29 HROC348Met1

Bei HROC348Met1 zeichneten sich zunächst keine großen Unterschiede in Koloniedichte und -größe ab. An Kulturtag 18 sahen lediglich die Wells mit den konditionierten Medien vielversprechender aus als ihre jeweiligen Pendants mit den Feeder-Zellen. Die geringsten Aussichten auf eine erfolgreiche Etablierung bestanden wiederum bei den Tumorzellen, welchen lediglich das CTX beigelegt wurde.

An Kulturtag 32 sah die Kavität, welche mit dem konditionierten Medium von HROC257 angelegt wurde, hinsichtlich der Größe der gebildeten Kolonien erfolgversprechend/zielführend aus. Dagegen wurde das Well mit HROC348Met1 und dem CTX an Kulturtag 67 aufgrund fehlenden Nachweises vitaler Tumorzellen entsorgt. Drei Tage später waren schließlich in der Kavität mit Y-27632 nur noch vereinzelte adhärente Kolonien nachweisbar. Bis zu diesem Zeitpunkt hatte sich auch die Anzahl der Kolonien im Well mit dem konditionierten Medium von HROC24 auf eins reduziert. Die einzelne Tumorkolonie wurde durch abnehmende Zellzahl stetig kleiner, was zur Elimination der Kavität an Kulturtag 96 führte. Da die Anzahl der vitalen Tumorzellen in dem Well mit HROC348Met1 und dem ROCK-Inhibitor Y-27632 an Kulturtag 133 gegen null ging, wurde es ebenfalls entsorgt. Am letzten Tag des Versuches, nach einer Überlebensdauer von 147 Tagen, wiesen die übrigen Wells eine vergleichbar ähnliche Koloniedichte und -größe auf. Aus diesem Grund wurde beschlossen, drei Kontroll-Wells zu poolen und in eine kleine Zellkulturflasche zu passagieren.

Die Zellen aus den übrigen Kavitäten der Mikrotiterplatten wurden kryokonserviert. Letztlich ist es dem Team der M.O.I gelungen, eine permanente Zelllinie von HROC348Met1 aus der weitergeführten Kultur zu generieren.

### 4.2.30 HROC349

Nach dem Anlegen der 2D-Kultur bildeten die HROC349-Tumorzellen adhärente Kolonien aus. Allerdings war keinerlei messbare Proliferation zu verzeichnen und die Zellen starben rasch ab (Vergleich Abbildung 13 und Abbildung 14).

Abbildung 13: HROC349 + kond Medium HROC324 (Kulturtag 12)

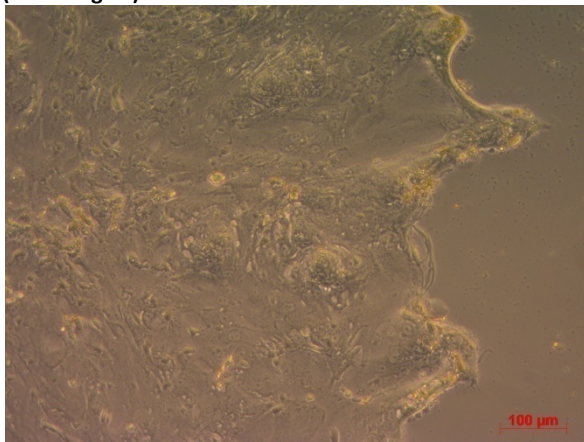
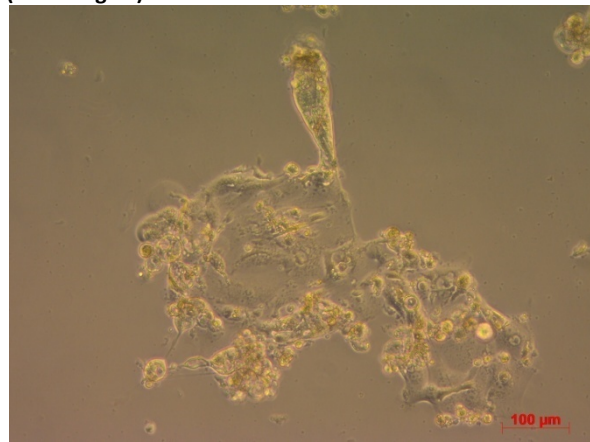


Abbildung 14: HROC349 + kond Medium HROC324 (Kulturtag 19)

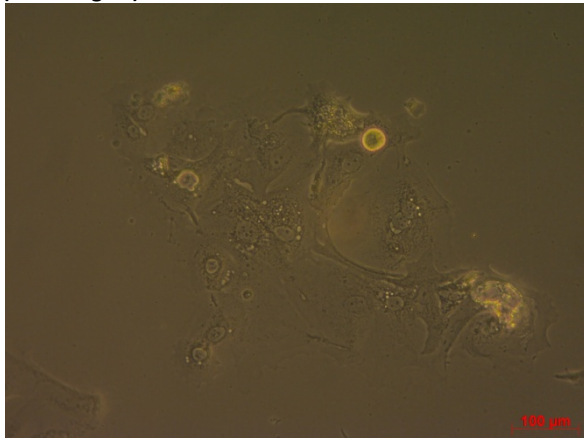


Sobald mikroskopisch keine vitalen Tumorzellen mehr nachweisbar gewesen waren, wurde die entsprechende Kavität eliminiert. Dies war an Kulturtag 18 bei den beiden Wells mit CTX und CTX + HEK293 sowie fünf Kontroll-Wells der Fall. Am 29. Tag der Kultivierung wurde Folgendes entfernt: Y-27632, Y-27632 + CTX + HEK293, die konditionierten Medien und das letzte Kontroll-Well. Es folgten an Tag 47 der Kultivierung das Well mit Y-27632 + HEK293 und jenes mit den HROC24 Feeder-Zellen. In der Kavität mit Y-27632 + HEK293 war eine Proliferation von Fibroblasten zu verzeichnen. Diese wurde schließlich zusammen mit den Kulturansätzen, welche die konditionierten Feeder-Zellen von HROC324 bzw. HROC257 beinhalteten, an Kulturtag 67 entsorgt.

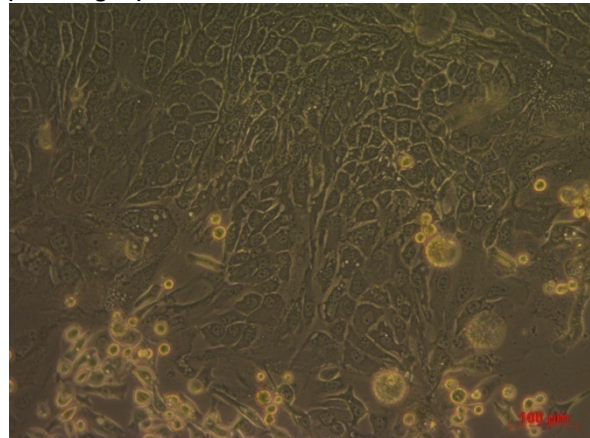
### 4.2.31 HROC352

Nach dem Anlegen der Primärkultur bildeten die HROC352-Tumorzellen adhärente Kolonien in den Kavitäten der Mikrotiterplatten aus. Bereits an Kulturtag 15 ließen sich Unterschiede in Koloniedichte und -größe zwischen den einzelnen Wells erkennen. Die Wells mit den Feeder-Zellen von HROC257 T0 M1, HROC324 und HROC24 T1 M1 sahen erfolgversprechender aus, als ihre jeweiligen Pendants mit den konditionierten Medien. Dies lässt sich anhand der Abbildung 15 und der Abbildung 16 verdeutlichen.

**Abbildung 15: HROC352 + kond Medium HROC24 T1 M1 (Kulturtag 15)**



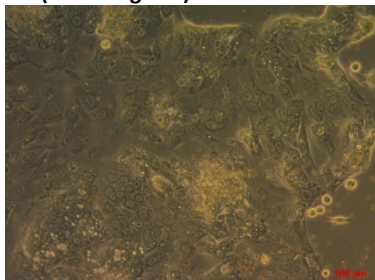
**Abbildung 16: HROC352 + HROC24 T1 M1 (Kulturtag 15)**



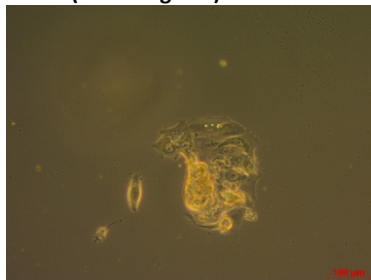
Die beiden Kavitäten mit den konditionierten Medien von HROC24 T1 M1 und HROC324 waren zudem die ersten Wells, die an Kulturtag 46 aufgrund des fehlenden Nachweises vitaler Tumorzellen eliminiert wurden. Im Gegensatz dazu wies das Well, welchem Y-27632 + HEK293 zugegeben wurde, eine große Koloniedichte auf, sodass die Zellen dieser Kavität nach insgesamt 48 Tagen der Kultivierung in eine kleine Zellkulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 25 cm<sup>2</sup> passagiert werden konnten. An Kulturtag 98 war auch im Well mit dem konditionierten Medium von HROC257 T0 M1 keine lebende Tumorzelle mehr existent, weshalb dieses eliminiert wurde. Aus demselben Grund wurden an Tag 102 bzw. 112 die beiden Kavitäten mit CTX+ HEK293 und Y-27632 + CTX entsorgt. Am letzten Tag der Dokumentation und des Versuches, dem 126. Tag der Kultivierung, wurden die übrigen Wells und die Zellkulturflasche an die Arbeitsgruppe der M.O.I übergeben. Zu diesem Zeitpunkt beinhalteten die beiden Wells mit dem CTX und den HROC257 T0 M1 Feeder-Zellen nur noch je eine einzelne kleine Tumorzellkolonie. In den anderen verbliebenen Kavitäten war die Koloniegröße höher.

Eine permanente Zelllinie konnte letztlich nicht etabliert werden.

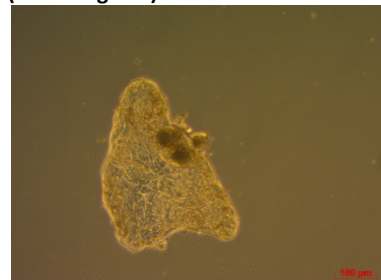
**Abbildung 17: HROC352 + HROC24 T1 M1 (Kulturtag 126)**



**Abbildung 18: HROC352 + HROC257 T0 M1 (Kulturtag 126)**



**Abbildung 19: HROC352 + CTX (Kulturtag 126)**



#### **4.2.32 HROC355Met1**

Die Tumorzellen der Primärkultur von HROC355Met1 bildeten zunächst einzelne adhärente Zellverbände aus. Allerdings war keinerlei messbare Proliferation zu registrieren und die Zellen starben konsequent ab. Nach 18 Tagen in Kultur waren mikroskopisch keine vitalen Tumorzellen mehr zu detektieren, weshalb alle Mikrotiterplatten entsorgt wurden.

#### **4.3 Erfolgsquote**

Von den 32 untersuchten Tumorgeweben konnten insgesamt vier Zelllinien etabliert werden, was einer Erfolgsrate von 12,5 % entspricht. Explizit handelt es sich dabei um HROC50 ft1 M5, HROC277Met2 ft0 M1, HROC288 T2 M3 und HROC348Met1. Von den 32 untersuchten Tumorgeweben stammten sechs direkt von Patientenproben (patient derived) ab und wurden in Kultur gebracht. Davon konnte genau eine (primäre) permanente Zelllinie etabliert werden (HROC348Met1). Dies entspricht einer Erfolgsrate von 16,67 %.

Die restlichen 26 Proben stammten aus immundefizienten Mäusen (PDX-Modell). Hiervon konnten die übrigen drei (sekundären) Zelllinien etabliert werden. Die Erfolgsquote liegt folglich bei 11,5 %.

## 4.4 Statistik

### 4.4.1 Übersichtstabellen




Tabelle 7: Lebensdauer in Zellkultur

|                    | Überlebensdauer in Tagen |                  |       |              |               |                        |           |
|--------------------|--------------------------|------------------|-------|--------------|---------------|------------------------|-----------|
|                    | Y-27632                  | Y-27632 + HEK293 | CTX   | CTX + HEK293 | Y-27632 + CTX | Y-27632 + CTX + HEK293 | Kontrolle |
| HROC29 ft1 M2      | 27                       | 38               | 21    | 27           | 27            | 151                    | 38        |
| HROC48Met1 ft1 M2  | 26                       | 26               | 26    | 26           | 26            | 26                     | 26        |
| HROC50 ft1 M4      | 25                       | 33               | 25    | 33           | 25            | 33                     | 33        |
| HROC50 ft1 M5      | 111                      | 113              | 62    | 62           | 62            | 113                    | 113       |
| HROC68 T2 M1       | 51                       | 51               | 51    | 51           | 51            | 51                     | 41        |
| HROC68 T2 M2       | 33                       | 33               | 33    | 33           | 33            | 33                     | 43        |
| HROC71 ft1 M7      | 153                      | 153              | 53    | 101          | 153           | 153                    | 101       |
| HROC113 ft1 M1     | 26                       | 26               | 26    | 26           | 26            | 26                     | 26        |
| HROC117 ft1 M3     | 6                        | 26               | 6     | 26           | 6             | 26                     | 6         |
| HROC123 ft1 M4     | 6                        | 26               | 6     | 26           | 6             | 26                     | 6         |
| HROC130 ft1 M1     | 50                       | 23               |       |              | 50            | 23                     | 23        |
| HROC135 ft1 M2     | 13                       | 13               | 13    | 13           | 13            | 13                     | 13        |
| HROC143 ft1 M2     | 50                       | 50               | 50    | 50           | 50            | 50                     | 64        |
| HROC169 ft1 M2     | 35                       | 35               | 35    | 35           | 35            | 35                     | 53        |
| HROC170 ft1 M1     | 13                       | 13               | 13    | 13           | 13            | 13                     | 13        |
| HROC190 T1 M2      | 48                       | 61               | 48    | 48           | 61            | 61                     | 47        |
| HROC203 T1 M1      | 40                       | 40               |       |              | 40            | 40                     | 64        |
| HROC204 ft2 M1     | 1                        | 1                | 1     | 1            | 1             | 1                      | 1         |
| HROC248 ft1 M1     | 33                       | 33               | 33    | 33           | 33            | 33                     | 33        |
| HROC250 T2 M1      | 13                       | 13               |       |              | 13            | 13                     | 13        |
| HROC253Met1 ft0 M3 | 29                       | 29               |       |              | 29            | 27                     | 29        |
| HROC277 ft2 M1     | 16                       | 16               |       |              | 16            | 16                     | 16        |
| HROC277Met2 ft0 M1 | 42                       | 42               | 42    | 42           | 42            | 42                     | 42        |
| HROC288 T2 M3      | 29                       | 29               |       |              | 29            | 29                     | 29        |
| HROC300 ft1 M1     | 8                        | 8                | 8     | 8            | 8             | 21                     | 21        |
| HROC300Met1 T2 M1  |                          |                  |       |              | 33            | 53                     | 33        |
| HROC347            |                          |                  |       |              | 14            | 24                     | 14        |
| HROC348Met1        | 133                      | 147              | 67    | 147          | 147           | 147                    | 147       |
| HROC348            | 11                       | 30               | 11    | 18           | 18            | 18                     | 8         |
| HROC349            | 29                       | 47               | 18    | 18           | 67            | 29                     | 29        |
| HROC352            | 126                      | 126              | 126   | 112          | 102           | 126                    | 126       |
| HROC355Met1        | 18                       | 18               | 18    | 18           | 18            | 18                     | 18        |
| Mittelwert         | 40,03                    | 43,30            | 22    | 40,29        | 38,97         | 45,94                  | 39,66     |
| Standardabweichung | 39,16                    | 39,27            | 27,28 | 34,71        | 36,13         | 42,69                  | 35,75     |
| Median             | 29,0                     | 31,5             | 26,0  | 30,0         | 29,0          | 29,0                   | 29,0      |

|                    | Überlebensdauer in Tagen           |                           |                                     |                            |                            |                   |
|--------------------|------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------|
|                    | Kond.<br>Medium<br>HROC24<br>T1 M1 | Feeder<br>HROC24<br>T1 M1 | Kond.<br>Medium<br>HROC257<br>T0 M1 | Feeder<br>HROC257<br>T0 M1 | Kond.<br>Medium<br>HROC324 | Feeder<br>HROC324 |
| HROC29 ft1 M2      | 12                                 | 17                        | 17                                  | 12                         | 17                         | 17                |
| HROC48Met1 ft1 M2  | 26                                 | 26                        | 26                                  | 26                         | 26                         | 26                |
| HROC50 ft1 M4      | 25                                 | 54                        | 25                                  | 25                         | 25                         | 54                |
| HROC50 ft1 M5      | 113                                | 113                       | 113                                 | 61                         | 113                        | 113               |
| HROC68 T2 M1       | 55                                 | 55                        | 55                                  | 55                         | 55                         | 55                |
| HROC71 ft1 M7      | 53                                 | 153                       | 153                                 | 125                        | 101                        | 119               |
| HROC113 ft1 M1     | 26                                 | 26                        | 26                                  | 26                         | 26                         | 26                |
| HROC117 ft1 M3     | 6                                  | 26                        | 6                                   | 26                         | 6                          | 26                |
| HROC123 ft1 M4     | 6                                  | 26                        | 26                                  | 26                         | 6                          | 26                |
| HROC130 ft1 M1     |                                    |                           | 23                                  | 23                         |                            |                   |
| HROC135 ft1 M2     | 13                                 | 13                        | 13                                  | 13                         | 13                         | 13                |
| HROC169 ft1 M2     | 45                                 | 73                        | 45                                  | 73                         | 73                         | 73                |
| HROC170 ft1 M1     | 13                                 | 33                        | 13                                  | 33                         | 13                         | 33                |
| HROC190 T1 M2      | 47                                 | 71                        | 47                                  | 71                         | 47                         | 71                |
| HROC203 T1 M1      |                                    |                           | 50                                  | 50                         |                            |                   |
| HROC204 ft2 M1     | 1                                  | 1                         | 1                                   | 1                          | 1                          | 1                 |
| HROC248 ft1 M1     | 43                                 | 43                        | 43                                  | 43                         | 43                         | 43                |
| HROC250 T2 M1      |                                    |                           | 13                                  | 13                         |                            |                   |
| HROC253Met1 ft0 M3 |                                    |                           | 27                                  | 27                         |                            |                   |
| HROC277 ft2 M1     |                                    |                           | 16                                  | 16                         |                            |                   |
| HROC277Met2 ft0 M1 |                                    |                           | 42                                  | 42                         |                            |                   |
| HROC288 T2 M3      |                                    |                           | 29                                  | 29                         |                            |                   |
| HROC300Met1 T2 M1  |                                    |                           | 53                                  | 53                         |                            |                   |
| HROC347            |                                    |                           | 24                                  | 24                         |                            |                   |
| HROC348Met1        | 96                                 | 147                       | 147                                 | 147                        | 147                        | 147               |
| HROC348            | 18                                 | 11                        | 18                                  | 30                         | 11                         | 11                |
| HROC349            | 29                                 | 47                        | 29                                  | 67                         | 29                         | 67                |
| HROC352            | 46                                 | 126                       | 98                                  | 126                        | 46                         | 126               |
| HROC355Met1        | 18                                 | 18                        | 18                                  | 18                         | 18                         | 18                |
| Mittelwert         | 34,55                              | 53,95                     | 41,24                               | 44,17                      | 40,80                      | 53,25             |
| Standardabweichung | 29,17                              | 46,18                     | 38,80                               | 35,91                      | 39,59                      | 42,95             |
| Median             | 26,0                               | 38,0                      | 26,0                                | 29,0                       | 26,0                       | 38,0              |

|                       | Überlebensdauer in Tagen            |                             |   |                                |                                     |                            |
|-----------------------|-------------------------------------|-----------------------------|---|--------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
|                       | Kond.<br>Medium<br>HROC277<br>T0 M1 | Feeder<br>HROC27<br>7 T0 M1 | Kond.<br>Medium<br>HROC112<br>Met T0 M2 | Feeder<br>HROC112<br>Met T0 M2 | Kond.<br>Medium<br>HHC6548<br>T1 M1 | Feeder<br>HHC6548<br>T1 M1 |
| HROC68 T2 M2          | 43                                  | 43                          | 43                                      | 43                             | 43                                  | 43                         |
| HROC130 ft1 M1        | 48                                  | 23                          | 48                                      | 23                             | 48                                  | 23                         |
| HROC143 ft1 M2        | 62                                  | 50                          | 50                                      | 50                             | 62                                  | 50                         |
| HROC203 T1 M1         | 50                                  | 50                          | 50                                      | 50                             |                                     |                            |
| HROC250 T2 M1         | 13                                  | 36                          | 13                                      | 36                             | 13                                  | 36                         |
| HROC253Met1 ft0<br>M3 | 27                                  | 29                          | 29                                      | 29                             | 29                                  | 29                         |
| HROC277 ft2 M1        | 16                                  | 16                          | 16                                      | 16                             | 16                                  | 16                         |
| HROC277Met2 ft0<br>M1 |                                     |                             | 42                                      | 42                             | 42                                  | 42                         |
| HROC288 T2 M3         | 29                                  | 29                          | 29                                      | 29                             | 29                                  | 29                         |
| HROC300 ft1 M1        | 8                                   | 8                           | 8                                       | 21                             | 8                                   | 8                          |
| Mittelwert            | 32,89                               | 31,56                       | 32,80                                   | 33,90                          | 32,22                               | 30,67                      |
| Standardabweichung    | 18,78                               | 14,64                       | 16,09                                   | 12,13                          | 17,98                               | 13,58                      |
| Median                | 29,0                                | 29,0                        | 35,5                                    | 32,5                           | 29,0                                | 29,0                       |

### Legende:

|   |  |
|---|--|
|  | - kontaminiert   |
|  | - am letzten Tag des Versuches noch in Kultur befindlich |
|  | - etabliert  |

Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n x_i$$

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \times \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

x - Einzelwert

n - Anzahl der Werte

$\bar{x}$  - Mittelwert

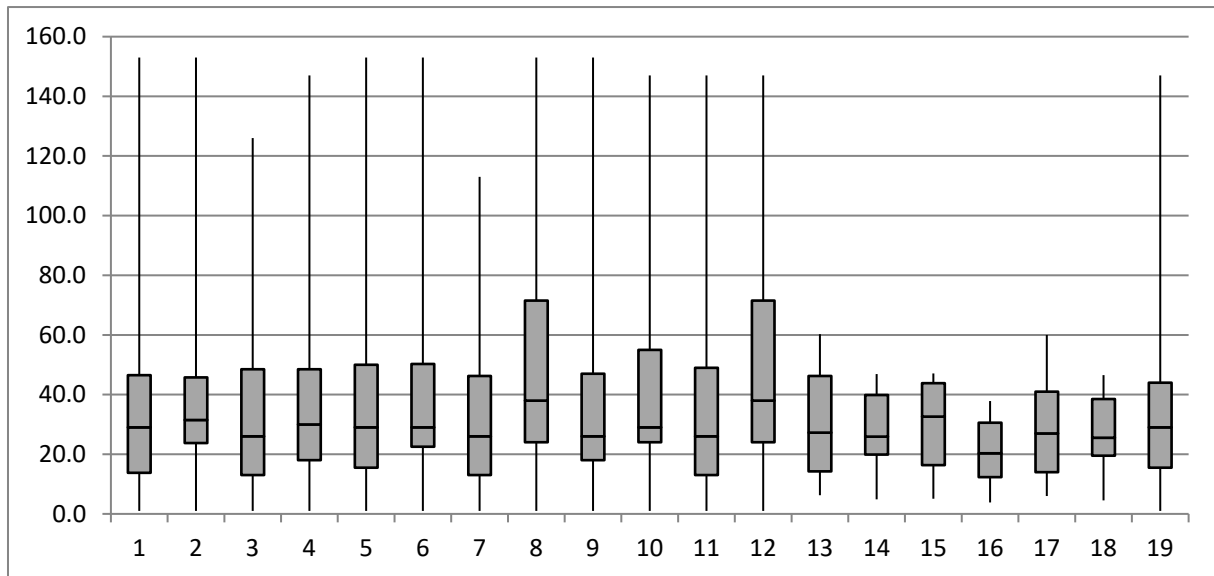
s - Standardabweichung

### 4.4.2 Boxplot

Zur besseren Übersicht wurde ein Boxplot erstellt. Innerhalb der Box liegen die mittleren 50 % der Daten. Der Median ist als horizontaler Strich innerhalb der Box eingezeichnet. Die

Linien, welche sich vertikal von den Kästen erstrecken, werden als Whisker bezeichnet. Sie reichen bis zum größten bzw. kleinsten Wert aus den Daten. Box inklusive Whisker entspricht der gesamten Spannweite der Daten. Als Maximalwert ist der Tag der Eliminierung, der Tag der Etablierung bzw. der letzte Tag der Dokumentation definiert.

**Abbildung 20: Boxplot**



**Legende:**

- Box (mittlere 50 % der Daten)
- Min-Max

**y-Achse:** Überlebensdauer in Tagen

**x-Achse:**

- |  |  |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>1 Y-27632</li> <li>2 Y-27632 + HEK293</li> <li>3 CTX</li> <li>4 CTX+ HEK293</li> <li>5 Y-27632 + CTX</li> <li>6 Y-27632 + CTX+ HEK293</li> <li>7 Kond. Medium HROC24 T1 M1</li> <li>8 HROC24 T1 M1</li> <li>9 Kond. Medium HROC257 T0 M1</li> <li>10 HROC257 T0 M1</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>11 Kond. Medium HROC324</li> <li>12 HROC324</li> <li>13 Kond. Medium HROC277 T0 M1</li> <li>14 HROC277 T0 M1</li> <li>15 Kond. Medium HROC112Met T0 M2</li> <li>16 HROC112Met T0 M2</li> <li>17 Kond. Medium HHC6548 T1 M1</li> <li>18 HHC6548 T1 M1</li> <li>19 Kontrolle</li> </ul> |
|--|--|

#### 4.4.3 Mann-Whitney-U-Test

Es stellt sich die Frage, ob sich die Überlebensdauer zwischen der Kontrollgruppe und den anderen Versuchsansätzen unterscheidet.

Der Mann-Whitney-U-Test prüft, ob die zentralen Tendenzen zweier unabhängiger Stichproben verschieden sind. Die Variablen müssen mindesten ordinalskaliert sein. Eine Normalverteilung der Daten ist nicht notwendig. Gruppe 1 ist die Kontrollgruppe. Der Gruppe 2 wurde Y-27632 + CTX + HEK293 zugegeben. Es handelt sich um unabhängige Stichproben. Der Zusatz von Y-27632 + CTX + HEK293 ist dabei die unabhängige Variable. In Tabelle 8 werden zunächst die Überlebensdauern in aufsteigender Reihenfolge sortiert (Spalte 2). Anschließend werden Ränge gebildet, mit den Messwerten selbst wird nicht gerechnet. Kommt ein Messwert mehrfach, werden verbundene Ränge gebildet. Dabei wird aus den entsprechenden Rängen der Mittelwert berechnet. Die absoluten Abstände zwischen den Werten werden folglich nicht berücksichtigt. Danach werden für die zwei Gruppen Rangsummen berechnet. Dafür werden separat die Ränge der jeweiligen Gruppe aufsummiert. Die Nullhypothese ( $H_0$ ) lautet: Die Kontrollgruppe unterscheidet sich in Bezug auf die Überlebensdauer nicht von den Primärkulturen, welchen Y-27632 + CTX + HEK293 Feederzellen zugeführt wurden.

**Tabelle 8: Mann-Whitney-U-Test (Kontrollgruppe vs. Y-27632 + CTX + HEK293)**

|                          | Überlebensdauer in Tagen | Gruppe | Ränge Gruppe 1 | Ränge Gruppe 2 |
|--------------------------|--------------------------|--------|----------------|----------------|
| Kontrolle HROC204 ft2 M1 | 1                        | 1      | 1,5            |                |
| * HROC204 ft2 M1         | 1                        | 2      |                | 1,5            |
| Kontrolle HROC117 ft1 M3 | 6                        | 1      | 3,5            |                |
| Kontrolle HROC123 ft1 M4 | 6                        | 1      | 3,5            |                |
| Kontrolle HROC348        | 8                        | 1      | 5              |                |
| Kontrolle HROC135 ft1 M2 | 13                       | 1      | 8,5            |                |
| Kontrolle HROC170 ft1 M1 | 13                       | 1      | 8,5            |                |
| Kontrolle HROC250 T2 M1  | 13                       | 1      | 8,5            |                |
| * HROC135 ft1 M2         | 13                       | 2      |                | 8,5            |
| * HROC170 ft1 M1         | 13                       | 2      |                | 8,5            |
| * HROC250 T2 M1          | 13                       | 2      |                | 8,5            |
| Kontrolle HROC347        | 14                       | 1      | 12             |                |
| Kontrolle HROC277 ft2 M1 | 16                       | 1      | 13,5           |                |
| * HROC277 ft2 M1         | 16                       | 2      |                | 13,5           |
| Kontrolle HROC355Met1    | 18                       | 1      | 16             |                |
| * HROC348                | 18                       | 2      |                | 16             |

|                              |     |   |      |      |
|------------------------------|-----|---|------|------|
| * HROC355Met1                | 18  | 2 |      | 16   |
| Kontrolle HROC300 ft1 M1     | 21  | 1 | 18,5 |      |
| * HROC300 ft1 M1             | 21  | 2 |      | 18,5 |
| Kontrolle HROC130 ft1 M1     | 23  | 1 | 20,5 |      |
| * HROC130 ft1 M1             | 23  | 2 |      | 20,5 |
| * HROC347                    | 24  | 2 |      | 22   |
| Kontrolle HROC48Met1 ft1 M2  | 26  | 1 | 25,5 |      |
| Kontrolle HROC113 ft1 M1     | 26  | 1 | 25,5 |      |
| * HROC48Met1 ft1 M2          | 26  | 2 |      | 25,5 |
| * HROC113 ft1 M1             | 26  | 2 |      | 25,5 |
| * HROC117 ft1 M3             | 26  | 2 |      | 25,5 |
| * HROC123 ft1 M4             | 26  | 2 |      | 25,5 |
| * HROC253Met1 ft0 M3         | 27  | 2 |      | 29   |
| Kontrolle HROC349            | 29  | 1 | 31,5 |      |
| Kontrolle HROC253Met1 ft0 M3 | 29  | 1 | 31,5 |      |
| * HROC288 T2 M3              | 29  | 2 |      | 31,5 |
| * HROC349                    | 29  | 2 |      | 31,5 |
| Kontrolle HROC50 ft1 M4      | 33  | 1 | 36,5 |      |
| Kontrolle HROC248 ft1 M1     | 33  | 1 | 36,5 |      |
| Kontrolle HROC300Met1 T2 M1  | 33  | 1 | 36,5 |      |
| * HROC50 ft1 M4              | 33  | 2 |      | 36,5 |
| * HROC68 T2 M2               | 33  | 2 |      | 36,5 |
| * HROC248 ft1 M1             | 33  | 2 |      | 36,5 |
| * HROC169 ft1 M2             | 35  | 2 |      | 40   |
| Kontrolle HROC29 ft1 M2      | 38  | 1 | 41   |      |
| * HROC203 T1 M1              | 40  | 2 |      | 42   |
| Kontrolle HROC68 T2 M1       | 41  | 1 | 43   |      |
| * HROC277Met2 ft0 M1         | 42  | 2 |      | 44   |
| Kontrolle HROC68 T2 M2       | 43  | 1 | 45   |      |
| Kontrolle HROC190 T1 M2      | 47  | 1 | 46   |      |
| * HROC143 ft1 M2             | 50  | 2 |      | 47   |
| * HROC68 T2 M1               | 51  | 2 |      | 48   |
| Kontrolle HROC169 ft1 M2     | 53  | 1 | 49,5 |      |
| * HROC300Met1 T2 M1          | 53  | 2 |      | 49,5 |
| * HROC190 T1 M2              | 61  | 2 |      | 51   |
| Kontrolle HROC143 ft1 M2     | 64  | 1 | 52,5 |      |
| Kontrolle HROC203 T1 M1      | 64  | 1 | 52,5 |      |
| Kontrolle HROC71 ft1 M7      | 101 | 1 | 54   |      |
| * HROC50 ft1 M5              | 113 | 2 |      | 55   |
| Kontrolle HROC352            | 126 | 1 | 56,5 |      |
| * HROC352                    | 126 | 2 |      | 56,5 |
| * HROC348Met1                | 147 | 2 |      | 58   |
| * HROC29 ft1 M2              | 151 | 2 |      | 59   |
| * HROC71 ft1 M7              | 153 | 2 |      | 60   |
| Kontrolle HROC50 ft1 M5      | ∞   | 1 | 62,5 |      |

|                              |   |   |      |      |
|------------------------------|---|---|------|------|
| Kontrolle HROC288 T2 M3      | ∞ | 1 | 62,5 |      |
| Kontrolle HROC277Met2 ft0 M1 | ∞ | 1 | 62,5 |      |
| Kontrolle HROC348Met1        | ∞ | 1 | 62,5 |      |
| Rangsumme                    |   |   | 1033 | 1047 |

\* Y-27632 + CTX + HEK293 (unabhängige Variable)

#### 4.4.3.1 Berechnung der Teststatistik

$$U = n1 * n2 + \frac{n1(n1 + 1)}{2} - R1$$

$$n1 = n2 = 32$$

R1 = 1047 (größere der beiden Rangsummen)

$$U = 32 * 32 + \frac{32(32 + 1)}{2} - 1047 = 505$$

Der Wert kann nun auf Signifikanz geprüft werden. Der kritischen Werte der Mann-Whitney-U-Statistik ( $\alpha = 5\%$ ) kann Tabellen entnommen werden. Er beträgt 365 für  $n1=n2=32$ . U ist mit 505 größer als dieser kritische Wert. Damit ist der Unterschied auf dem 5% - Niveau nicht statistisch signifikant. Die Nullhypothese wird nicht abgelehnt und die Alternativhypothese verworfen. Es gibt keine Unterschiede hinsichtlich der zentralen Tendenz der Überlebensdauer zwischen den beiden Gruppen. Analog zu Tabelle 8 wird nun der Unterschied zwischen Kontrollgruppe und den übrigen Versuchsansätze hinsichtlich der Überlebensdauer untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 aufgeführt.

**Tabelle 9: Mann-Whitney-U-Test (Kontrollgruppe vs. X); N1=32**

| X                        | N2 | U     | Kritische Werte von U ( $\alpha = 5\%$ ) | Ho beibehalten bei $\alpha = 5\%$ |
|--------------------------|----|-------|--|-----------------------------------|
| Y-27632                  | 30 | 441   | 340                                      | ja                                |
| Y-27632 + HEK293         | 30 | 477   | 340                                      | ja                                |
| CTX                      | 24 | 335,5 | 264                                      | ja                                |
| CTX + HEK293             | 24 | 376,5 | 264                                      | ja                                |
| Y-27632 + CTX            | 32 | 480   | 365                                      | ja                                |
| Y-27632 + CTX + HEK293   | 32 | 505   | 365                                      | ja                                |
| Medium HROC24 T1 M1      | 20 | 280   | 215                                      | ja                                |
| HROC24 T1 M1             | 20 | 287,5 | 215                                      | ja                                |
| Medium HROC257 T0 M1     | 29 | 532   | 327                                      | ja                                |
| HROC257 T0 M1            | 29 | 447   | 327                                      | ja                                |
| Medium HROC324           | 20 | 288,5 | 231                                      | ja                                |
| HROC324                  | 20 | 285   | 231                                      | ja                                |
| Medium HROC277 T0 M1     | 9  | 138   | 81                                       | ja                                |
| HROC277 T0 M1            | 9  | 140   | 81                                       | ja                                |
| Medium HROC112 Met T0 M2 | 10 | 159   | 93                                       | ja                                |

|                      |    |     |    |    |
|----------------------|----|-----|----|----|
| HROC112 Met T0 M2    | 10 | 152 | 93 | ja |
| Medium HHC6548 T1 M1 | 9  | 137 | 81 | ja |
| HHC6548 T1 M1        | 9  | 138 | 81 | ja |

#### 4.4.4 Interpretation

In Tabelle 9 ist ersichtlich, dass der U-Wert jeweils größer ist, als der entsprechende kritische Werte von U ( $\alpha = 5\%$ ). Folglich sind die Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und den einzelnen Versuchsansätzen auf dem 5 %-Niveau statistisch nicht signifikant. Damit wird jeweils  $H_0$  beibehalten und die entsprechende Alternativhypothese abgelehnt.

Die Mittelwerte der Überlebensdauern sind in der Übersichtstabelle aufgeführt. Das Problem ist die Anfälligkeit des Mittelwertes für Extremwerte. Etablierte Zelllinien teilen sich definitionsgemäß unendlich, was sich nicht mit Mittelwert und Standardabweichung wiedergeben lässt. Die hohen Standardabweichungen zeigen zudem eine große Streubreite der Daten um den Mittelwert.

Der Median (Zentralwert), der ebenfalls als Lagemaß für die Verteilung dient, wird von den Extremwerten nicht beeinflusst. In der Übersichtstabelle und im Boxplot ist auffällig, dass sich die Median-Werte ähneln. Allerdings weichen Median und arithmetisches Mittel voneinander ab (4.4.1 Übersichtstabellen), was für eine schiefe Verteilung spricht. Im Boxplot liegen die meisten Daten am unteren Rand der Grafik, was ebenfalls darauf verweist.

Das Datum der Etablierung lässt sich ebenfalls nicht mit 100%iger Sicherheit bestimmen, sondern beruht in erster Linie auf Beobachtungen und Erfahrung. Solche Abweichung wirken sich ebenfalls auf die Statistik aus.

## 5 Diskussion

### 5.1 Biobank

Zellkulturen finden in Forschung und Entwicklung breite Anwendung. Große Biobanken haben zahlreiche Vorteile. Sie ermöglichen den Zugriff auf einen großen Pool von Proben und den zugehörigen Daten. Klinische Informationen werden ebenfalls mit einbezogen. Daraus resultieren eine vorteilhafte Ressourcenaufteilung sowie eine große Ansammlung von Wissen [84]. Es werden unter anderem histologische Merkmale, molekulare Charakteristika und Ergebnisse von Genexpressionsanalysen erfasst [85].

Die Proben werden langfristig sowie sicher eingelagert und können ferner auf Nachfrage herausgegeben werden. So kommt es zu einem globalen Erkenntnisgewinn und -austausch. Eine gute Charakterisierung von Zelllinien ermöglicht es, passende Proben für spezielle

Fragstellungen auszuwählen. Im Folgenden werden einige wichtige Aspekte zu diesem Thema diskutiert.

## **5.2 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit**

### **5.2.1 Barrierefunktion von Epithelzellen**

Möglichst große Biobanken sind wichtig, um die Pharmakokinetik verschiedener Medikamente besser verstehen und vorhersagen zu können. Hier spielt vor allem die Bioverfügbarkeit eine entscheidende Rolle. An Zellverbänden mit einer entsprechend hohen Diffusionsbarriere kann die Absorption verschiedener oraler Chemotherapeutika untersucht werden.

Die Barrierefunktion von Epithelzellen lässt sich mit dem transepithelischen elektrischen Widerstand (TEER) quantifizieren [86]. Ein hoher TEER spricht dabei für geschlossene Zellverbände und eine gute Barrierefunktion. Der parazelluläre Transport für die Aufnahme von Ionen und Molekülen wird unwahrscheinlich. Sehr hohe TEER-Werte konnten bei HROC60 ermittelt werden [87]. Diese Zelllinie ist folglich exzellent für Untersuchungen zur Absorption von Xenobiotika via transzellulärem Transport geeignet.

### **5.2.2 Präsystemische Elimination**

Auch die Identifikation von Zelllinien, welche viele Enzyme für die präsystemische Elimination von Arzneimittel besitzen, ist von Interesse. Bei CRCs spielt unter anderem die Überexpression von CYP3A4 bei der Inaktivierung verschiedener Zytostatika eine Rolle. Cytochrome P450 können so die Bioverfügbarkeit verringern und sind für ein unzureichendes Therapieansprechen mitverantwortlich (z. B. bei Irinotecan) [88,89]. Des Weiteren gibt es eine Vielzahl von Cytochrom-P450-assoziierten Arzneimittelinteraktionen. Rifampicin oder beispielsweise Antikonvulsiva können CYP3A4 induzieren und somit die Wirkung von Xenobiotika abschwächen.

Alternative Therapieregime können mithilfe von Zelllinien, welche eine hohe Expression an CYP3A4 aufweisen, ermittelt werden. Hier konnte unter anderem HROC32 identifiziert werden [87]. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit großer Biobanken, um geeignete Zelllinien für die zu untersuchende Fragestellung auszuwählen.

Eine Beurteilung der Bioverfügbarkeit ist auch für die personalisierte Medizin wesentlich, um individuelle Therapieregime entwickeln zu können und das Nebenwirkungsprofil zu verbessern.

### **5.3 Vergleich Primärtumor und korrespondierende Metastase**

Viele Patienten mit einem CRC benötigen eine Chemotherapie. In fortgeschrittenen Tumorstadien oder bei Metastasen kommen dabei häufig Kombinationstherapien zur Anwendung. Um das Therapieansprechen zu verbessern, wird unter anderem 5-FU zusammen mit Oxaliplatin und Irinotecan eingesetzt. Die Dreifachtherapie kann die Ansprechrate auf 70 % [90,91] erhöhen. Im Umkehrschluss gibt es trotzdem eine beträchtliche Anzahl von Patienten, die von dieser Kombinationstherapie nicht profitieren. Folglich wäre es sehr bedeutsam, wenn man durch Untersuchungen am Primärtumor die Empfindlichkeit von korrespondierenden Metastasen gegenüber Chemotherapeutika voraussagen könnte. Für solche Analysen sind ebenfalls große Biobanken notwendig. Ergebnisse einer wissenschaftlichen Untersuchung, die primäre CRCs sowie entsprechende Lebermetastasen verglich, konnte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Kopienzahlvariation (CNV) oder Mutationen, die zur Deregulierung von Signalwegen führen, finden [92]. Vergleiche hinsichtlich der Chemosensitivität von Primarius und Filia/Filiae wurden in anderen Studien ebenfalls durchgeführt. Hier konnten teils Unterschiede hinsichtlich der mittleren inhibitorischen Konzentration von 5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin festgestellt werden; und es wurde partiell eine geringere Sensitivität der Metastasen gegenüber Irinotecan beobachtet [93]. Allerdings waren alle untersuchten Proben sensitiv gegenüber diesen drei Chemotherapeutika und zeigten keine intrinsische Zytostatikaresistenz [93]. Es wurde geschlussfolgert, dass durch Analysen am Primärtumor eines CRC vielversprechende Behandlungsoptionen für zukünftige Metastasen identifiziert werden können. Neben den Untersuchungen an 2D-Zellkulturmodellen lieferten auch Studien an PDOs vielversprechende Ergebnisse. Eine Korrelation zwischen der Chemosensitivität von PDOs und dem Ansprechen des Patienten auf die Chemotherapie wurde aufgezeigt [94,95].

### **5.4 In vivo vs. in vitro**

Ergänzend dazu können mithilfe von PDX-Modellen In-vivo-Studien durchgeführt werden. Hier können die Forschungsergebnisse, die unter Laborbedingungen in vitro erzielt wurden, unter den komplexeren Bedingungen im lebenden Organismus überprüft werden. Diese PDX-Modelle sollten entsprechend in niedriger Passage und gut charakterisiert sein.

Es konnte gezeigt werden, dass CRC-PDX-Tumoren bis zu 14 Passagen die intratumorale Heterogenität, die Chromosomeninstabilität und die Histologie des Ausgangstumors beibehalten [96,97]. Insbesondere für die späten präklinischen Tests neuartiger Therapeutika wird eine hohe Anzahl gut definierter PDX-Modelle benötigt [85].

Im Idealfall stehen zu Forschungszwecken somit Tumorproben, permanente Zelllinien, ein korrespondierendes PDX-Modell und dazugehörige umfangreiche Patientendaten zur Verfügung.

## **5.5 Etablierung der Zelllinien**

Die Etablierung einer Zelllinie kolorektaler Tumorzellen gestaltet sich mitunter schwierig. Tumore derselben Entität unterscheiden sich oft bezüglich ihrer genetischen Veränderungen und hinsichtlich ihrer zellulären Zusammensetzung. Von Bedeutung ist der Anteil an Tumor-, Stroma-, Endothel- und Immunzellen innerhalb des Tumorgewebes. Fibroblasten besitzen eine hohe Proliferationsrate und sind vergleichsweise einfach zu kultivieren. Ein hoher Anteil von Fibroblasten sowie Kulturbedingungen, welche deren Wachstum begünstigen, bergen die Gefahr, dass diese Zellen die Primärkultur überwuchern.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit fetalem Kälberserum (FCS) wird erfolgreich genutzt, um Fibroblasten zu kultivieren [98]. In einer Studie von Ejiri et al. zeigte sich ein rasches Absterben der Fibroblasten in serumfreien DMEM. Bereits nach sieben Tagen der Kultivierung war eine deutliche Reduktion der Zellzahl zu verzeichnen; und nach 21 Tagen war der Großteil der Fibroblasten abgestorben [99]. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Erfahrungen und Untersuchungen der Arbeitsgruppe der M.O.I.

Aus diesem Grund wurde zunächst serumfreies Medium (0 % FCS) zum Anlegen der Primärkulturen verwendet (siehe Material und Methoden). Dennoch ließ sich nicht in allen Fällen die Proliferation von Fibroblasten erfolgreich verhindern. Dies war insbesondere bei HROC71 ft1 M7 ein Problem. Die Überwucherung mit Fibroblasten beeinträchtigte die ungestörte Proliferation der Tumorzellen, erschwerte die Kulturbedingungen und behinderte somit die mögliche Etablierung einer Zelllinie.

Hier stellt sich zusätzlich die Frage, welchen Einfluss das Fehlen von Serum auf die Proliferation der Tumorzellkulturen hat. FCS enthält eine Vielzahl von Proteinen, die für das Kultivieren von Zellen notwendig sind. In einer Studie von Pfab et al. konnte gezeigt werden, dass die Tumorzellen nach dem Entzug von Serum ihre Proliferation einstellen, ohne dabei abzusterben. Sobald den Kulturen wieder Serum zugesetzt wurde, war eine erneute Proliferationsaktivität zu verzeichnen [100]. Dennoch konnte die Arbeitsgruppe der M.O.I beobachten, dass zunächst selbst Tumorzellen proliferierten, denen zu Beginn der Inkulturnahme kein FCS zur Verfügung gestellt wurde. Eine Erklärung für diese Feststellung ist, dass anfangs die zelleigenen Reserven für Wachstum und Vermehrung ausreichen. Für diese Beobachtung spricht auch die Tatsache, dass besonders bei HROC277Met2 ft0 M1 und

HROC288 T2 M3 von Beginn an eine stetige Proliferation der adhärenen Tumorzellen zu verzeichnen war.

Ein weiteres Problem während der Kultivierung war die Tatsache, dass sich bei einigen Kulturansätzen zwischenzeitlich nicht mit absoluter Sicherheit sagen ließ, ob inmitten der Feeder-Zellen noch Kolonien vitaler Tumorzellen existierten. Hier ist insbesondere von HROC117 ft1 M3, HROC123 ft1 M4, HROC170 ft1 M1, HROC300 ft1 M1 und HROC348 die Rede. Diesen war gemein, dass die Tumorzellen nach dem Anlegen der 2D-Kulturen nur kleine adhärenente Kolonien ausbildeten und rasch abstarben. Wie beschrieben, wurden die Kavitäten eliminiert, sobald mikroskopisch keine vitalen Zellen mehr erkennbar waren. Ausgehend von der Annahme, dass zum Ende der Kultivierung allein Feeder-Zellen in den entsprechenden Kavitäten übrigblieben, ist die betreffende Kultivierungsdauer fälschlich zu lang angegeben worden. Diese Tatsache hatte folglich jedoch keinen Einfluss auf die Etablierungsrate.

Im Gegensatz dazu stehen Kontaminationen in der Zellkultur der potenziellen Etablierung einer Zelllinie entgegen. Aus diesem Grund wurden dem verwendeten Nährmedium antimikrobielle Substanzen zugesetzt und es wurde großer Wert auf ein steriles Arbeiten gelegt. Um eine Kreuzkontamination zu vermeiden, wurde zusätzlich eine Mykoplasmen-spezifische PCR durchgeführt. Mit diesen Maßnahmen wurde versucht, das Kontaminationsrisiko möglichst gering zu halten. Dennoch war ein Großteil der Wells von HROC29 ft1 M2 mit Mikroorganismen verunreinigt.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschieden Ansätze zur Optimierung der Etablierung von kolorektalen Tumorzelllinien untersucht. Das CTX wurde in diesem Versuch in einer Konzentration von 8,4 ng/ml verwendet. Wie bereits im allgemeinen Teil erwähnt, geschah dies in Anlehnung an die Studie von Liu X et al. [67]. Allerdings wurden in dieser epitheliale Zellen von Mamma und Prostata untersucht. Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Cholera-toxin das Wachstum von Mammaepithelzellen fördert [42]. Eine cAMP-abhängige Inhibition der Apoptose von Darmepithelzellen wurde dagegen bei einer Cholera-toxin-Konzentration von 250 ng/ml gezeigt [39]. Bereits in früheren Studien hatte sich bei Darmepithelzellen eine deutliche Steigerung des intrazellulären cAMP-Spiegels unter Verwendung dieser Konzentration herausgestellt.

Mithilfe von CTX in einer Konzentration von 3 µg/ml konnte im steady state eine sieben- bis achtfache Steigerung des cAMP-Spiegels im Vergleich zur Kontrolle erzielt werden. Bei einer Konzentration von 200 ng/ml war der Effekt halbmaximal [101]. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Konzentration des CTX von 8,4 ng/ml zu niedrig angesetzt wurde. Eine

Zelllinie konnte durch die bloße Zugabe des CTX in dieser Konzentration nicht etabliert werden. Auch die Kombination mit den bestrahlten HEK293-Zellen erwies sich letztlich als nicht zielführend.

Unter der Verwendung von CTX, HROC24 T1 M1 und HROC324 waren Dichte und Größe der Tumorzellkolonien vergleichbar gering. Als Beispiel hierfür können HROC71 fT1 M7, HROC352 und HROC348Met1 aufgeführt werden. Aus diesem Grund wurde sich im Verlauf des Versuches dazu entschieden, den Versuchsaufbau anzupassen. HROC277 T0 M1, HROC112Met T0 M2 und HHC6548 T1 M1 wurden daraufhin in den Versuch integriert. Allerdings brachte auch dies nicht den entsprechenden Erfolg und keine weitere Zelllinie konnte etabliert werden.

### **5.5.1 Einfluss von Y-27632 auf die Tumorzellproliferation**

Verschiedene Studien zum Einfluss der ROCKs auf die Zellproliferation lieferten unterschiedliche Ergebnisse. Zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass durch eine ROCK-Inhibition sowohl die Zellproliferation als auch die Angiogenese gehemmt wird [55]. Umgekehrt konnte in einigen anderen Studien die Zellproliferation durch ROCK-Hemmung gesteigert werden. In einer dieser Publikationen wurde dargelegt, dass die durch den epidermalen Wachstumsfaktor (epidermal growth factor, EGF) induzierte Zellproliferation von ROCK negativ reguliert wird. Die Aktivierung des EGFR erfolgt durch die extrazelluläre Bindung des EGF, was letztlich zu einer Steigerung der Zellproliferation führt. Allerdings fördert EGF zugleich die Aktivierung von ROCK, was wiederum über negative Rückkopplung in einer Hemmung des EGFR-Signalweges resultiert. Die Hemmung von ROCK mit Y-27632 führt ergo über die verminderte negative Rückkopplung zu einer erhöhten EGFR-Aktivität und Zellproliferation [56]. Weiterhin wurde berichtet, dass durch die ROCK-Inhibition die Aktivität des Tumorsuppressorgens PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) heruntergeregelt wird. Dadurch kommt es zur vermehrten Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges und infolgedessen zu einer gesteigerten Proliferation [57].

Eine längere Lebensdauer der Tumorzellen wäre somit durch die Verwendung von Y-27632 zu erwarten gewesen. Dies konnte in dieser experimentellen Arbeit allerdings nicht gezeigt werden.

Ergebnisse anderer Studien ergaben außerdem, dass Y-27632, in Kombination mit Fibroblasten Feeder-Zellen, zu einer unbegrenzten Teilung von verschiedenen Epithelzellen führt. Auch dies hätte sich in dieser Arbeit in einer erhöhten Lebensdauer der Zellkulturen

niederschlagen müssen. Die meisten Studien schreiben der Inaktivierung des RhoA/ROCKs-Signalwegs einen fördernden Effekt auf Zellproliferation und Tumordinvasion zu.

In einer Studie von Li N et al. konnte allerdings auch Gegenteiliges gezeigt werden: miR 126 ist beim CRC herunterreguliert. Eine verringerte Expression von miRNAs im Tumorgewebe führt zu erhöhter ROCK-Expression/-Aktivität und zu erhöhter Zellmigration, -proliferation sowie Tumordinvasion. Ein entgegengesetzter Effekt zeigte sich durch eine Überexpression der miRNAs oder eine ROCK-Inhibition mit Y-27632 [46].

Durch die Verwendung des ROCK-Inhibitors Y-27632, welcher entweder mit oder ohne HEK-293-Feeder-Zellen genutzt wurde, konnte keine zusätzliche Zelllinie etabliert werden. Zur Erzeugung von conditionally reprogrammed cells, welche faktisch uneingeschränkt proliferieren, sind bestimmte Kulturbedingungen erforderlich. Es werden Y-27632 und Fibroblasten-Feeder Zellen benötigt.

In dieser Arbeit wurden statt bestrahlter Fibroblasten die HEK293-Feeder-Zellen verwendet. Fibroblasten sind für den Umsatz der ECM verantwortlich und produzieren unter anderem Kollagenfibrillen, elastische Fasern, Glykosaminoglykane und Proteoglykane. Der Einfluss der ROCKs auf die ECM und die Zell-Matrix-Interaktionen ist im allgemeinen Teil beschrieben (siehe 2.9). Durch das Fehlen der Fibroblasten entfällt folglich die zusätzliche Synthese von Matrix-Bestandteilen. Anscheinend ist die Wechselwirkung dieser mit dem ROCK-Inhibitor entscheidend für das conditional reprogramming.

In den drei Zellkulturflaschen von HROC71 ft1 M7, welche Y-27632 beinhalten und mit Fibroblasten kontaminiert waren, waren diese Prämissen prinzipiell erfüllt. In diesen Zellkulturflaschen war eine stetige Proliferation der Tumorzellen zu verzeichnen. Allerdings handelte es sich nicht um bestrahlte Fibroblasten, sodass sich diese ungehindert teilen konnten und die Primärkultur letztlich überwucherten. Rückblickend betrachtet wäre es aufschlussreich, zu erfahren, ob von den HROC71 ft1 M7 Tumorzellen vermehrt Stammzellmarker exprimiert worden sind (z. B. CD133, CD44, CD166 und ALDH1), welche sich auch auf CSCs nachweisen lassen.

Wären conditionally reprogrammed cells durch die Verwendung von HEK293-Feeder-Zellen generiert worden, hätte sich dies relevant in der Überlebensdauer widerspiegeln müssen.

Wie im allgemeinen Teil beschrieben, haben ROCKs Einfluss auf mannigfaltige zelluläre Funktionen. Es stellt sich die Frage, wie aussagekräftig Untersuchungen und die Testungen von Arzneimitteln an conditionally reprogrammed cells sind. Es wäre denkbar, dass der Einsatz von Y-27632 zur Beeinflussung der Ergebnisse führen könnte. Dies wäre besonders

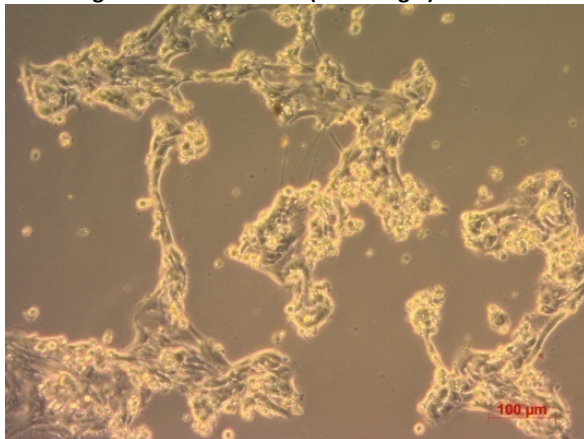
für die „personalisierte Medizin“ und die „patient derived xenografts (PDX)“ bedeutsam. Allerdings konnte eine Studie zeigen, dass tumor conditionally reprogrammed cells genetisch dem Primärtumor sehr ähneln ( $> 90\%$ ) und die intratumorale Heterogenität (ITH) sowie die molekularen Charakteristika größtenteils beibehalten [102]. Dies ist ein Vorteil gegenüber monoklonalen Zellpopulationen. Bei oligo- oder polyklonalen Zellpopulationen kann das Wechselspiel der Zellen untereinander genauer erforscht werden kann.

Bemerkenswert ist der Vergleich der Kultivierungsdauer von HROC50 ft1 M4 und M5. Es handelte sich ursprünglich um den gleichen Tumor, der lediglich in verschiedene NSG-Mäuse transplantiert wurde. Erstens ließ sich aus HROC50 ft1 M5 eine dauerhafte Zelllinie etablieren, während dies bei HROC50 ft1 M4 nicht möglich war. Bei der Überlebensdauer waren ebenfalls deutliche Unterschiede vorhanden.

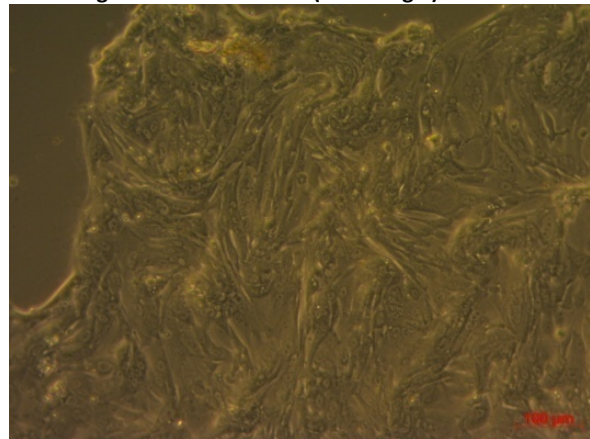
Die Tumorzellen von HROC50 ft1 M4 waren im Mittel lediglich 31,92Tage ( $\pm 10,57$  Tage) in Kultur. Derweil wurde das erste Well von HROC50 ft1 M5 erst nach einer Kultivierungsdauer von 61 Tagen eliminiert, wobei ein Großteil der Wells auch an Kulturtag 113, dem Zeitpunkt des Versuchsendes, noch vitale Tumorzellen beinhaltete.

Zwischen Abbildung 21 und Abbildung 22 ist ein eindeutiger Unterschied in Koloniegröße und Tumorzellichte zu erkennen, obwohl die Zellen morphologische Ähnlichkeiten aufweisen.

**Abbildung 21: HROC50 ft1 M4 (Kulturtag 4)**



**Abbildung 22: HROC50 ft1 M5 (Kulturtag 9)**



Mutmaßlich sind HROC50 ft1 M4 und HROC50 ft1 M5 genetisch nicht identisch und es besteht eine Inter-Tumor-Heterogenität. Ausgehend von dieser Prämisse resultiert die genetische Alteration in einem Überlebensvorteil für HROC50 ft1 M5.

Interessant ist ebenfalls, dass bereits im Vorfeld von HROC348 eine Zelllinie durch das Team der M.O.I etabliert worden war. Eine wiederholte Etablierung war dem Verfasser dieser Arbeit nicht möglich und alle Tumorzellen von HROC348 starben rasch ab.

### **5.5.2 Verwendung von ROCK-Inhibitoren**

Durch die vielfältigen Einflüsse der ROCKs sind verschiedene potenzielle therapeutische Anwendungsbereiche der ROCK-Inhibitoren denkbar. Zu den verfügbaren ROCK-Inhibitoren zählen Y-27632, Fasudil, Hydroxyfasudil und H-1152P. Neben der möglichen Verwendung zur Krebsbehandlung wird auch an einem Einsatz zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen, neurologischen und metabolischen Störungen sowie zur Glaukomtherapie geforscht. Des Weiteren hat Fasudil in Japan eine Zulassung für die Behandlung und die Prävention zerebraler Vasospasmen nach Subarachnoidalblutung [68].

### **5.5.3 Ausblick und patient-derived organoids (PDOs)**

In Forschung und Entwicklung kommt zunehmend auch die 3D-Zellkultivierung zum Einsatz. Für die personalisierte Medizin sind PDX-Modelle nur eingeschränkt brauchbar. Es wird relativ viel Zeit benötigt, um erfolgreich eine Zelllinie aus einem Xenotransplantat zu etablieren. PDXs müssen erst zeitaufwendig ex vivo kultiviert werden, damit ein Hochdurchsatz-Screening (HTS) durchgeführt werden kann. HTS stellt eine automatisierte Methode dar, bei welcher unzählige Substanzen im Hochdurchsatz auf ihre Wirksamkeit getestet werden können. Das HTS ermöglicht für eine individuelle Tumorthherapie die gezielte und optimale Medikamentenauswahl. Das Zeitfenster für den Beginn einer personalisierten Radio-/Chemotherapie wird damit häufig überschritten [103]. Zum anderen können über die Kultivierungsdauer zusätzliche Zellmutationen auftreten, sodass die in vitro Medikamententestungen nur bedingt Rückschlüsse auf das patientenspezifische Therapieansprechen zulassen.

Des Weiteren imitieren 2D-Zellkulturmodelle die reale Situation im Tumorgewebe lediglich unzureichend. Hier sind besonders die ITH und die Tumormikroumgebung zu nennen. Zur Tumormikroumgebung gehören unter anderem Tumor-assoziierte Fibroblasten sowie tumorinfiltrierende Lymphozyten, welche Tumorprogression und Metastasierung fördern. Dementsprechend sind die Zellen der Tumormikroumgebung selbst Targets von Zytostatika [104].

Patient-derived organoids (PDOs) bieten als 3D-in-vitro-Modelle Vorteile gegenüber 2D-Modellen. Aus Tumorgewebe von Patienten wird in eine dreidimensionale Zellkultur angelegt. Immundefiziente Mäuse kommen nicht zum Einsatz. Die Zellen bilden dann komplexe Gewebeverbände, welche in Hinblick auf Histoarchitektur und die genetische Heterogenität dem Originalgewebe ähneln. PDOs sind außerdem für ein HTS geeignet. Damit sind sie tauglicher für die personalisierte Medizin und lassen bessere Rückschlüsse auf ein

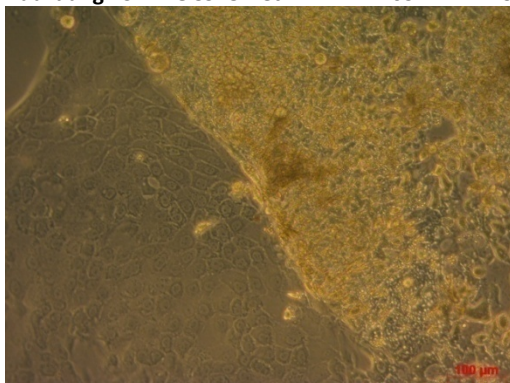
Therapieansprechen ausgesuchter Zytostatika zu [105]. Folglich sind PDOs als In-vitro-Modelle aus der Tumorforschung nicht mehr wegzudenken.

## 6 Zusammenfassung

Zelllinien verschiedener Tumorentitäten werden sowohl in der präklinischen pharmakologischen Forschung als auch in der Grundlagenforschung verwendet. Analysiert werden vor allem neue Wirkstoffe oder Wirkstoffkombinationen, welche mit gängigen Therapieschemata verglichen werden. Auch die Untersuchung von Resistenzentwicklungen gegen die verwendeten Chemotherapeutika ist von Bedeutung. Sollten Zelllinien von Primarius und zugehöriger Metastase vorliegen, kann ein potenziell unterschiedliches Therapieansprechen beurteilt werden. Individuelle Tumorzelllinien können zukünftig auch im Bereich der personalisierten Medizin eine wichtige Rolle einnehmen. Mit ihrer Hilfe wäre es möglich, das jeweils beste Behandlungskonzept für den konkreten Patienten zu ermitteln.

Das CRC ist eine sehr heterogene Erkrankung; und die Diversität der Tumoren ist der Grund für die Schaffung von Tumorbanken. Je mehr Zelllinien verschiedener Tumoren zur Verfügung stehen, desto einfacher ist es, für spezifische wissenschaftliche Fragestellungen eine geeignete Auswahl an zu untersuchenden Linien zu treffen. Insbesondere Zelllinien in niedriger Passage sind interessant [106], da diese eine hohe Ähnlichkeit zum Originaltumor aufweisen. Veränderungen des Genoms, beispielsweise numerische Chromosomenabberationen, führen letztlich zum Überleben des am besten angepassten Zellklons [107,108]. Die aus einem geeigneten Klon erhaltene Zellpopulation kann schließlich zur Etablierung einer permanenten Zelllinie führen. Die verschiedenen Klone können sich auch morphologisch unterscheiden. In Abbildung 23 sind Klone von HROC348Met1 derselben Passage zu erkennen, welche sich morphologisch klar voneinander abgrenzen lassen.

**Abbildung 23: HROC348Met1 P1 + Y-27632 + HEK293**



Grundsätzlich gibt es zwischen den verschiedenen Tumorentitäten Unterschiede bezüglich der Quote einer erfolgreichen Zelllinienetablierung. Problematisch ist diese vergleichbar niedrige Rate beim CRC, welche nur bei etwa 12,2 % [2] liegt. Im Gegensatz dazu können Zelllinien vom kleinzelligen Lungenkarzinom mit einer Rate von 72 % [3] etabliert werden.

Das primäre Ziel dieses Versuchs war es, eine experimentelle Strategie auszuarbeiten, um diese Quote beim kolorektalen Karzinom zu erhöhen. Von den 32 untersuchten Tumorfällen konnten vier Zelllinien etabliert werden, was einer Erfolgsrate von 12,5 % entspricht. Konkret handelt es sich dabei um HROC50 fT1 M5, HROC277Met2 fT0 M1, HROC288 T2 M3 und HROC348Met1. Von den 32 untersuchten Tumorgeweben stammten sechs direkt von Patientenproben (patient derived) ab und wurden in Kultur gebracht. Davon konnte eine (primäre) permanente Zelllinie etabliert werden. Dies entspricht einer Erfolgsrate von 16,67 %. Die nach S. C. Kirkland und I. G. Bailey beschriebene Erfolgsquote von 12,2 % [2] zur Etablierung von Zelllinien humaner kolarektaler Karzinome konnte demnach erreicht werden. Hier ist der Stichprobenumfang allerdings sehr klein.

Die restlichen 26 Proben stammten aus immundefizienten Mäusen (PDX-Modell). Hiervon konnten drei (sekundäre) Zelllinien etabliert werden. Die Erfolgsquote liegt entsprechend bei 11,5 %, in der Literatur sind jedoch Erfolgsraten von 23,6 % zu finden. Deshalb wird der Generierung von PDX und sekundären Zelllinien normalerweise der Vorrang gewährt [109].

Zu erwähnen ist, dass alle Zelllinien aus Kontroll-Wells etabliert worden sind. Dies wäre teilweise auch aus anderen Wells möglich gewesen, einfachheitshalber wurde sich jedoch für die Kontroll-Wells entschieden. Als Beispiele hierfür ist HROC277Met2 fT0 M1 zu nennen. Aber auch bei HROC348Met1 sahen mehrere Wells erfolgversprechend aus (außer die drei Kulturansätze mit Y-27632, mit CTX oder dem konditionierten Medium von HROC24 T1 M1).

Es ist erfreulich, dass diese vier etablierten Zelllinien jetzt Bestandteil der Biobank der Universitätsmedizin Rostock sind. Damit stehen sie Wissenschaftlern und Wissenschaftlerinnen weltweit für Forschungszwecke zur Verfügung.

## 7 Literaturverzeichnis

- 1 **Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND.** Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer research* 1976; **36**(12): 4562–69
- 2 **Kirkland SC, Bailey IG.** Establishment and characterisation of six human colorectal adenocarcinoma cell lines. *British journal of cancer* 1986; **53**(6): 779–85
- 3 **Carney DN, Gazdar AF, Bepler G et al.** Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features. *Cancer research* 1985; **45**(6): 2913–23
- 4 **Otchy DP, Ransohoff DF, Wolff BG et al.** Metachronous colon cancer in persons who have had a large adenomatous polyp. *The American journal of gastroenterology* 1996; **91**(3): 448–54
- 5 **Atkin WS, Morson BC, Cuzick J.** Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *The New England journal of medicine* 1992; **326**(10): 658–62
- 6 **Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P.** Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA* 2008; **300**(23): 2765–78
- 7 **Johns LE, Houlston RS.** A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *The American journal of gastroenterology* 2001; **96**(10): 2992–3003
- 8 **Pereira F, Larriba MJ, Munoz A.** Vitamin D and colon cancer. *Endocrine-related cancer* 2012; **19**(3): R51-71
- 9 **Rothwell PM, Wilson M, Elwin C et al.** Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet (London, England)* 2010; **376**(9754): 1741–50
- 10 **Tannapfel A, Neid M, Aust D, Baretton G.** The origins of colorectal carcinoma: specific nomenclature for different pathways and precursor lesions. *DeutschesÄrzteblatt international* 2010; **107**(43): 760–66
- 11 **Fearon ER, Vogelstein B.** A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; **61**(5): 759–67
- 12 **Kang J, Lee HW, Kim I, Kim NK, Sohn S, Lee KY.** Clinical implications of microsatellite instability in T1 colorectal cancer. *Yonsei medical journal* 2015; **56**(1): 175–81
- 13 **Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN et al.** Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *The New England journal of medicine* 1993; **329**(27): 1977–81
- 14 **Citarda F, Tomaselli G, Capocaccia R, Barcherini S, Crespi M.** Efficacy in standard clinical practice of colonoscopic polypectomy in reducing colorectal cancer incidence. *Gut* 2001; **48**(6): 812–15
- 15 **Zauber AG, Winawer SJ, O'Brien MJ et al.** Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths. *The New England journal of medicine* 2012; **366**(8): 687–96
- 16 **Doran J, Hardcastle JD.** Bleeding patterns in colorectal cancer: the effect of aspirin and the implications for faecal occult blood testing. *The British journal of surgery* 1982; **69**(12): 711–13
- 17 **Ahlquist DA, McGill DB, Fleming JL et al.** Patterns of occult bleeding in asymptomatic colorectal cancer. *Cancer* 1989; **63**(9): 1826–30
- 18 **Macrae FA, St John DJ.** Relationship between patterns of bleeding and Hemoccult sensitivity in patients with colorectal cancers or adenomas. *Gastroenterology* 1982; **82**(5 Pt 1): 891–98
- 19 **Schmitz S.** *Der Experimentator: Zellkultur.* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2011
- 20 **Gstraunthaler G, Lindl T.** *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen,* 7th edn. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg, 2013
- 21 **Carletti E, Motta A, Migliaresi C.** Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2011; **695**: 17–39
- 22 **Giancotti FG, Ruoslahti E.** Integrin signaling. *Science (New York, N.Y.)* 1999; **285**(5430): 1028–32

- 23 **Frisch SM, Screaton RA.** Anoikis mechanisms. *Current opinion in cell biology* 2001; **13**(5): 555–62
- 24 **Guadamillas MC, Cerezo A, Del Pozo MA.** Overcoming anoikis--pathways to anchorage-independent growth in cancer. *Journal of cell science* 2011; **124**(Pt 19): 3189–97
- 25 **Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW et al.** Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. 1950)* 1995; **154**(1): 180–91
- 26 **Blunt T, Finnie NJ, Taccioli GE et al.** Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell* 1995; **80**(5): 813–23
- 27 **Greiner DL, Hesselton RA, Shultz LD.** SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 1998; **16**(3): 166–77
- 28 **Ohbo K, Suda T, Hashiyama M et al.** Modulation of hematopoiesis in mice with a truncated mutant of the interleukin-2 receptor gamma chain. *Blood* 1996; **87**(3): 956–67
- 29 **Kanaji N, Tadokoro A, Susaki K et al.** Higher susceptibility of NOD/LtSz-scid Il2rg (-/-) NSG mice to xenotransplanted lung cancer cell lines. *Cancer management and research* 2014; **6**: 431–36
- 30 **Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN.** Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; **107**(4): 1183–88
- 31 **Sano H, Kawahito Y, Wilder RL et al.** Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer research* 1995; **55**(17): 3785–89
- 32 **Thun MJ, Henley SJ, Patrono C.** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *Journal of the National Cancer Institute* 2002; **94**(4): 252–66
- 33 **Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN.** Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998; **93**(5): 705–16
- 34 **Li M, Wu X, Xu XC.** Induction of apoptosis in colon cancer cells by cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 through a cytochrome c-dependent pathway. *Clinical cancer research an official journal of the American Association for Cancer Research* 2001; **7**(4): 1010–16
- 35 **Chang J, Vacher J, Yao B et al.** Prostaglandin E receptor 4 (EP4) promotes colonic tumorigenesis. *Oncotarget* 2015; **6**(32): 33500–11
- 36 **Chell SD, Witherden IR, Dobson RR et al.** Increased EP4 receptor expression in colorectal cancer progression promotes cell growth and anchorage independence. *Cancer research* 2006; **66**(6): 3106–13
- 37 **Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH.** Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2004; **36**(7): 1187–205
- 38 **Deveraux QL, Reed JC.** IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes & development* 1999; **13**(3): 239–52
- 39 **Nishihara H, Kizaka-Kondoh S, Insel PA, Eckmann L.** Inhibition of apoptosis in normal and transformed intestinal epithelial cells by cAMP through induction of inhibitor of apoptosis protein (IAP)-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; **100**(15): 8921–26
- 40 **Cassel D, Pfeuffer T.** Mechanism of cholera toxin action: covalent modification of the guanyl nucleotide-binding protein of the adenylate cyclase system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1978; **75**(6): 2669–73

- 41 **Cassel D, Selinger Z.** Mechanism of adenylate cyclase activation by cholera toxin: inhibition of GTP hydrolysis at the regulatory site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977; **74**(8): 3307–11
- 42 **Taylor-Papadimitriou J, Purkis P, Fentiman IS.** Cholera toxin and analogues of cyclic AMP stimulate the growth of cultured human mammary epithelial cells. *Journal of cellular physiology* 1980; **102**(3): 317–21
- 43 **Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S.** ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS letters* 1996; **392**(2): 189–93
- 44 **Amin E, Dubey BN, Zhang S et al.** Rho-kinase: regulation, (dys)function, and inhibition. *Biological chemistry* 2013; **394**(11): 1399–410
- 45 **Li X, Wang A, Zhang J, Yi H.** Down-regulation of miR-126 expression in colorectal cancer and its clinical significance. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 2011; **28**(4): 1054–57
- 46 **Li N, Tang A, Huang S et al.** MiR-126 suppresses colon cancer cell proliferation and invasion via inhibiting RhoA/ROCK signaling pathway. *Molecular and cellular biochemistry* 2013; **380**(1-2): 107–19
- 47 **Liu S, Goldstein RH, Scepansky EM, Rosenblatt M.** Inhibition of rho-associated kinase signaling prevents breast cancer metastasis to human bone. *Cancer research* 2009; **69**(22): 8742–51
- 48 **Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K et al.** Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer research* 1993; **53**(7): 1696–701
- 49 **Schipper JH, Frixen UH, Behrens J, Unger A, Jahnke K, Birchmeier W.** E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer research* 1991; **51**(23 Pt 1): 6328–37
- 50 **Umbas R, Isaacs WB, Bringuier PP et al.** Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer. *Cancer research* 1994; **54**(14): 3929–33
- 51 **Toledo M de, Anguille C, Roger L, Roux P, Gadea G.** Cooperative anti-invasive effect of Cdc42/Rac1 activation and ROCK inhibition in SW620 colorectal cancer cells with elevated blebbing activity. *PloSone* 2012; **7**(11): e48344
- 52 **Schneider P, Kruschewski M, Buhr HJ.** *Thoraxchirurgie: Klinische Strategien und perioperative Management für Allgemeinchirurgen.* Berlin: Springer, 2004
- 53 **Jeong KJ, Park SY, Cho KH et al.** The Rho/ROCK pathway for lysophosphatidic acid-induced proteolytic enzyme expression and ovarian cancer cell invasion. *Oncogene* 2012; **31**(39): 4279–89
- 54 **Adachi S, Yasuda I, Nakashima M et al.** Rho-kinase inhibitor upregulates migration by altering focal adhesion formation via the Akt pathway in colon cancer cells. *European journal of pharmacology* 2011; **650**(1): 145–50
- 55 **Chen W, Mao K, Liu Z, Dinh-Xuan AT.** The role of the RhoA/Rho kinase pathway in angiogenesis and its potential value in prostate cancer (Review). *Oncology letters* 2014; **8**(5): 1907–11
- 56 **Nakashima M, Adachi S, Yasuda I, Yamauchi T, Kozawa O, Moriwaki H.** Rho-kinase regulates negatively the epidermal growth factor-stimulated colon cancer cell proliferation. *International journal of oncology* 2010; **36**(3): 585–92
- 57 **Yang S, Kim H.** The RhoA-ROCK-PTEN pathway as a molecular switch for anchorage dependent cell behavior. *Biomaterials* 2012; **33**(10): 2902–15
- 58 **Watanabe K, Ueno M, Kamiya D et al.** A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 2007; **25**(6): 681–86
- 59 **Ohgushi M, Matsumura M, Eiraku M et al.** Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells. *Cell stem cell* 2010; **7**(2): 225–39

- 60 **Castro DJ, Maurer J, Hebbard L, Oshima RG.** ROCK1 inhibition promotes the self-renewal of a novel mouse mammary cancer stem cell. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2013; **31**(1): 12–22
- 61 **Bonnet D, Dick JE.** Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine* 1997; **3**(7): 730–37
- 62 **O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE.** A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007; **445**(7123): 106–10
- 63 **Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E et al.** Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007; **445**(7123): 111–15
- 64 **Haraguchi N, Ohkuma M, Sakashita H et al.** CD133+CD44+ population efficiently enriches colon cancer initiating cells. *Annals of surgical oncology* 2008; **15**(10): 2927–33
- 65 **Huang EH, Hynes MJ, Zhang T et al.** Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer research* 2009; **69**(8): 3382–89
- 66 **Suprynovicz FA, Upadhyay G, Krawczyk E et al.** Conditionally reprogrammed cells represent a stem-like state of adult epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012; **109**(49): 20035–40
- 67 **Liu X, Ory V, Chapman S et al.** ROCK inhibitor and feeder cells induce the conditional reprogramming of epithelial cells. *The American journal of pathology* 2012; **180**(2): 599–607
- 68 **Shibuya M, Suzuki Y, Sugita K et al.** Effect of AT877 on cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Results of a prospective placebo-controlled double-blind trial. *Journal of neurosurgery* 1992; **76**(4): 571–77
- 69 **Labat-Robert J, Bihari-Varga M, Robert L.** Extracellular matrix. *FEBS Lett.* 1990; **268**(2): 386–93
- 70 **Adams JC, Watt FM.** Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 1993; **117**(4): 1183–98
- 71 **Bershadsky AD, Balaban NQ, Geiger B.** Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2003; **19**: 677–95
- 72 **Eiselleova L, Peterkova I, Neradil J, Slaninova I, Hampl A, Dvorak P.** Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* 2008; **52**(4): 353–63
- 73 **Mazur P.** Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American journal of physiology* 1984; **247**(3 Pt 1): C125-42
- 74 **Da Violante G, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P.** Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2002; **25**(12): 1600–03
- 75 **Loens K, Ursi D, Goossens H, Ieven M.** Molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections. *J. Clin. Microbiol.* 2003; **41**(11): 4915–23
- 76 **Young L, Sung J, Stacey G, Masters JR.** Detection of *Mycoplasma* in cell cultures. *Nat Protoc* 2010; **5**(5): 929–34
- 77 **Tabatabaei-Qomi R, Sheykh-Hasan M, Fazaely H, Kalhor N, Ghiasi M.** Development of a PCR assay to detect mycoplasma contamination in cord blood hematopoietic stem cells. *Iran J Microbiol* 2014; **6**(4): 281–84
- 78 **McGarrity GJ, Vanaman V, Sarama J.** Cytogenetic effects of mycoplasmal infection of cell cultures: a review. *In Vitro* 1984; **20**(1): 1–18
- 79 **Rottem S, Barile MF.** Beware of mycoplasmas. *Trends Biotechnol.* 1993; **11**(4): 143–51
- 80 **Polak-Vogelzang AA, Brugman J, Reijgers R.** Comparison of two methods for detection of mollicutes (*Mycoplasma*tales and *Acholeplasma*tales) in cell cultures in the Netherlands. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1987; **53**(2): 107–18

- 81 **Bölske G.** Survey of Mycoplasma infections in cell cultures and a comparison of detection methods. *ZentralblBakteriolMikrobiolHyg A* 1988; **269**(3): 331–40
- 82 **Drexler HG, Uphoff CC.** Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology* 2002; **39**(2): 75–90
- 83 **Mülhardt C.** *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, 5th edn. München: Elsevier Spektrum Akad. Verl., 2006
- 84 **Bedra M, Vyskocil T, Emel J, Edwards C, Boutros C.** Synergetic role of integrating the departments of cancer registry and clinical research at an academic comprehensive cancer center. *World journal of methodology* 2017; **7**(2): 33–36
- 85 **Matschos S, Bürtin F, Kdimati S et al.** The HROC-Xenobank-A High Quality Assured PDX Biobank of 100 Individual Colorectal Cancer Models. *Cancers* 2021; **13**(23)
- 86 **Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ.** TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *Journal of laboratory automation* 2015; **20**(2): 107–26
- 87 **Przybylla R, Mullins CS, Krohn M, Oswald S, Linnebacher M.** Establishment and Characterization of Novel Human Intestinal In Vitro Models for Absorption and First-Pass Metabolism Studies. *International journal of molecular sciences* 2022; **23**(17)
- 88 **Olszewski U, Liedauer R, Ausch C, Thalhammer T, Hamilton G.** Overexpression of CYP3A4 in a COLO 205 Colon Cancer Stem Cell Model in vitro. *Cancers* 2011; **3**(1): 1467–79
- 89 **Rodríguez-Antona C, Leskelä S, Zajac M et al.** Expression of CYP3A4 as a predictor of response to chemotherapy in peripheral T-cell lymphomas. *Blood* 2007; **110**(9): 3345–51
- 90 **Falcone A, Masi G, Allegrini G et al.** Biweekly chemotherapy with oxaliplatin, irinotecan, infusional Fluorouracil, and leucovorin: a pilot study in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2002; **20**(19): 4006–14
- 91 **Masi G, Allegrini G, Cupini S et al.** First-line treatment of metastatic colorectal cancer with irinotecan, oxaliplatin and 5-fluorouracil/leucovorin (FOLFOXIRI): results of a phase II study with a simplified biweekly schedule. *Annals of oncology official journal of the European Society for Medical Oncology* 2004; **15**(12): 1766–72
- 92 **Liu J, Cho YB, Hong HK et al.** Molecular dissection of CRC primary tumors and their matched liver metastases reveals critical role of immune microenvironment, EMT and angiogenesis in cancer metastasis. *Scientific reports* 2020; **10**(1): 10725
- 93 **Wagner S, Beger NT, Matschos S et al.** Tumour-Derived Cell Lines and Their Potential for Therapy Prediction in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Cancers* 2021; **13**(18)
- 94 **Vlachogiannis G, Hedayat S, Vatsiou A et al.** Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science (New York, N.Y.)* 2018; **359**(6378): 920–26
- 95 **Ooft SN, Weeber F, Dijkstra KK et al.** Patient-derived organoids can predict response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients. *Science translational medicine* 2019; **11**(513)
- 96 **Bleijs M, van de Wetering M, Clevers H, Drost J.** Xenograft and organoid model systems in cancer research. *The EMBO journal* 2019; **38**(15): e101654
- 97 **Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD et al.** Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nature reviews. Clinical oncology* 2012; **9**(6): 338–50
- 98 **Rittié L, Fisher GJ.** Isolation and culture of skin fibroblasts. *Methods in molecular medicine* 2005; **117**: 83–98

- 99 **Ejiri H, Nomura T, Hasegawa M et al.** Use of synthetic serum-free medium for culture of human dermal fibroblasts to establish an experimental system similar to living dermis. *Cytotechnology* 2015; **67**(3): 507–14
- 100 **Pfab R, Schachtschabel DO, Paul N, Kern HF, Hess F.** Einfluss des Serumgehaltes im Nährmedium auf Wachstum und das Mikrotubulus- und Mikrofilamentsystem von Ehrlich-Aszitestumorzellen in Monolayer-Kultur. *Strahlentherapie* 1978; **154**(10): 692–99
- 101 **Hyun CS, Kimmich GA.** Effect of cholera toxin on cAMP levels and Na<sup>+</sup> influx in isolated intestinal epithelial cells. *The American journal of physiology* 1982; **243**(3): C107-15
- 102 **Correa BRS, Hu J, Penalva LOF et al.** Patient-derived conditionally reprogrammed cells maintain intra-tumor genetic heterogeneity. *Scientific reports* 2018; **8**(1): 4097
- 103 **Aparicio S, Hidalgo M, Kung AL.** Examining the utility of patient-derived xenograft mouse models. *Nature reviews. Cancer* 2015; **15**(5): 311–16
- 104 **Binnewies M, Roberts EW, Kersten K et al.** Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nature medicine* 2018; **24**(5): 541–50
- 105 **Drost J, Clevers H.** Organoids in cancer research. *Nature reviews. Cancer* 2018; **18**(7): 407–18
- 106 **Dangles-Marie V, Pocard M, Richon S et al.** Establishment of human colon cancer cell lines from fresh tumors versus xenografts: comparison of success rate and cell line features. *Cancer research* 2007; **67**(1): 398–407
- 107 **Fidler IJ, Kripke ML.** Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science (New York, N.Y.)* 1977; **197**(4306): 893–95
- 108 **Fidler IJ.** The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature reviews. Cancer* 2003; **3**(6): 453–58
- 109 **Mullins CS, Micheel B, Matschos S, et al.** Integrated Biobanking and Tumor Model Establishment of Human Colorectal Carcinoma Provides Excellent Tools for Preclinical Research. *Cancers (Basel)*. 2019;11(10):1520. Published 2019 Oct 9. doi:10.3390/cancers11101520

## **8 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Tumorgraduierung (Grading) nach WHO des CRC

Tabelle 2: TNM-Klassifikation des CRC

Tabelle 3: Vereinfachte Darstellung der UICC-Stadien des kolorektalen Karzinoms

Tabelle 4: Übersichtstabelle der verwendeten Tumorgewebe

Tabelle 5: Sequenzen der Primer für die Mykoplasmen-PCR

Tabelle 6: Beschreibung und Ergebnis der Mykoplasmen-PCR

Tabelle 7: Lebensdauer in Zellkultur

Tabelle 8: Mann-Whitney-U-Test (Kontrollgruppe vs. Y-27632 + CTX + HEK293)

Tabelle 9: Mann-Whitney-U-Test (Kontrollgruppe vs. X); N1=32

## **9 Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Plattendefinition I der angelegten 6-Well-Platte

Abbildung 2: Plattendefinition II der angelegten 6-Well-Platte

Abbildung 3: Gelelektrophorese der Mykoplasmen-PCR

Abbildung 4: HROC50 fT1 M5 + CTX (Kulturtag 43)

Abbildung 5: HROC50 fT1 M5 Kontrolle (Kulturtag 43)

Abbildung 6: HROC71 fT1 M7 + CTX (Kulturtag 25)

Abbildung 7: HROC71 fT1 M7 + Y-27632 + CTX + HEK 293 (Kulturtag 25)

Abbildung 8: HROC71 fT1 M7 + Y-27632

Abbildung 9: HROC130 fT1 M1 + Y-27632 + CTX (Kulturtag 14)

Abbildung 10: HROC130 fT1 M1 + Y-27632 + CTX (Kulturtag 50)

Abbildung 11: HROC203 T1 M1 Kontrolle (Kulturtag 64)

Abbildung 12: HROC250 T2 M1 + Y-27632 + CTX (Kulturtag 8)

Abbildung 13: HROC349 + kond Medium HROC324 (Kulturtag 12)

Abbildung 14: HROC349 + kond Medium HROC324 (Kulturtag 19)

Abbildung 15: HROC352 + kond Medium HROC24 T1 M1 (Kulturtag 15)

Abbildung 16: HROC352 + HROC24 T1 M1 (Kulturtag 15)

Abbildung 17: HROC352 + HROC24 T1 M1 (Kulturtag 126)

Abbildung 18: HROC352 + HROC257 T0 M1 (Kulturtag 126)

Abbildung 19: HROC352 + CTX (Kulturtag 126)

Abbildung 20: Boxplot

Abbildung 21: HROC50 fT1 M4 (Kulturtag 4)

Abbildung 22: HROC50 fT1 M5 (Kulturtag 9)

## 10 Anhang

### 10.1 Medium MOITUM

|                               |
|-------------------------------|
| DMEM/Ham's F12 mit L-Glutamin |
| Penicillin G                  |
| Streptomycin                  |
| Amphotericin B                |

### 10.2 Mastermix

|                                |         |
|--------------------------------|---------|
| PCR-Puffer + MgCl <sub>2</sub> | 2,5 µl  |
| dNTP's (10 mM)                 | 0,5 µl  |
| f-Primer (10 pMol/µl)          | 0,5 µl  |
| r-Primer (10 pMol/µl)          | 0,5 µl  |
| Taq                            | 0,2 µl  |
| Wasser                         | 18,3 µl |

### 10.3 Materialliste

|   |
|---|
| 6 Wellplatten (Greiner Bio One)   |
| Amphotericin B (Dermapharm AG)  |
| Cholera Toxin (Sigma-Aldrich)   |
| Dimethylsulfoxid (AppliChem)  |
| DMEM/Ham's F12 mit L-Glutamin (PAN-Biotech)   |
| FCS GOOD (PAN-Biotech)  |
| Freezing Container "Mr Frosty", gefüllt mit Isopropanol (Fisher Scientific – Nalgene) |
| Kryoröhrchen (Kryos) 2 ml mit Innengewinde (Greiner Bio-One)                          |
| L-Glutamin 200 mM (PAA)   |
| Neubauer – Zählkammer (Marienfeld)  |
| Pasteupipetten, steril (Fisher Scientific)  |
| PBS; steril; ohne Ca & Mg (PAA)   |
| Penicillin G (Jenapharm)  |
| Polypropylen Röhrchen; steril (Greiner Bio-One)                                       |
| Serologische Pipetten (Greiner Bio-One)   |
| Serum-Monovette 7,5 ml (Sarstedt)   |

|  |
|--|
| Streptomycin (Riemser Arzneimittel AG)       |
| Trypanblau (AppliChem)                       |
| Trypsin EDTA (PAN-Biotech)                   |
| Y-27632 Dihydrochloride (Abcam Biochemicals) |

## **11 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich meine besondere Wertschätzung nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Hilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift niemals zustande gekommen wäre:

Meine besondere Anerkennung gilt meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. rer. nat. Michael Linnebacher, und dem Team der M.O.I. Vielen Danke für die nette Betreuung, die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor und die ständige Hilfsbereitschaft bei jeglichen Widrigkeiten. Über die konstante Unterstützung und die konstruktive Kritik kann ich mich wirklich glücklich schätzen. Nun habe ich diese Arbeit endlich zum Abschluss bringen können, wengleich ich streckenweise Schwierigkeiten hatte, mich zum Schreiben der Arbeit zu motivieren.

Weiterhin möchte ich Frau Dr. med. Annika Michall für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Dissertation danken. Die kleinen und größeren Hinweise und Verbesserungsvorschläge waren auf den letzten Metern sehr hilfreich.

Des Weiteren möchte ich die Leistung meiner Familie würdigen, die mich während des Studiums und der Arbeit im Labor permanent unterstützt hat. Euren Beistand in allen Lebenslagen, eure Geduld und euer Verständnis kann ich gar nicht genug honorieren. Vielen Dank für all die wunderbaren Menschen in meinem Leben!

## **12 Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

### **„Optimierung der Etablierung von kolorektalen Tumorzelllinien“**

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation wurde darauf geachtet, die Rechte Dritter nicht zu verletzen.

Ich habe diese Dissertation an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 18.05.2024

Sven Peters

## **13 Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

|              |             |
|--------------|-------------|
| Name         | Sven Peters |
| Geburtsdatum | 03.10.1990  |
| Geburtsort   | Rostock     |

### **Hochschulausbildung**

|             |   |
|-------------|---|
| 2010 - 2017 | Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock |
|-------------|---|

### **Beruflicher Werdegang**

|              |  |
|--------------|--|
| seit 01/2018 | Assistenzarzt für Orthopädie/Unfallchirurgie am Klinikum Magdeburg gGmbH (Abteilung Orthopädie II) |
|--------------|--|