

Aus dem Lehrstuhl für Tissue Engineering
und Regenerative Medizin
des Universitätsklinikum Würzburg
Lehrstuhlinhaberin: Professor Dr. Heike Walles

**Etablierung eines 3D *in vitro*
Blutgefäß-/Gewebe-modells zur Testung
spezifischer Therapeutika zur
Leukämiebehandlung**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Heidi Bersi
aus Böblingen

Würzburg, Mai 2016

Referentin:

Prof. Dr. Heike Walles

Korreferent:

Prof. Dr. Stefan Knop

Dekan:

Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 14.07.2017

Die Promovendin ist Ärztin

Meiner Familie

„Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an interessant zu werden, wo sie aufhört.“

Justus von Liebig, 1803 - 1873

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Abkürzungsverzeichnis | VII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Leukämie | 2 |
| 1.1.1 Epidemiologie und Einteilung | 2 |
| 1.1.2 Akute myeloische Leukämie | 3 |
| 1.2 Tumormodelle | 6 |
| 1.2.1 Bisherige Tumormodelle | 7 |
| 1.2.2 Tissue Engineering | 9 |
| 1.3 Zielgerichtete Malignom- und Immuntherapie | 12 |
| 1.3.1 Tipifarnib | 12 |
| 1.3.2 Bimolekulare T-Zell-rekrutierende Antikörperkonstrukte | 13 |
| 1.4 Zielsetzung | 15 |
| 2 Material und Methoden | 17 |
| 2.1 Trägerstruktur für das 3D Modell | 17 |
| 2.2 Humane Zellen | 18 |
| 2.2.1 Primäre Zellen | 18 |
| 2.2.2 Zelllinien | 19 |
| 2.3 Chemikalien | 19 |
| 2.4 Kits | 21 |
| 2.5 Antikörper | 22 |
| 2.6 Lösungen, Puffer und Medien | 23 |
| 2.7 Verbrauchsmaterialien | 28 |
| 2.8 Geräte und Hilfsmittel | 29 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.9 | Software | 31 |
| 2.10 | Allgemeine Zellkultur | 32 |
| 2.10.1 | Zellkultivierung | 32 |
| 2.10.2 | Zellpassage | 32 |
| 2.10.3 | Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen | 33 |
| 2.10.4 | Zellzählung | 34 |
| 2.11 | Aufbau des 2D <i>in vitro</i> Modells | 35 |
| 2.12 | Aufbau des 3D <i>in vitro</i> Modells | 37 |
| 2.12.1 | Optimierung und Besiedlung der Matrix | 37 |
| 2.12.2 | Statische Kokultur im 3D Modell | 40 |
| 2.13 | Durchflusszytometrie | 42 |
| 2.13.1 | Aufbau und Funktionsprinzip | 42 |
| 2.13.2 | Vorbereitung der Zellen | 44 |
| 2.13.3 | Messung und Auswertung | 46 |
| 2.14 | Histologie | 48 |
| 2.14.1 | Vitalfärbung mit Calcein Red | 48 |
| 2.14.2 | Gewebefixierung | 50 |
| 2.14.3 | Paraffineinbettung | 50 |
| 2.14.4 | Herstellung der Schnittpräparate | 51 |
| 2.14.5 | Entparaffinieren | 52 |
| 2.14.6 | Hämatoxylin-Eosin-Färbung | 52 |
| 2.14.7 | TUNEL Assay | 53 |
| 2.14.8 | Immunhistochemie | 55 |
| 3 | Ergebnisse | 59 |
| 3.1 | Etablierung eines 3D <i>in vitro</i> Blutgefäß-/ Gewebemodells | 59 |
| 3.1.1 | Auswahl einer Zelllinie | 59 |
| 3.1.2 | Auswahl eines Mediums für die Kokultur im 3D Modell | 60 |
| 3.1.3 | Auswahl einer geeigneten Matrix | 61 |
| 3.2 | Optimierung der Nachweismethoden | 62 |
| 3.2.1 | Durchflusszytometrie | 62 |
| 3.2.2 | Histologie | 64 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.3 | Applikation von Tipifarnib | 69 |
| 3.3.1 | Auswirkungen auf die THP-1 Zellen | 69 |
| 3.3.2 | Auswirkungen auf das 3D Blutgefäß-/Gewebe- modell | 71 |
| 3.4 | Applikation von T-Zell-rekrutierenden Antikörperkonstrukten | 75 |
| 3.4.1 | Auswirkungen auf die THP-1 Zellen | 75 |
| 3.4.2 | Auswirkungen auf das 3D Blutgefäß-/Gewebe- modell | 76 |
| 4 | Diskussion | 79 |
| 4.1 | Etablierung eines 3D <i>in vitro</i> Blutgefäß-/ Gewebe-modells | 79 |
| 4.2 | Nachweismethoden | 83 |
| 4.2.1 | Durchflusszytometrie | 83 |
| 4.2.2 | Histologie | 84 |
| 4.3 | Testung und Vergleich der potentiellen Therapeutika zur Leukämie- behandlung | 88 |
| 4.3.1 | Tipifarnib | 88 |
| 4.3.2 | T-Zell-rekrutierende Antikörperkonstrukte | 91 |
| 4.3.3 | Vergleich der potentiellen Therapeutika zur Leukämiebehand- lung | 93 |
| 5 | Zusammenfassung | 95 |
| | Literaturverzeichnis | 97 |
| | Abbildungsverzeichnis | 109 |
| | Danksagung | 111 |
| | Lebenslauf | 113 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------------|---|
| 2D | <u>z</u> weidimensional |
| 3D | <u>d</u> reidimensional |
| 7-AAD | <u>7</u> - <u>A</u> mino <u>a</u> ctino <u>m</u> ycin <u>D</u> |
| ABC-Transporter | <i>engl.</i> <u>A</u> TP <u>b</u> inding <u>c</u> assette transporter |
| Ak | <u>A</u> ntik <u>ö</u> rper |
| AK | <u>A</u> ntik <u>ö</u> rper <u>k</u> onstrukt |
| ALL | <u>a</u> kute <u>l</u> ymphatische <u>L</u> eukämie |
| AML | <u>a</u> kute <u>m</u> yeloische <u>L</u> eukämie |
| BD | <u>B</u> ecton <u>D</u> ickinson |
| BioVaSc | <i>engl.</i> <u>b</u> iological <u>v</u> ascularised <u>s</u> caffold |
| BSA | <u>b</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin |
| Calcein AM | Calcein <u>A</u> ceto <u>x</u> ymethylester |
| CAR | <u>c</u> himärer <u>A</u> ntigen <u>R</u> ezeptor |
| CD | <i>engl.</i> <u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation |
| CLL | <u>c</u> hronische <u>l</u> ymphatische <u>L</u> eukämie |
| CML | <u>c</u> hronische <u>m</u> yeloische <u>L</u> eukämie |
| CPT | <u>C</u> ampto <u>t</u> hec <u>i</u> n |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------------------|--|
| CRS | <i>engl.</i> <u>c</u> ytokine <u>r</u> elease <u>s</u> yndrome |
| d | <i>engl.</i> <u>d</u> onkey |
| DAB | 3,3'- <u>D</u> ia <u>m</u> inob <u>en</u> zidin |
| DABCO | 1,4- <u>D</u> ia <u>z</u> a- <u>b</u> icyclo(2,2,2) <u>o</u> ctan |
| DAPI | 4',6- <u>D</u> ia <u>m</u> idin-2- <u>p</u> henyl <u>in</u> dol |
| DMSO | <u>D</u> imethyl <u>s</u> ul <u>f</u> oxid |
| DNA | <i>engl.</i> <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid |
| DNase | <u>D</u> esoxyribo <u>n</u> uk <u>l</u> ease |
| DSMZ | <u>D</u> eutsche <u>S</u> ammlung von <u>M</u> ikroorganismen und <u>Z</u> ellkulturen |
| EDTA | <u>E</u> thylendia <u>m</u> intetra <u>a</u> acetat |
| engl. | <u>e</u> nglisch |
| et al. | <i>lateinisch</i> et <u>a</u> li- <u>i</u> / <u>-ae</u> / <u>-a</u> (Maskulin-/Feminin-/Neutrum) |
| EZM | <u>E</u> xtrazellulär <u>m</u> atrix |
| FAB-Klassifikation | <u>F</u> rench- <u>A</u> merican- <u>B</u> ritish-Klassifikation |
| FACS | <i>engl.</i> <u>f</u> luorescence <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orting |
| FC | <i>engl.</i> <u>f</u> low <u>c</u> ytometry |
| Fc-Fragment | <i>engl.</i> <u>f</u> ragment <u>c</u> rySTALLISABLE |
| FCS | <i>engl.</i> <u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum |
| FITC | <u>F</u> luorescein <u>i</u> s <u>o</u> thiocyanat |
| FSC | <i>engl.</i> <u>f</u> orward <u>s</u> catter |
| Fv | <i>engl.</i> <u>v</u> ariable <u>f</u> ragment |
| GvHD | <i>engl.</i> <u>g</u> raft- <u>v</u> ersus- <u>h</u> ost <u>d</u> isease |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------------|---|
| GvL | <i>engl.</i> <u>g</u> raft- <u>v</u> ersus- <u>l</u> eukemia |
| HBSS | <i>engl.</i> <u>H</u> anks' <u>B</u> alanced <u>S</u> alt <u>S</u> olution |
| H.E.-Färbung | <u>H</u> ämatoxylin- <u>E</u> osin-Färbung |
| HEPES | <u>H</u> ydroxyethylpiperazin- <u>E</u> thansulfonsäure |
| HHBS | <i>engl.</i> <u>H</u> anks' <u>B</u> alanced <u>S</u> alts with <u>H</u> EPES |
| HLA | <i>engl.</i> <u>h</u> uman <u>l</u> eukocyte <u>a</u> ntigen |
| HMEC | <i>engl.</i> <u>h</u> uman <u>m</u> icrovascular <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ell |
| HRP | <i>engl.</i> <u>h</u> orseradish <u>p</u> eroxidase |
| IC₅₀ | <i>engl.</i> half maximal <u>i</u> nhibitory <u>c</u> oncentration |
| IFN | <u>I</u> nter <u>f</u> eron |
| IgG | <u>I</u> mmunglobulin <u>G</u> |
| IHC | <u>I</u> mmun <u>h</u> isto <u>c</u> hemie |
| IL | <u>I</u> nter <u>l</u> eukin |
| m | <i>engl.</i> <u>m</u> ouse |
| MHC | <i>engl.</i> <u>m</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex |
| MDR | <i>engl.</i> <u>m</u> ulti <u>d</u> rug <u>r</u> esistance |
| n | Anzahl der Versuchswiederholungen |
| p | <u>p</u> olyklonal |
| PBMC | <i>engl.</i> <u>p</u> eripheral <u>b</u> lood <u>m</u> ononuclear <u>c</u> ell |
| PBS | <i>engl.</i> <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline |
| PE | <u>P</u> hyco <u>e</u> rythrin |
| PFA | <u>P</u> ara <u>f</u> ormal <u>d</u> ehyd |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------|--|
| P/S | <u>P</u> enicillin / <u>S</u> treptomycin |
| r | <i>engl.</i> <u>r</u> abbit |
| rpm | <i>engl.</i> <u>r</u> evolutions <u>p</u> er <u>m</u> inute |
| RPMI | <i>engl.</i> <u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute |
| scFv | <i>engl.</i> <u>s</u> ingle <u>c</u> hain <u>v</u> ariable <u>f</u> ragment |
| SIS | <i>engl.</i> <u>s</u> mall <u>i</u> ntestinal <u>s</u> ubmucosa |
| SSC | <i>engl.</i> <u>s</u> ide <u>s</u> catter |
| TBS | <i>engl.</i> <u>t</u> ris <u>b</u> uffered <u>s</u> aline |
| TBST | <i>engl.</i> <u>t</u> ris <u>b</u> uffered <u>s</u> aline and <u>T</u> ween |
| TdT | <i>engl.</i> <u>t</u> erminal <u>d</u> eoxy <u>n</u> ucleotidyl <u>t</u> ransferase |
| TUNEL | <i>engl.</i> <u>T</u> dT-mediated <u>d</u> UTP-X <u>n</u> ick <u>e</u> nd <u>l</u> abeling |
| VE-Wasser | <u>v</u> oll <u>e</u> nts <u>a</u> lztes Wasser |
| WHO | <i>engl.</i> <u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization |
| ZEMM | <u>Z</u> entrum für <u>E</u> xperimentelle <u>M</u> olekulare <u>M</u> edizin |

1 Einleitung

Krebs stellt nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache in den Industrienationen dar. In Deutschland geht man von circa 480.000 Neuerkrankungen pro Jahr aus [1]. Unter Berücksichtigung des demographischen Wandels muss weiterhin mit einer steigenden Anzahl an Neuerkrankungen gerechnet werden, da maligne Neoplasien mit dem Alterungsprozess des Organismus einhergehen können [2, 3, 4].

In Bezug auf die Therapie konnte die onkologische Forschung in den letzten Jahrzehnten in einigen Bereichen große Fortschritte verzeichnen. Bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML) zeigte beispielsweise der 2001 neu eingeführte Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib (Glivec) signifikante Vorteile hinsichtlich Prognose und Überleben gegenüber der konventionellen Therapie mit Interferon-alpha (IFN- α) und Cytarabin (IRIS-Studie) [5, 6, 7]. Doch die Entwicklung neuer Tumortheraeutika dauert Jahre bis Jahrzehnte und ist sehr teuer. Ein weiteres Problem ist, dass viele potentielle Therapeutika, die sich in bisherigen präklinischen Testsystemen als vielversprechend erwiesen haben, in klinischen Studien schlecht abschnitten oder zum Beispiel aufgrund unerwünschter Nebenwirkungen zum Abbruch der Studie führten [8]. So ist, trotz neuer Wirkstoffe und multimodalen, interdisziplinären Therapiekonzepten, immer noch jeder vierte Todesfall in Deutschland einer Krebserkrankung zuzuschreiben [4].

Um die Prognose, die unerwünschten Nebenwirkungen einer Therapie sowie die Lebensqualität der Patienten mit einer Malignomerkrankung zu verbessern, bedarf es onkologischer Grundlagenforschung, mit der sich diese Arbeit befasst. Schwerpunkt ist die Etablierung eines 3D *in vitro* Blutgefäß-/Gewebe-modells als verbessertes präklinisches System zur Testung spezifischer Therapeutika, die zur kurativen Behandlung von Leukämien beitragen sollen.

1.1 Leukämie

1.1.1 Epidemiologie und Einteilung

Unter einer Leukämie (*griechisch*: leukos = weiß, haima = Blut) wird im Allgemeinen eine maligne Systemerkrankung mit pathologischer Vermehrung der (Vorläufer-) Zellen der myeloischen beziehungsweise der lymphatischen Blutzellreihe verstanden. Diese ist auf das autonome Wachstum eines Zellklons zurückzuführen, der seinen Ausgang im hämatopoetischen Knochenmark nimmt, dieses verdrängt, maltransformierte Zellen in das periphere Blut ausschwemmt sowie lymphatische und extramedulläre Organe infiltrieren kann [9]. Man geht davon aus, dass in Deutschland etwa 11.800 Menschen pro Jahr (Tendenz: männlich > weiblich) neu daran erkranken, wovon 600 Fälle allein Kinder betreffen [10]. In der Pädiatrie ist die akute Leukämie die häufigste Krebserkrankung, während Leukämien bei Erwachsenen Rang elf der häufigsten Krebsarten einnehmen [1]. Die entsprechende altersassoziierte Verteilung der Neuerkrankungen an Leukämien ist Abbildung 1.1 zu entnehmen.

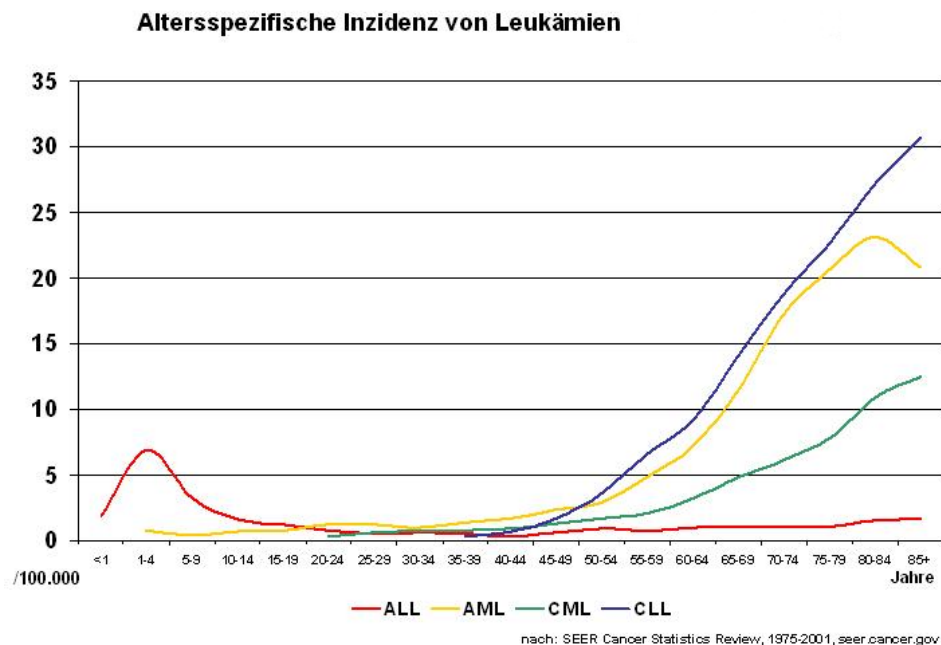


Abbildung 1.1 Altersspezifische Inzidenzen von Leukämien aus den USA (1997-2001) [11]

Der Begriff „Leukämie“ ist vielumfassend. Er beinhaltet vereinfacht dargestellt folgende drei Leukämietypen, die sich anhand ihres Verlaufes und des dominierenden Zelltyps morphologisch, zytogenetisch und immunphänotypisch unterscheiden lassen (Einteilung laut [9]):

- Akute Leukämie mit den Unterformen:
 - Akute myeloische Leukämie (AML)
 - Akute lymphatische Leukämie (ALL)
- Chronische myeloische Leukämie (CML)
- Chronische lymphatische Leukämie (CLL)

Die CLL nimmt jedoch, wie in Abbildung 1.2 dargestellt, eine Sonderstellung ein. Sie wird laut World Health Organization (WHO, *engl.*) aktuell als B-Zell-Neoplasie mit leukämischem Verlauf klassifiziert und ist folglich den Non-Hodgkin-Lymphomen zuzuordnen [12].

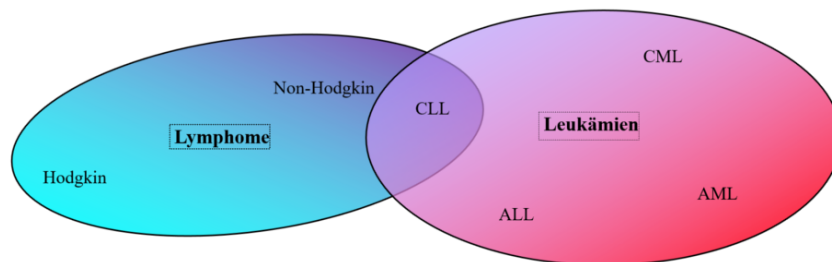


Abbildung 1.2 Einteilungsschema der Leukämien und malignen Lymphome

Prognostisch verlaufen die akuten Leukämien im Kindesalter (80% ALL [13]) besonders günstig, während sie im Erwachsenenalter (80% AML [13]) die ungünstigste Prognose aller Leukämien aufweisen. Im weiteren Verlauf wird der Fokus auf die AML gelegt und diese näher erläutert, da die Experimente dieser Arbeit fast ausschließlich an Zellen einer AML-Reihe durchgeführt worden sind.

1.1.2 Akute myeloische Leukämie

Die AML ist charakterisiert durch eine rasch progrediente Vermehrung neoplastischer Zellen verschiedener Linien der myeloischen Blutzellreihe [14], das heißt der

Vorläuferzellen der Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten und Thrombozyten. In Deutschland werden jährlich etwa 3.600 Erkrankte gezählt [13]. Es sind vor allem Menschen um das 70. Lebensjahr betroffen [15]. Wird nach Sicherung der Diagnose nicht therapiert, leben fünf Monate nach Symptombeginn nur noch 50% der Patienten und 0% nach einem Jahr [16]. Komplikationen ergeben sich vor allem durch die Insuffizienz des infiltrierten Knochenmarks [14]: Durch die funktionell beeinträchtigten Leukozyten beziehungsweise eine Leukopenie kommt es zu Infekten, die sich zur Sepsis weiterentwickeln und zum Tod führen können. Der Mangel an Thrombozyten in Kombination mit einer Prädisposition zur disseminierten intravasalen Gerinnung und zur Hyperfibrinolyse kann zu lebensbedrohlichen Blutungen beitragen. Schließlich kann die ungehemmte Proliferation des neoplastischen Zellklons Probleme hervorrufen. Aufgrund einer Leukostase kann es zu Gefäßverschlüssen kommen, die im schlimmsten Fall im Multiorganversagen enden. Obwohl heutzutage immer bessere Therapiemöglichkeiten (zum Beispiel nach aktuellen Standardstudienprotokollen mit Anthrazyklinen und Antimetaboliten mit oder ohne Stammzelltransplantation) vorhanden sind, zeigen vier bis fünf Jahre nach Therapie nur 34% der unter 60-Jährigen beziehungsweise 15% der über 60-Jährigen eine anhaltende Remission [14]. Diese Tatsache betont erneut die Bedeutung der Forschung und die Forderung nach besseren Therapiemöglichkeiten.

Um die Einordnung der in dieser Arbeit verwendeten, 1978 etablierten, humanen monozytären Leukämiezelllinie THP-1 (AML-M5) [17] zu erleichtern, wird im Folgenden auf die verschiedenen Einteilungen der AML eingegangen. Die erste einheitliche Klassifikation der AML wurde 1976 in Zusammenarbeit von französischen, amerikanischen und britischen Pathologen an Knochenmarksbiopsaten anhand bestimmter morphologischer und zytochemischer Merkmale erstellt [13]. Sie wird als FAB (*engl.* French-American-British)-Klassifikation abgekürzt und ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

Tabelle 1.1 FAB-Klassifikation - modifizierte Abschrift aus [13]

| FAB | Morphologische Kennzeichen |
|------------|--|
| M0 | AML mit minimaler myeloischer Differenzierung |
| M1 | Akute Myeloblastenleukämie mit geringer Ausreifung |

Tabelle 1.1 FAB-Klassifikation (Fortsetzung)

| FAB | Morphologische Kennzeichen |
|------------|---|
| M2 | Akute Myeloblastenleukämie mit Ausreifung |
| M3 | Akute Promyelozytenleukämie |
| M4 | Akute myelomonozytäre Leukämie |
| M5 | Akute Monoblasten- (M5a) / Monozytenleukämie (M5b) |
| M6 | Akute Erythroleukämie |
| M7 | Akute Megakaryoblastenleukämie |

Seit 1976 werden kontinuierlich weitere Methoden entwickelt, mit denen die einzelnen Subtypen der AML noch genauer charakterisiert werden können. Da die neuesten Erkenntnisse in der FAB-Klassifikation nicht ausreichend berücksichtigt sind, gilt diese Einteilung als nicht mehr zeitgemäß. Sie wird seit 2001 durch die WHO-Klassifikation ersetzt, welche zusätzlich zytogenetische und klinisch-ätiologische Merkmale beinhaltet [13]. Nach ihr ist die THP-1 Zelllinie in die Kategorie „Nicht anderweitig klassifizierbare AML“ einzuordnen. Die aktuelle WHO-Klassifikation ist Tabelle 1.2 zu entnehmen.

Tabelle 1.2 WHO-Klassifikation von 2008 - modifizierte Abschrift aus [13]

| WHO-Klassifikation |
|---|
| AML mit spezifischen genetischen Veränderungen |
| <ul style="list-style-type: none"> • AML mit $t(8;21)(q22;q22)$; $RUNX_1-RUNX_1T_1$ • AML mit $inv(16)(p13.1q22)$ oder $t(16;16)(p13.1;q22)$; $CBFB-MYH_{11}$ • Akute Promyelozytenleukämie mit $t(15;17)(q22;q12)$; $PML-RARA$ • AML mit $t(9;11)(p22;q23)$; $MLLT_3-MLL$ • AML mit $t(6;9)(p23;q34)$; $DEK-NUP_{214}$ • AML mit $inv(3)(q21q26.2)$ oder $t(3;3)(q21;q26.2)$; RPN_1-EVI_1 • AML (megakaryoblastisch) mit $t(1;22)(p13;q13)$; $RBM_{15}-MKL_1$ • AML mit mutiertem NPM_1 (provisorisch) • AML mit mutiertem $CEBPA$ (provisorisch) |
| AML mit myelodysplasieverwandten Veränderungen |
| Therapieassoziierte myeloische Neoplasien |

Tabelle 1.2 WHO-Klassifikation von 2008 (Fortsetzung)

| WHO-Klassifikation |
|--|
| Nicht anderweitig klassifizierbare AML |
| <ul style="list-style-type: none">• Minimal differenzierte AML• AML ohne Ausreifung• AML mit Ausreifung• Akute myelomonozytäre Leukämie• Akute monoblastäre und monozytäre Leukämie• Akute Erythroleukämie• Akute Megakaryoblastenleukämie• Akute Basophilenleukämie• Akute Panmyelose mit Myelofibrose |
| Myeloides Sarkom |
| Myeloide Proliferationen in Zusammenhang mit dem Down-Syndrom |
| <ul style="list-style-type: none">• Transiente abnormale Myelopoese• Myeloische Leukämie in Verbindung mit dem Down-Syndrom |
| Blastische plasmozytoide dendritische Zellneoplasie |

Durch zukünftige Forschung werden weitere zytogenetische Veränderungen und deren Auswirkung auf die Malignomentstehung aufgeklärt werden, sodass es nur eine Frage der Zeit ist, bis die WHO-Klassifikation wieder überarbeitet werden sollte. Die Feindiagnostik und diese Art der Einteilung sind medizinisch allerdings nur sinnvoll, wenn sich daraus eine therapeutische Konsequenz ergibt - zum Beispiel durch zielgerichteten Therapieformen (*engl.* targeted therapy). Bevor auf diese eingegangen wird, werden zunächst die verschiedenen Tumormodelle genauer beleuchtet, welche die Entwicklung einer erfolgreichen und zielgerichteten Malignomtherapie erleichtern.

1.2 Tumormodelle

Um die Mechanismen der Malignomentstehung und -progression erforschen und gezielte Therapien mit möglichst wenig unerwünschten Nebenwirkungen entwickeln zu können, sind entsprechende Modelle essentiell. Die Etablierung geeigneter Mo-

delle zur Testung potentieller Therapeutika, die übereinstimmende Ergebnisse mit klinischen Studien liefern, stellt auch im 21. Jahrhundert noch eine große Herausforderung dar. Von den zwischen 1991 bis 2000 präklinisch getesteten onkologischen Therapeutika, die es im Anschluss bis in klinische Studien geschafft hatten, wurden nur circa 5% für die klinische Anwendung zugelassen [8].

1.2.1 Bisherige Tumormodelle

Zweidimensionale (2D) Modelle

2D Modelle bestehen aus Zellen, die *in vitro* auf einer Glas- oder Plastikoberfläche kultiviert werden. Die Zellen wachsen in Form eines Monolayers so lange, bis sie konfluent sind. Ein weiteres Wachstum wird unter anderem durch die enge Zell-Zell-Interaktion und die problematisch werdende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen unterbunden. Prinzipiell werden zwei Zellarten unterschieden: Zelllinien und primäre Zellen. Primäre Zellen stellen nicht immortalisierte Zellen dar, die direkt nach der Isolation aus dem Biopsat in eine Zellkultur überführt werden. Sie zeigen in der Regel kein unbegrenztes Wachstumspotenzial. Die Grundlage der Zelllinien sind Zellen, welche sich nach ihrer Isolation und mehrfacher Zellpassage hinsichtlich Immortalisierung (zum Beispiel durch Onkogene) selektiert haben. Viele Zelllinien können sich unter optimalen Bedingungen in der Zellkultur unendlich weiter vermehren [18].

Die Verwendung konventioneller 2D Modelle hatte um das Jahr 1990 erstmals einen Höhepunkt erreicht, als 60 Tumorzelllinien zur Verfügung standen, an denen verschiedene potentielle Tumorthapeutika ausgetestet werden konnten [19, 20]. Neben großen Erfolgen, wie der Entwicklung von Imatinib (Glivec) zur Behandlung der CML [21], waren auch sehr ernüchternde Ergebnisse zu verzeichnen. Einige Studien stellten fest, dass die Ähnlichkeit verschiedener Tumorzelllinien des gleichen Gewebetyps untereinander viel größer war, als die Ähnlichkeit zwischen einer Tumorzelllinie und dem Tumor, aus dem sie ursprünglich isoliert wurde [22]. Diese Beobachtung ist jedoch sehr von den Zellkulturbedingungen für die einzelnen Zelllinien abhängig und kann bei optimalen Voraussetzungen gänzlich fehlen [23, 24]. Dann können Zelllinien bei der Entwicklung von präklinischen Testsystemen eine schnelle und ökonomisch sinnvolle Hilfestellung bieten, indem sie beispielsweise po-

tentielle Tumorthérapeutika auf deren Effektivität prüfen [20]. Die Zeitersparnis ergibt sich dadurch, dass es inzwischen über jahrzehnte lange Erfahrungen mit Zelllinien hinsichtlich entsprechenden Medien und Kultivierungsbedingungen gibt. Sie sind unkompliziert zum Beispiel bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) inklusive genetischer und immunbiologischer Charakterisierung zu erwerben. Zusätzlich zeichnen sie sich durch schnelle Verdopplungszeiten aus. Durch Beschränkung auf bestimmte Zelllinien und Einhaltung gewisser Standards in der Zellkultur kann mit relativ homogenen Zellpopulationen gearbeitet werden, die sich vergleichsweise ähnlich zum Ursprungsgewebe verhalten [25]. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, sollten Zelllinien nur bis zu einer bestimmten Anzahl von Passagen kultiviert werden, da sie besonders als Tumorzellen eine Tendenz zu genetischen Drifts zeigen und leicht weitere Mutationen akquirieren. Aus diesem Grund wurden die THP-1 Zellen in dieser Arbeit bis maximal Passage 17 in Kultur gehalten [23, 26]. Entscheidend für die Qualität der Forschung sind auch die hygienischen Standards. Sowohl der Einsatz von Antibiotika in der Zellkultur als auch eine Kontamination mit Bakterien und Pilzen, welche jeweils die DNA (*engl.* deoxyribonucleic acid) und das Expressionsmuster von Zellen verändern, leisten Beitrag dazu, dass große Abweichungen zum ursprünglichen (Tumor-) Zellisolat entstehen können [23, 26, 27]. Vorsicht geboten ist ebenfalls bei der Interpretation der Ergebnisse hinsichtlich Präselektion von onkologischen Therapeutika im 2D Testsystem: Die Etablierung einer Zelllinie ist besonders vielversprechend, wenn der ursprüngliche Tumor weitestgehend dedifferenziert und metastasiert ist [27]. Etablierte Zelllinien können daher weder alle Tumorstadien gleich gut abbilden noch die Heterogenität in vollem Ausmaß darstellen. Auch die Proliferationsrate im 2D System ist meist wesentlich höher als in den Ursprungstumoren. Dies führt in Folge zu falsch-positiven Ergebnissen bei der Austestung von Zytostatika [28]. 2D Testmodelle eignen sich daher tendenziell besser für die Erprobung von onkologischen Therapeutika, welche die Suppression des Zellwachstums und die Therapie des Endstadiums der Erkrankung fokussieren [27]. Um verlässliche Ergebnisse zu erhalten, die mit der Klinik korrelieren, sollte die Anforderung an das Testmodell in der Initialphase formuliert und auf die Auswahl dafür geeigneter Zelllinien geachtet werden. Ein weiterer großer Nachteil der meisten 2D Modellen ist, dass Interaktionen

zwischen den malignen Zellen, ihrem natürlich umgebenden Gewebe und dem Immunsystem nicht untersucht werden können. Diese Faktoren haben ebenso Einflüsse auf die Zellproliferation, -integrität, Apoptose und Metastasierung.

Tiermodelle

Versuche an Tieren sind oft ethisch problematisch und es wäre wünschenswert, wenn diese in Zukunft auf das Notwendigste reduziert beziehungsweise durch äquivalente oder sogar bessere Modelle ersetzt werden könnten. *In vivo* Modelle erlauben es, die Interaktionen zwischen den Tumorzellen und dem sie umgebenden Gewebe, sowie lympho- und hämatogene Metastasierungswege zu analysieren. Dennoch sind Tiermodelle teuer, sehr aufwändig in der Handhabung und es dauert wegen der längeren Generationszeit entsprechend lange, bis erste Ergebnisse ausgewertet werden können. In der Anwendung zur Testung potentieller Therapeutika treten aufgrund der artspezifischen Unterschiede (zum Beispiel Lebenszeit, Körpergewicht, Stoffwechsel) zwischen Mensch und Tier teils andere erwünschte, unerwünschte und konverse Effekte auf, die sich auf den humanen Organismus nicht übertragen lassen [29]. So zeigten nur 45% der im Xenograft Modell getesteten Tumorthérapeutika Effekte in klinischen Phase II Studien [30].

1.2.2 Tissue Engineering

Einen sinnvollen Ansatz, die Probleme der 2D und Tiermodellen zu lösen, könnte das Tissue Engineering bieten. Diese Lebenswissenschaft befasst sich mit der *in vitro* Anzucht von Gewebe, welches dem im Organismus (beispielsweise in Aufbau und Funktion) möglichst nahe kommen soll. Das Tissue Engineering hat bereits in vielen Bereichen der Medizin und Forschung Eingang gefunden. Im Bereich der regenerativen Medizin konnte zum Beispiel bei einem Patienten ein *in vitro* gezüchtetes Luftrohrkonstrukt erfolgreich transplantiert werden [31]. Ein weiterer Anwendungsbereich ist die Erforschung der Pathogenese und Therapie verschiedenster Krankheiten. Forscher in Wien haben beispielsweise ein humanes *in vitro* „Mini-Gehirn“ Modell geschaffen, um die Pathogenese einer Mikroenzephalopathie aufklären zu können [32]. In der Onkologie wird mittels Tissue Engineering versucht, komplexe humane

3D *in vitro* Tumormodelle zu schaffen, um die Malignomentstehung genauer verstehen und bessere präklinische Testsysteme zur Entwicklung effizienter Therapien bereitstellen zu können.

Dreidimensionale (3D) Modelle

Für den Aufbau von 3D *in vitro* Modellen wurden in dieser Arbeit Zelllinien beziehungsweise primäre Zellen auf einer Trägerstruktur (*engl.* scaffold oder Matrix) kultiviert, welche aus Komponenten der Extrazellulärmatrix (EZM) besteht. Die natürliche EZM setzt sich aus unterschiedlichen Elementen zusammen: Verschiedene Kollagenfibrillen, elastische Fasern, Glykosamino- und Proteoglykane sowie verschiedene Adhäsionsproteine [33]. Die Adhäsion der Zellen an die EZM hat einen großen Einfluss auf die Integrität, das Überleben und Wachstum der Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* und leistet einen entscheidenden Beitrag zum Erhalt der Zellfunktion *in vitro* [34, 35].

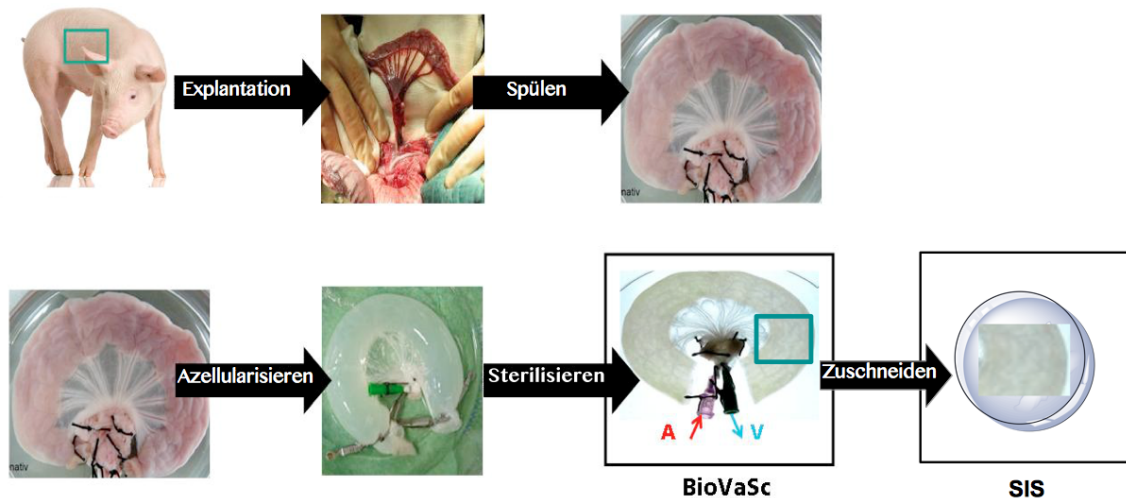


Abbildung 1.3 Schema zur Herstellung der BioVaSc (*engl.* biological vascularised scaffold) und SIS (*engl.* small intestinal submucosa). Dem Schwein wird intraoperativ ein komplettes Jejunumsegment mit zuführender Arterie (A), Kapillaren und Vene (V) entnommen. Nach dem Spülen werden die porcinen Zellen chemisch komplett entfernt (Dezellularisierung). Anschließend erfolgt zu Sterilisationszwecken eine Behandlung mit γ -Strahlen. Das Endprodukt stellt die BioVaSc dar. Für die Gewinnung der SIS wird lediglich der Dünndarmabschnitt der BioVaSc in kleinere Stücke zerteilt, von welchen die Submucosa frei präpariert wird. Abbildung modifiziert nach [36]

Als Trägerstrukturen können unterschiedliche (bio)synthetische und biologische Materialien eingesetzt werden. Um die *in vivo* Situation möglichst gut nachbilden zu können, fand in dieser Arbeit lediglich eine biologische Matrix Anwendung. Das heißt, es wurden bestimmte Darmwandschichten (SIS, *engl.* small intestinal submucosa) aus dezellularisierten Jejunumabschnitten vom Schwein verwendet (Abbildung 1.3). Für den Aufbau des humanen 3D *in vitro* Blutgefäß-/ Gewebemodells wurde in dieser Arbeit die Trägerstruktur mit humanen primären Endothelzellen besiedelt. Um 3D *in vitro* Tumormodelle für solide Tumoren aufzubauen, kann die Matrix auch mit humanen malignen Zellen besiedelt werden. Auf diese Weise kann im *in vitro* Modell eine natürlichere Zellumgebung geschaffen werden, die Zellinteraktionen in allen drei Raumrichtungen ermöglicht.

Diese modularen Grundmodelle können baukastenartig zu komplexeren *in vitro* Modellsystemen ausgebaut werden. In Tumormodellen können neben Tumorzellen, die auf der EZM wachsen, noch weitere Zelltypen (zum Beispiel Fibroblasten) als Kokultur hinzugefügt werden, die zum Teil entscheidende Einflüsse auf die Tumorphagenese und -modifikation haben können. Für die Erforschung von Angiogenese und Metastasenbildung kann als biologische Trägersubstanz ein komplettes dezellularisiertes Jejunumsegment porzinen Ursprungs verwendet werden, bei dem die Gefäßstruktur erhalten ist (BioVaSc, *engl.* biological vascularised scaffold). Diese kann erneut mit humanen Endothelzellen besiedelt und anschließend unter dynamischen Zellkulturbedingungen in einem Bioreaktor perfundiert werden. So können Interaktionen zwischen lumenseitig aufgebrauchten Tumorzellen und humanen Gefäßendothel am Modell studiert werden. Des Weiteren kann das Tissue Engineering die Entwicklung der individualisierten Medizin vorantreiben, wenn die jeweiligen 3D *in vitro* Tumortestsysteme aus den primären Zellen aus Biopsatmaterial vom Patienten aufgebaut werden. Anhand derer können individuelle Therapieschemata ausgetestet und Untersuchungen zur Überwindung von Resistenzen durchgeführt werden.

1.3 Zielgerichtete Malignom- und Immuntherapie

Die zielgerichtete Malignomtherapie entstand aus der Idee heraus, eine auf die maligne Neoplasie zugeschnittene onkologische Therapie zu entwickeln: Die Therapeutika werden zielgerichtet gegen mutierte Strukturen beziehungsweise einzigartige (teils krebsspezifische) Antigenkombinationen eingesetzt, um das gesunde Gewebe möglichst nicht zu schädigen. Bestimmte Antikörper können zusätzlich die antitumorale Aktivität des Immunsystems steigern, indem sie zum Beispiel T-Zellen rekrutieren, welche eine Apoptose in den Zielzellen induzieren. Im Folgenden wird auf zwei potentielle Therapeutika eingegangen, die mit der Zielsetzung „Malignomselektivität“ entwickelt worden sind und Verwendung in dieser Arbeit fanden.

1.3.1 Tipifarnib

Tipifarnib, auch bekannt als Zarnestra oder R115777, ist ein per os bioverfügbarer, kompetitiver Inhibitor des Enzyms Farnesyltransferase, der keine peptidähnliche Struktur (Abbildung 1.4) aufweist [37, 38, 39].

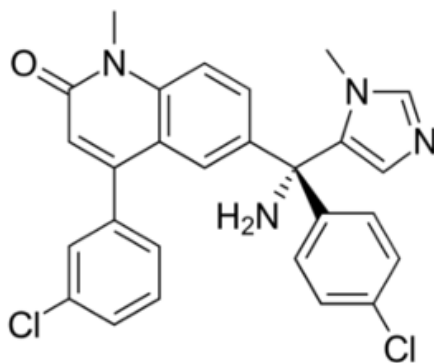


Abbildung 1.4 Chemische Struktur von Tipifarnib [40]

Die intrazelluläre Farnesyltransferase katalysiert die Übertragung eines lipophilen Farnesylrestes auf die Aminosäure Cystein am C-terminalen Ende ihres Substratproteins, sodass eine Thioetherbindung entsteht [38, 41]. Dieser Prenylierungsschritt ist unter anderem essentiell für die posttranslationale Modifikation und zum Beispiel die Funktionsfähigkeit des Onkogens namens *ras*, dessen Mutation in über

25% der menschlichen Tumoren eine Rolle spielt [42]. Durch die Enzymhemmung fehlt der lipophile Membrananker und das G-Protein Ras kann sich nicht optimal an die Intrazellulärmembran anlagern. Daher bleibt die Aktivierung der Effektormoleküle aus [42]. Somit hat das Eingreifen in die posttranslationale Modifikation als Startpunkt vieler verschiedener Signalwege (zum Beispiel Zellproliferation und -überleben, Angiogenese und Apoptose) große Auswirkungen auf das Wachstum der Zelle [38]. Initial wurde der Farnesyltransferase-Inhibitor entwickelt, um die Effekte von *ras*-Mutationen gezielt auszuschalten. Doch bei der Prenylierung des Ras Proteins handelt es sich nicht um einen Einzelfall. Inzwischen sind 20 weitere Zellproteine bekannt, die posttranslational eine Prenylierung erfahren [42], sodass hier Nebenwirkungen zu erwarten sind. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Tipifarnib auch Effekte auf Zelllinien ohne *ras*-Mutationen hat [41]. Noch problematischer ist, dass Ras auf eine Geranylgeranylierung zur Aktivierung ausweichen und daher durch Tipifarnib nicht vollständig ausgeschaltet werden kann [41]. Tipifarnib wurde in dieser Arbeit dennoch als mögliches Therapeutikum zur Leukämiebehandlung getestet, da es signifikante Effekte bei der AML, insbesondere AML-M5, zeigte [37]. Die biochemische Wirkungsweise dazu ist bisher noch unklar [42].

1.3.2 Bimolekulare T-Zell-rekrutierende Antikörperkonstrukte

Therapeutische Antikörper gehören zur Klasse der Biologika (*engl.* Biologicals), welche biotechnologisch hergestellt werden. Sie können über verschiedene Mechanismen auf ihre Zielzellen einwirken [43, 44]: Durch Bindung an bestimmte Zellmembranproteine können sie intrazellulär eine Signalkaskade in Gang setzen, welche die Apoptose in der Zielzelle induziert. Ferner können Antikörper eine komplementabhängige und eine antikörperabhängige zellvermittelte Toxizität bewirken. In dieser Arbeit fanden zwei neuartige Antikörperkonstrukte Anwendung, die zu Beginn der experimentellen Versuche nicht käuflich erhältlich waren und von Priv.-Doz. Dr. med. G. Stuhler (Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Würzburg) zur Verfügung gestellt wurden. Im Folgenden wird der genaue Aufbau und die Funktionsweise dieser Antikörperkonstrukte erläutert, welche in Abbildung 1.5 visualisiert ist.

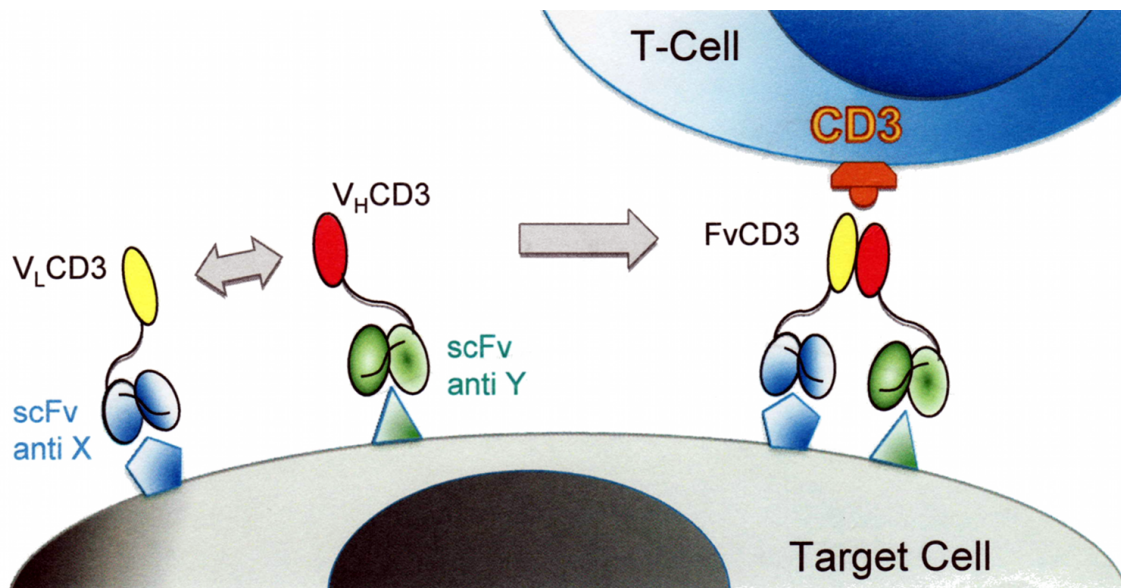


Abbildung 1.5 Aufbau und Funktionsweise der bimolekularen T-Zell-rekrutierenden Antikörperkonstrukte, modifiziert nach Abbildung von Priv.-Doz. Dr. med. G. Stuhler, Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Würzburg

Die beiden löslichen Antikörperfragmente, welche erst nach Heterodimerisierung einen funktionsfähigen Antikörper bilden und daher auch als „Hemibodies“ bezeichnet werden können, sind prinzipiell ähnlich aufgebaut: Ein single chain variable fragment (scFv, *engl.*) ist über eine Peptidkette, dem Linker, mit einer leichten (V_L) oder einer schweren Kette (V_H) der kleinsten antigenbindenden variablen Einheit (Fv) verbunden. Diese ist spezifisch für das Zelloberflächenmerkmal (*engl.* cluster of differentiation) CD3 (FvCD3) auf T-Zellen. Das Fragment namens scFv beinhaltet die leichte Kette einer variablen Einheit, die über einen Linker kovalent mit der schweren Kette der entsprechenden variablen Einheit verbunden ist [45]. Die scFv-Fragmente der verwendeten Antikörperkonstrukte binden jeweils nur ein bestimmtes Epitop. Das scFv des einen Hemibodys ist spezifisch für CD45, eine Tyrosinphosphatase, die als Marker für alle kernhaltigen hämatopoetischen Zellen dient [46]. Das scFv des anderen Hemibodys bindet spezifisch an HLA-A2, ein Protein, das in die MHC-Klasse-I (*engl.* major histocompatibility complex) eingeordnet wird und auf allen kernhaltigen Zellen eines HLA-A2-positiven Individuums (Antigenfrequenz bei Weißen: 28.9, Asiaten: 28.1 und Afrikanern: 17.5 [47]) zu finden

ist. Sobald beide Antikörperkonstrukte über ihr scFv an ihr spezifisches Epitop auf der gleichen Zielzelle gebunden haben, kann sich V_L beziehungsweise V_H am anderen Ende der Antikörperkonstrukte zu FvCD3 funktionell zusammenlagern um eine T-Zell-vermittelte Apoptose in der Zielzelle zu induzieren. Das CD3-Molekül ist eine Komponente des T-Zellrezeptors und fungiert in der Aktivierungsreaktion als zytotoxisches Triggermolekül für die bimolekularen und trispezifischen Antikörper [48, 49]. Die Bindung des FvCD3 der Antikörperkonstrukte an CD3 der T-Zelle aktiviert die T-Zellen und setzt eine weitere Signalkaskade in Gang (unter anderem die Sekretion von Interleukin-2 (IL-2) und Interferon-gamma (IFN- γ), die schließlich zur Zerstörung der malignen hämatopoetischen Zielzelle führt. Eine Besonderheit von sogenannten „single-chain“-Antikörpern ist, dass sie T-Zellen aktivieren können, ohne dass eine vorherige T-Zellstimulation oder Kostimulation zum Beispiel über CD28 oder IL-2 nötig ist, wie es bei einer physiologischen oder bei einer durch konventionell Antikörper-vermittelten T-Zellaktivierung der Fall ist [48, 49]. Womöglich hängt dies mit der kleinen Molekülgröße der Antikörperkonstrukte und einer besseren Quervernetzung der Ziel- und Effektorzelle zusammen [48]. Neben der Besonderheit der direkten T-Zellaktivierung sind bei „single-chain“-Antikörpern weitere Vorteile gegenüber den konventionellen bispezifischen Antikörpern beschrieben: Schnelle Kinetik, höhere spezifische Aktivität und sehr niedrige Therapiedosen bei kleinem Effektor-Zielzellen-Quotient [48, 49]. Diese Merkmale, die für zukünftige (Leukämie-) Therapien sehr vielversprechend klingen, sollten in dieser Arbeit unter anderem auf die Probe gestellt werden.

1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines humanen 3D *in vitro* Blutgefäß-/Gewebe-modells, das Anwendung in der präklinischen Testung von Therapeutika zur Malignombehandlung finden soll. Für den Aufbau des 3D Modells musste zunächst der Teil des dezellularisierten Schweinedarms als Trägerstruktur für die humanen primären Endothelzellen identifiziert werden, der zur Ausbildung eines optimalen Endothelzellmonolayers führt. Für den Ausbau des Blutgefäßmodells zum humanen Leukämie-/Gewebe-modell war die Auswahl einer passenden Leukämiezelllinie und

eines für beide Zelltypen passenden Mediums vorzunehmen. Nach der Etablierung des humanen 3D *in vitro* Testsystems sollten die T-Zell-rekrutierenden Antikörperkonstrukte und Tipifarnib hinsichtlich Effektivität, spezifischer Wirkung und Toxizität im Modell geprüft werden. Da Analysemethoden nicht so einfach von 2D auf 3D Systeme übertragbar sind, musste zunächst eine Strategie entwickelt werden, wie die Induktion der Apoptose im 3D Modell verlässlich gemessen werden konnte. Der therapiebedingte Anstieg der Apoptoserate in der malignen THP-1 Zelllinie wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse der Modellüberstände ermittelt. Die Therapieauswirkungen auf das Endothel wurden mittels histologischen Färbemethoden untersucht. Mithilfe des etablierten Modells sollten auf diese Weise nicht nur Aussagen über die veränderte Zellarchitektur im dreidimensionalen Raum nach Arzneimittelapplikation gemacht werden, sondern auch Aussagen über Wechselwirkungen zwischen Leukozyten, Endothel und Testsubstanz, falls eine Komponente wegfällt. Schließlich sollten die beiden potentiellen Therapeutika gegen AML hinsichtlich ihrer spezifischen Wirkung und Nebenwirkungen miteinander verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Trägerstruktur für das 3D Modell

Für den Aufbau der 3D Blutgefäß-/Gewebe Modelle wurde als Trägerstruktur ein dezellularisiertes Jejunumsegment vom deutschen Landrasseschwein verwendet. Die operative Entnahme des porzinen Dünndarmabschnittes wurde am Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin (ZEMM) der Universität Würzburg vorgenommen. Die Dezellularisierung und weitere Aufarbeitung des Jejunumsegments bis zur SIS erfolgte nach standardisiertem Vorgehen am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin [50, 51]. In der Etablierungsphase dieser Arbeit wurden verschiedene Unterformen der SIS als Matrix für die optimale Ausbildung eines Endothelzellmonolayers ausgetestet. Die im Labor verwendeten SIS-Unterformen sind mit entsprechendem Wandaufbau in Tabelle 2.1 aufgelistet. Zum besseren Verständnis sind die Wandschichten des menschlichen Dünndarms in Abbildung 2.1 dargestellt.

Tabelle 2.1 SIS-Formen und ihr Aufbau

| SIS-Form | Wandaufbau |
|----------|--|
| SIS | Submukosa |
| SIS-Muc | SIS mit erhaltener Mukosa |
| SIS-Ser | SIS mit EZM der Muskularis und erhaltener Serosa |

Die verschiedenen SIS-Unterformen wurden bis zu ihrer Anwendung in phosphatpufferter Salzlösung (PBS, *engl.* phosphate buffered saline) mit 1% (v/v) Gentamicin bei 4°C gelagert.

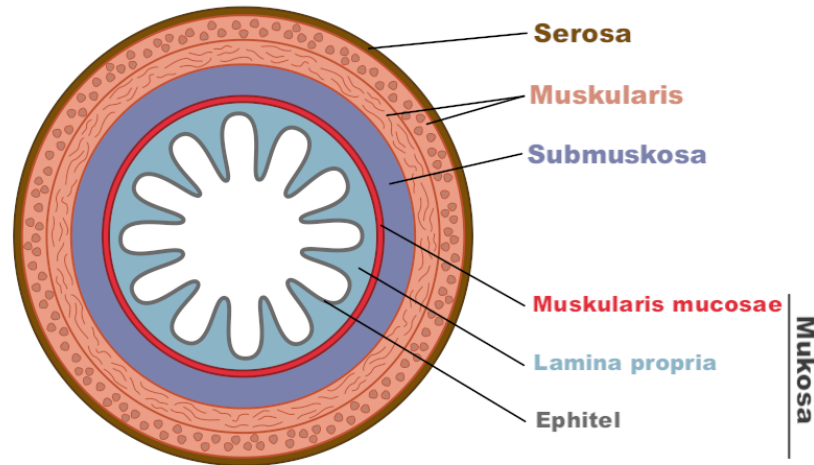


Abbildung 2.1 Wandschichten des Verdauungskanals

2.2 Humane Zellen

2.2.1 Primäre Zellen

Endothelzellen

Zum Aufbau der 3D Gefäßmodelle wurden primäre Endothelzellen aus humanen Gewebebiopsien nach einem am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin etablierten und standardisierten Protokoll isoliert. Diesem Vorgehen hatten die Patienten/-innen des Universitätsklinikum Würzburg zugestimmt, bevor dort die Gewebeentnahme durchgeführt wurde (Ethikvotum 182/10). Mit der Gewebeprobe wurden bis auf Alter, Geschlecht und Entnahmedatum keine weiteren Daten (zum Beispiel medizinische Befunde oder persönliche Daten) an den Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin übermittelt. Die primären humanen Endothelzellen fanden bis maximal Passage vier Anwendung. Die Endothelzellen, die für die Versuche mit den Antikörperkonstrukten bestimmt waren, wurden vor Einsatz mittels Durchflusszytometrie auf einen positiven HLA-A2-Status überprüft.

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes

Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs, *engl.* peripheral blood mononuclear cells) mit negativem HLA-A2- und positivem Cytomegalievirus-Status wurden von Priv.-Doz. Dr. med. G. Stuhler (Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Würzburg) zur Verfügung gestellt. Sie waren von einem gesunden, freiwilligen Spender am Universitätsklinikum Würzburg gewonnen worden. Bis zu ihrer Verwendung (bis maximal Passage zwei) wurden die PBMCs bei -80°C gelagert. Wenn erforderlich, wurden sie über Nacht in PBMC Medium aufgetaut und anschließend sofort aufgebraucht, da sie in Kultur nicht lange überlebensfähig sind.

2.2.2 Zelllinien

THP-1

Die THP-1 Zellen gehören zum Typ der akuten monozytischen Leukämie und wurden 1978 dem peripheren Blut eines einjährigen Jungen mit AML-M5 entnommen. Sie wachsen in Suspension bei einer Verdopplungszeit von 35 - 40 Stunden [52]. Die Zelllinie stammte von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ).

2.3 Chemikalien

Tabelle 2.2 Chemikalien

| Chemikalien | Hersteller |
|---------------------------------------|--|
| 1,4-Diaza-bicyclo(2,2,2)octan (DABCO) | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) | SouthernBiotech, Birmingham, US |
| Fluoromount-G(R) | |
| 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) | eBioscience, San Diego, US |
| Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat | VWR, Radnor, US |
| Antikörper-Verdünnungspuffer | DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg, DE |
| Bovine Serum Albumin (BSA) | Sigma-Aldrich, St. Louis, US |
| Calcein Red | AAT Bioquest, Sunnyvale, US |
| Camptothecin (CPT), 10-hydroxy | Biomol, Hamburg, DE |

2 Material und Methoden

Tabelle 2.2 Chemikalien (Fortsetzung)

| Chemikalien | Hersteller |
|---|---|
| Chloralhydrat | VWR, Radnor, US |
| Desoxyribonuklease I (DNase I) | Sigma-Aldrich, St. Louis, US |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich, St. Louis, US |
| Entellan | Merck, Darmstadt, DE |
| Eosin | Sigma-Aldrich, St. Louis, US |
| Ethanol (100%) | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| Ethanol vergällt (96%) | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Sigma-Aldrich, St. Louis, US |
| Dinatriumsalz Dihydrat | |
| Fetal calf serum (FCS) | Lonza, Basel, CH |
| Gentamicin (10 mg/mL) | PAA, Cölbe, DE |
| Hämatoxylin | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) | Sigma-Aldrich, St. Louis, US |
| Hoechst Stain 33342 | ImmunoChemistry Technologies, Bloomington, US |
| Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfon- säure (HEPES) Buffer Solution (1 M) | Sigma-Aldrich, St. Louis, US |
| Isopropanol | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| Mowiol 4-88 | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| Natriumchlorid (NaCl) | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃) | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| Natriumhydroxid (NaOH)-Plätzchen | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| Natriumiodat | AppliChem, Darmstadt, DE |
| Paraformaldehyd (PFA) | AppliChem, Darmstadt, DE |
| PBS-Tabletten (5 g) | Invitrogen, Darmstadt, DE |
| Penicillin/Streptomycin (P/S) | PAA, Cölbe, DE |
| Probenecid | AAT Bioquest, Sunnyvale, US |
| Proteinase K | Roche, Basel, CH |
| Reinstwasser | Merck Millipore, Darmstadt, DE |
| Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium Puder | PAA Cölbe, DE |
| Roti-Plast Paraffin | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| Salzsäure (HCl) (37%, 1 M) | VWR, Radnor, US |
| Serum (Esel) | Biozol, Eching, DE |
| Serum (Hase) | abcam, Cambridge, GB |
| Tipifarnib | Selleck chemicals, Houston, US |
| Tris | Carl Roth, Karlsruhe, DE |

2 Material und Methoden

Tabelle 2.2 Chemikalien (Fortsetzung)

| Chemikalien | Hersteller |
|---|---|
| Trizma hydrochloride | Sigma-Aldrich, St. Louis, US |
| Trypan Blue Solution (0,4%) | Sigma-Aldrich, St. Louis, US |
| Trypsin-EDTA (0,5 %) | Invitrogen, Carlsbad, US |
| Tween 20 | Sigma-Aldrich, St. Louis, US |
| VascuLife EnGS Endothelial Cell Culture Medium | Lifeline Cell Technology, Frederick, US |
| Vollentsalztes (VE-) Wasser | Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Würzburg, DE |
| Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) (30%) | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| Xylol | Sigma-Aldrich, St. Louis, US |
| Zitronensäure | VWR, Radnor, US |

2.4 Kits

Tabelle 2.3 Kits

| Kits | Hersteller |
|---|--|
| <i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit, POD: - Enzymlösung (TdT, <i>engl.</i> terminal deoxynucleotidyl transferase) - Markerlösung (fluorescein-dUTP) | Roche, Basel, CH |
| DCS Super Vision 2 HRP (<i>engl.</i> horseradish peroxidase)-Polymer-Kit: - DCS Enhancer Lösung (sekundäre Anti-Maus-/Kaninchen-Ak) - DCS Polymer Lösung (HRP konjugiertes Polymer gegen Maus-/Kaninchen-Ak) - 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Lösung (DAB-Konzentrat, DAB-Substratpuffer) | DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg, DE |

2.5 Antikörper

Tabelle 2.4 Getestete Antikörperkonstrukte im 3D Modell

| Antikörper | Herkunft |
|------------------------------|--|
| Antikörperkonstrukte 1 und 2 | Priv.-Doz. Dr. med. G. Stuhler, Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Würzburg Lagerung bei 4°C |

Nachfolgend sind in Tabelle 2.5 die Antikörper (Ak), welche für die Durchflusszytometrie (FC, *engl.* flow cytometry) und Immunhistochemie (IHC) verwendet wurden, aufgeführt. Der Anti-Annexin V-Antikörper wurde vom Hersteller als explizit zulässig für IHC-Färbungen an Paraffinschnitten deklariert. Annexin V stellt dabei ein calciumabhängiges Phospholipid-bindendes Protein dar. Es bindet vor allem an Phosphatidylserin, welches im Frühstadium der Apoptose eine Translokation auf die Außenseite der Zellmembran erfährt.

Die angegebenen Abkürzungen bezeichnen Folgendes: m = Maus, r = Hase (*engl.* rabbit), d = Esel (*engl.* donkey), IgG = Immunglobulin G, p = polyklonal, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, PE = Phycoerythrin.

Tabelle 2.5 Antikörper für FC und IHC

| Antikörper | Wirt | Verdünnung | Hersteller |
|--------------------------|----------|----------------------|--------------------------------|
| Unkonjugierte Ak: | | | |
| Anti-Annexin V | m (IgG1) | 1:1000 | abcam, Cambridge, GB |
| Anti-CD13 | m (IgG1) | 1:50 | abcam, Cambridge, GB |
| Anti-CD31 | r (p) | 1:50, 1:100 | antibodies-online, Atlanta, US |
| Anti-CD31 | m (IgG1) | 1:50, 1:100 | Dako, Glostrup, DK |
| Anti-CD34 | r (IgG1) | 1:750 | abcam, Cambridge, GB |
| Isotypen: | | Konzentration | |
| IgG1 | m | 100 µg/mL | Dako, Glostrup, DK |
| IgG | r (p) | 2 µg/mL | abcam, Cambridge, GB |
| Konjugierte Ak: | | | |
| Alexa Fluor 488 | d | 1:400 | Invitrogen, Carlsbad, US |
| Anti-m IgG | | | |

2 Material und Methoden

Tabelle 2.5 Antikörper für FC und IHC (Fortsetzung)

| Antikörper | Wirt | Verdünnung | Hersteller |
|-------------------------------|----------|------------|------------------------------|
| Alexa Fluor 555 Anti-m IgG | d | 1:400 | Invitrogen, Carlsbad, US |
| Alexa Fluor 555 Anti-r IgG | d | 1:400 | Invitrogen, Carlsbad, US |
| Alexa Fluor 647 Anti-m IgG | d | 1:400 | Invitrogen, Carlsbad, US |
| pro Röhrchen | | | |
| FITC Anti-CD3 | m (IgG1) | 5 μ L | Beckman Coulter, Brea, US |
| FITC Anti-CD13 | m (IgG1) | 5 μ L | abcam, Cambridge, GB |
| FITC Anti-CD45 | m (IgG1) | 5 μ L | Beckman Coulter, Brea, US |
| PE Anti-CD3 | m (IgG1) | 5 μ L | Beckman Coulter, Brea, US |
| PE Anti-CD13 | m (IgG1) | 5 μ L | Beckman Coulter, Brea, US |
| PE Anti-CD14 | m (IgG1) | 5 μ L | Beckman Coulter, Brea, US |
| PE Anti-CD45 | m (IgG1) | 5 μ L | Beckman Coulter, Brea, US |
| PE Anti-HLA-A2 | m (IgG1) | 5 μ L | BD Pharmingen, San Diego, US |
| Isotypen: pro Röhrchen | | | |
| FITC IgG1 | m | 5 μ L | Beckman Coulter, Brea, US |
| PE IgG1 | m | 5 μ L | Beckman Coulter, Brea, US |

2.6 Lösungen, Puffer und Medien

Tabelle 2.6 Lösungen, Puffer und Medien für die Zellkultur

| Medium/Lösung | Zusammensetzung |
|---------------|---|
| PBMC Medium | 10,41 g RPMI 1640 Medium Puder 2 g NaHCO ₃ 100 mL FCS (10% (v/v)) ad 1 L mit Reinstwasser pH-Wert 7,2 10 mL P/S (1% (v/v)) vor Gebrauch steril filtriert Lagerung bei 4°C |

2 Material und Methoden

Tabelle 2.6 Lösungen, Puffer und Medien für die Zellkultur (Fortsetzung)

| Medium/Lösung | Zusammensetzung | |
|--|-----------------|---|
| THP-1 Medium | 10,41 g | RPMI 1640 Medium Puder |
| | 2 g | NaHCO ₃ |
| | 100 mL | FCS (10% (v/v)) |
| | ad 1 L | mit Reinstwasser |
| | | pH-Wert 7,2 |
| | | vor Gebrauch steril filtriert |
| | | Lagerung bei 4°C |
| VascuLife EnGS Endothelial Cell Culture Medium | 475 mL | VascuLife Basal Medium |
| | | VascuLife EnGS LifeFactors Kit: |
| | 1,0 mL | EnGS LifeFactor (0,2% (v/v)) |
| | 0,5 mL | rh EGF LifeFactor (5 ng/mL) |
| | 0,5 mL | Ascorbic Acid LifeFactor (50 µg/mL) |
| | 25 mL | L-Glutamine LifeFactor (10 mM) |
| | 0,5 mL | Hydrocortisone Hemisuccinate LifeFactor (1 µg/mL) |
| | 0,5 mL | Heparin Sulfate LifeFactor (0,75 U/mL) |
| | 10 mL | FBS LifeFactor (2% (v/v)) |
| | 5 mL | P/S (1% (v/v)) |
| | | Lagerung bei 4°C |
| CPT-Stammlösung (27,4 mM) | 25 mg | CPT |
| | 2,5 mL | DMSO |
| | | vor Gebrauch steril filtriert |
| | | Lagerung in Form von 100 µL Aliquots bei -20°C |
| CPT-Arbeitslösung (5 µM) | 1 µL | CPT-Stammlösung |
| | 5,48 mL | Zellkulturmedium |
| | | vor Gebrauch frisch hergestellt |
| PBS | 5 g | 1 PBS-Tablette |
| | 500 mL | Reinstwasser |
| | | pH-Wert 7,2 |
| | | vor Gebrauch autoklaviert |
| | | Lagerung bei 4°C |
| PBS/EDTA-Lösung | 5 L | PBS |
| | 1 g | EDTA Dinatriumsalz Dihydrat |
| | | pH-Wert 7,2 |
| | | vor Gebrauch autoklaviert |

2 Material und Methoden

Tabelle 2.6 Lösungen, Puffer und Medien für die Zellkultur (Fortsetzung)

| Medium/Lösung | Zusammensetzung | |
|-----------------------------|------------------|--|
| | Lagerung bei 4°C | |
| Tipifarnib-Stammlösung: | 10 mg | Tipifarnib |
| - 200 mM | 100 µL | DMSO |
| | | vor Gebrauch steril filtriert |
| | | Lagerung in Form von 2 µL Aliquots bei -80°C |
| - 20 µM | 1 µL | 200 mM Tipifarnib-Stammlösung in |
| | 999 µL | Zellkulturmedium verdünnt (1:1000) |
| | 30 µL | der 1:1000 Verdünnung in |
| | 270 µL | Zellkulturmedium verdünnt (1:10) |
| | | vor Gebrauch frisch hergestellt |
| Tipifarnib-Arbeitslösung: | | |
| - 10 nM (5 ng/mL) | 0,5 µL | 20 µM Tipifarnib-Stammlösung in |
| | 999,5 µL | Zellkulturmedium verdünnt |
| - 50 nM (24 ng/mL) | 2,5 µL | 20 µM Tipifarnib-Stammlösung in |
| | 997,5 µL | Zellkulturmedium verdünnt |
| - 100 nM (49 ng/mL) | 5 µL | 20 µM Tipifarnib-Stammlösung in |
| | 995 µL | Zellkulturmedium verdünnt |
| - 500 nM (245 ng/mL) | 25 µL | 20 µM Tipifarnib-Stammlösung in |
| | 975 µL | Zellkulturmedium verdünnt |
| - 1000 nM (489 ng/mL) | 50 µL | 20 µM Tipifarnib-Stammlösung in |
| | 950 µL | Zellkulturmedium verdünnt |
| Kontrolllösung: | Statt 1 µL | 200 nM Tipifarnib-Stammlösung, Verwendung |
| | von 1 µL | DMSO initial. Verdünnung nach obigem Schema |
| Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%) | 10 mL | 0,5%ige Trypsin/EDTA-Lösung |
| | 90 mL | PBS/EDTA-Lösung |
| | | Lagerung bei 4°C |

Tabelle 2.7 Lösungen und Puffer für die FC

| Lösung | Zusammensetzung | |
|-----------|-----------------|---|
| FC-Puffer | PBS | |
| | 0,5% (m/v) | BSA |
| | | vor Gebrauch steril filtriert, Lagerung bei 4°C |

2 Material und Methoden

Tabelle 2.8 Lösungen und Puffer für die Histologie und IHC

| Lösung | Zusammensetzung | |
|---|--------------------------------|--|
| 1 M NaOH | 40 g ad 1 L | NaOH-Plätzchen mit Reinstwasser Lagerung bei Raumtemperatur |
| 1 M Tris-HCl | 121,14 g ad 1 L | Tris mit Reinstwasser pH-Wert mit 37% HCl auf 7,5 eingestellt Lagerung bei Raumtemperatur |
| 0,5 M Tris-gepufferte Saline (TBS, <i>engl.</i> tris buffered saline) | 78,8 g 87,66 g ad 1 L | Trizma hydrochloride NaCl mit Reinstwasser pH-Wert 7,6 vor Gebrauch autoklaviert Lagerung bei 4°C |
| 0,05 M TBS mit 0,5% (v/v) Tween (TBST) | 100 mL 5 mL ad 1 L | 0,5 M TBS Tween 20 mit VE-Wasser Lagerung bei 4°C |
| Antikörper-Verdünnungs- lösung | 5% (w/v) | BSA in PBS vor Gebrauch steril filtriert Lagerung bei 4°C |
| Blockierlösung für Antikörperfärbungen | 5% (v/v) | Normalserum (Esel) in Antikörper-Verdünnungslösung vor Gebrauch frisch hergestellt |
| Blockierlösung für TUNEL (<i>engl.</i> TdT-mediated dUTP-X nick end labeling) Assay | 0,1 M 20% (v/v) 3% (w/v) | Tris-HCl, pH-Wert 7,5 FCS BSA vor Gebrauch steril filtriert Lagerung bei 4°C |
| Calcein Red-Stamm- lösung (5 mM) | 1 mg 400 µL | Calcein Red DMSO Lagerung in Form von 10 µL Aliquots bei -20°C |
| Calcein Red-Arbeits- | 1 µL | Calcein Red-Stammlösung in |

2 Material und Methoden

Tabelle 2.8 Lösungen und Puffer für die Histologie und IHC (Fortsetzung)

| Lösung | | Zusammensetzung |
|--|---|---|
| lösung (10 μ M) | 500 μ L | HHBS mit 2,5 mM Probenecid verdünnt vor Gebrauch frisch hergestellt |
| Citratpuffer- Stammlösung (10x konzentriert) | 42 g/L 17,6 g/L | Zitronensäure NaOH-Plätzchen in VE-Wasser gelöst pH-Wert 6,0 Lagerung bei 4°C |
| Citratpuffer- Arbeitslösung | 10% (v/v) | Citratpuffer-Stammlösung in VE-Wasser gelöst Lagerung bei 4°C |
| DNase I-Lösung | 3000 U/mL | DNase I in DNase-Puffer gelöst vor Gebrauch frisch hergestellt |
| DNase-Puffer für TUNEL Assay | 50 mM 1 mg/mL | Tris-HCl, pH-Wert 7,5 BSA vor Gebrauch steril filtriert Lagerung bei 4°C |
| Eosin-Lösung | 10 mg/mL | Eosin in VE-Wasser gelöst Lagerung bei Raumtemperatur |
| H ₂ O ₂ (3%) | 10% (v/v) | H ₂ O ₂ (30%) in VE-Wasser vor Gebrauch frisch hergestellt |
| Hämalaun nach Mayer | 20 g/L 20 g/L 1,2 g/L 0,2 g/L 1 g/L | Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat Chloralhydrat Hämatoxylin Natriumiodat Zitronensäure gelöst in VE-Wasser Gebrauch nach vierwöchiger Reifung Lagerung bei Raumtemperatur |
| HCl/Ethanol-Lösung | 6,85% (v/v) | 1 M HCl in Ethanol (50% (v/v)) |

2 Material und Methoden

Tabelle 2.8 Lösungen und Puffer für die Histologie und IHC (Fortsetzung)

| Lösung | Zusammensetzung | |
|--|-----------------------------------|---|
| | Lagerung bei Raumtemperatur | |
| HBSS mit 20 mM HEPES-Puffer (HHBS) und 2,5 mM Probenecid | 1 mL 49 mL 0,5 mL 4,5 mL | 1 M HEPES-Puffer in HBSS verdünnt 25 mM Probenecid-Stammlösung in HHBS verdünnt vor Gebrauch frisch hergestellt |
| Hoechst-Reagenz | 2 μ L 398 μ L | Hoechst Stain 33342 HHBS vor Gebrauch frisch hergestellt |
| PFA (4%) | 40 g/L | PFA in PBS bei 60°C gelöst pH-Wert 7,4 Lagerung bei Raumtemperatur |
| Probenecid-Stammlösung (25 mM) | 72 mg 0,3 mL 9,7 mL | Probenecid 1 M NaOH HHBS Lagerung in Form von 1 mL Aliquots bei -20°C |
| TUNEL-Reagenz | 1:50 | Enzymlösung (TdT) in Markerlösung (fluorescein-dUTP) verdünnt vor Gebrauch frisch hergestellt |

2.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.9 Verbrauchsmaterialien

| Verbrauchsmaterialien | Hersteller |
|------------------------|---------------------------------------|
| Alufolie | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| BD Microlance 3 (20 G) | Becton Dickinson, Frankling Lakes, US |
| Dako Pen | Dako, Glostrup, DK |
| Deckgläser (24x 60 mm) | Menzel-Gläser, Braunschweig, DE |
| Einbettfilterpapier | Labonord, Mönchengladbach, DE |
| Einbettkassetten | Klinipath, Duiven, NL |

Tabelle 2.9 Verbrauchsmaterialien (Fortsetzung)

| Verbrauchsmaterialien | Hersteller |
|---|---|
| Einmalpipetten (5, 10, 25, 50 mL) | Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT |
| Filterpapier | Hartenstein, Würzburg, DE |
| Flow Cytometry Tube | Sarstedt, Nümbrecht, DE |
| Glass Chamber Slide System (4-, 8-well) | Thermo Fisher Scientific, Waltham, US |
| Kryoröhrchen (1,8 mL) | Thermo Fisher Scientific, Waltham, US |
| Mikrotomklingen A35 | pfm medical, Köln, DE |
| Nitril-Handschuhe | Kimberly-Clark, Dallas, US |
| Objektträger: | |
| - unbeschichtet (26x 76x 1 mm) | Menzel-Gläser, Braunschweig, DE |
| - Polysine (25x 75x 1 mm) | Langenbrinck, Emmendingen, DE |
| Parafilm M | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| Pasteurpipetten | Brand, Wertheim, DE |
| Petrischalen (94x 16, 145x 20 mm) | Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT |
| Pipettenspitzen (0,5 - 1000 μ L) | Eppendorf, Hamburg, DE |
| Reagiergefäße (0,5, 1,5, 2 mL) | Sarstedt, Nümbrecht, DE |
| Skalpellklingen | Bayha, Tuttlingen, DE |
| Sterilfilter | Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE |
| Zellkulturflaschen (25, 75, 150 cm ²) | TPP, Trasadingen, CH |
| Zellkulturtestplatten (6-, 12-well) | TPP, Trasadingen, CH |
| Zentrifugenröhrchen (15, 50 mL) | Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT |

2.8 Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 2.10 Geräte

| Geräte | Hersteller |
|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Absaugsystem Vacusafe mit Vacuboy | Integra Biosciences, Zizers, CH |
| Autoklaven: | |
| - Tecnoclav | Biomedis, Gießen, DE |
| - Tischautoklav DX-45 | Systec, Wettenberg, DE |
| - Varioclav | H+P Labortechnik, Oberschleißheim, DE |
| BD FACSCalibur | BD Biosciences, San Jose, US |
| Blockstation | Leica, Wetzlar, DE |
| CO ₂ -Inkubator BBD 6220 | Heraeus, Hanau, DE |

2 Material und Methoden

Tabelle 2.10 Geräte (Fortsetzung)

| Geräte | Hersteller |
|---|---|
| Count-down-Timer | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| Dampfgarer MultiGourmet | Braun, Kronberg im Taunus, DE |
| Einbettautomat Microm STP 120 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, US |
| Einhängethermostat Alpha | Lauda Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen, DE |
| Eismaschine AF-80 | Scotsman, Vernon Hills, US |
| Eppendorfpipetten (0,5 - 1000 μ L) | Eppendorf, Hamburg, DE |
| Freezing Container Mr. Frosty | VWR, Radnor, US |
| Gefrierschränke: | |
| - 20°C | Liebherr, Biberach an der Riß, DE |
| - 80°C | Kendro, Newtown, US |
| Heißluftsterilisator | Memmert, Schwabach, DE |
| Kühlplatte EG1150C | Leica, Wetzlar, DE |
| Kühlraum | Genheimer, Höchberg, DE |
| Laborabzug | Prutscher Laboratory Systems, Neudörfel, AT |
| Magnetrührer mit Heizung 720-HPS | VWR, Radnor, US |
| Mikroskope: | |
| - Axio Lab.A1 | Carl Zeiss, Feldbach, CH |
| - Axiovert 40 C | Carl Zeiss, Feldbach, CH |
| - Fluoreszenz-Mikroskop BZ-9000 | Keyence, Neu-Isenburg, DE |
| - Konfokalmikroskop SP5 | Leica, Wetzlar, DE |
| Paraffinstreckbad | Medax, Neumünster, DE |
| pH-Meter FE20 - FiveEasy | Mettler Toledo, Gießen, DE |
| Pipettierhilfe Pipetboy | Brand, Wertheim, DE |
| Schlittenmikrotom SM2010 R | Leica, Wetzlar, DE |
| Septophag | Hesse, Emmerich, DE |
| Sicherheitswerkbank Safe 2020 | Thermo Fisher Scientific, Waltham, US |
| Stickstoffbehälter MVE 815 P-190 (-180°C) | german-cryo, Jüchen, DE |
| Tissue Drying Oven TDO 66 | Medite, Orlando, US |
| Universalwärmeschrank | Memmert, Schwabach, DE |
| Vortex Genie 2G-560E | Scientific Industries, New York, US |
| Waagen: | |
| - Analysenwaage ABJ 220-4M | Kern & Sohn, Balingen-Frommern, DE |
| - Präzisionswaage PFB 1200-2 | Kern & Sohn, Balingen-Frommern, DE |
| Wasseraufbereitungssystem Milli-Q Advantage | Merck Millipore, Darmstadt, DE |
| Wippschüttler DRS-12 | neoLab Migge, Heidelberg, DE |

2 Material und Methoden

Tabelle 2.10 Geräte (Fortsetzung)

| Geräte | Hersteller |
|-------------------------|---------------------------------------|
| Zentrifugen: | |
| - Microcentrifuge | Eppendorf, Hamburg, DE |
| - Mini-Zentrifuge | Carl Roth, Karlsruhe, DE |
| - Multifuge X1R | Thermo Fisher Scientific, Waltham, US |
| - Pico Mikrozentrifugen | Thermo Fisher Scientific, Waltham, US |

Tabelle 2.11 Hilfsmittel

| Hilfsmittel | Hersteller |
|--------------------------------------|---|
| Bechergläser und Laborflaschen | Schott, Mainz, DE |
| Färbekasten und -einsätze | Hartenstein, Würzburg, DE |
| Feuchtekkammer | Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Würzburg, DE |
| Glaspipetten (1 - 50 mL) | Brand, Wertheim, DE |
| Handzähler | neoLab Migge, Heidelberg, DE |
| Magnetührstäbchen und -stabentferner | Hartenstein, Würzburg, DE |
| Messzylinder | Brand, Wertheim, DE |
| Neubauer Zählkammer | Hartenstein, Würzburg, DE |
| Pinzetten | VWR, Radnor, US |
| Skalpellklingenthalter | Bayha, Tuttlingen, DE |
| Trichter | Hartenstein, Würzburg, DE |
| Wasserbad | Lauda Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen, DE |
| Zellkronen | Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Würzburg, DE |

2.9 Software

Tabelle 2.12 Software

| Software | Hersteller |
|--|--------------------------|
| AxioVision Rel. 4.8 | Carl Zeiss, Feldbach, CH |
| ChemBioDraw Ultra, Versionen 12.0 und 14.0 | PerkinElmer, Waltham, US |
| FlowJo X, Version 6.0 | FlowJo, Ashland, US |

Tabelle 2.12 Software (Fortsetzung)

| Software | Hersteller |
|---------------------------------|-------------------------------|
| GIMP 2.8.2 | GIMP-Team |
| IBM SPSS Statistics, Version 21 | IBM, Armonk, US |
| SigmaPlot, Version 10.0 | Systat Software, San Jose, US |

2.10 Allgemeine Zellkultur

Die Arbeit in der Zellkultur fand unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank der Klasse II unter Laminafluss statt. Vor und nach Gebrauch der Sicherheitswerkbank erfolgte eine Oberflächenwischdesinfektion mit einer Ethanollösung. Mehrfach verwendete Labormaterialien wurden je nach Materialeigenschaft vor Gebrauch dampf- oder heißluftsterilisiert. Chemikalien und Lösungen wurden sterilfiltriert oder autoklaviert.

2.10.1 Zellkultivierung

Die Zellen wurden in 25 cm², 75 cm² oder 150 cm² Zellkulturflaschen mit Zusatz von je 3 ml, 9 ml beziehungsweise 20 ml Medium bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Ein zellspezifischer Mediumwechsel wurde in zwei- bis dreitägigen Abständen durchgeführt, möglichst ohne Ergänzung von Antibiotika. Dabei erhielten die humanen Endothelzellen VascuLife Medium und die THP-1 Zellen das in dieser Arbeit nach ihnen benannte Medium. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Medien ist Tabelle 2.6 zu entnehmen. Um die Zellmorphologie und das Wachstum zu kontrollieren sowie mögliche Kontaminationen auszuschließen, fand eine tägliche lichtmikroskopische Kontrolle statt.

2.10.2 Zellpassage

Bei den Endothelzellen war eine Zellpassage indiziert, wenn eine Konfluenz von 70 - 80% bestand. Dazu mussten die adhärent wachsenden Zellen zunächst von ihrem

Untergrund abgelöst werden. Als Erstes wurde das alte Zellkulturmedium mittels Pasteurpipette abgesaugt und der Zellrasen mit 37°C warmer PBS/EDTA-Lösung gespült. Anschließend wurde mit 5 ml (bei Verwendung einer 75 cm² Zellkulturflasche) derselben Lösung für circa 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Sobald die Endothelzellen begannen, sich in dieser Zeit lichtmikroskopisch abzukugeln, wurden 5 ml der ebenfalls 37°C warmen Trypsin/EDTA-Lösung hinzupipettiert. Der enzymatische Ablösevorgang wurde optisch kontrolliert und spätestens nach dreiminütiger Inkubation im Brutschrank mittels 1 ml FCS (37°C) abgestoppt. Nach mechanischem Suspendieren wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 1200 rpm (*engl.* revolutions per minute) zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das verbleibende Pellet in einem definierten Volumen frischen Mediums resuspendiert. War eine Zellzählung gewünscht, konnte diese anhand eines davon entnommenen Aliquots durchgeführt werden (Abschnitt 2.10.4). Zuletzt erfolgte das Aussäen einer definierten Zellkonzentration in eine neue Zellkulturflasche mit frisch vorgelegtem zellspezifischen Kulturmedium.

Die Subkultivierung der Leukämiezelllinie fand circa alle drei Tage statt beziehungsweise sobald eine Dichte von 1×10^6 Zellen/ml erreicht war. Da sich die Zellen bereits in Suspension befanden, konnten sie ohne enzymatische Ablösung direkt in ein Zentrifugenröhrchen überführt werden. Das weitere Vorgehen war identisch mit dem adhärenter Zellen. Die Aufspaltung in eine neue Zellkulturflasche erfolgte im Verhältnis 1:2 oder 1:3.

2.10.3 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Wird vorhandenes Zellmaterial gerade nicht benötigt, bedient man sich der Kryokonservierung zur Langzeitlagerung. Hierzu wurde nach Bestimmung der Zellzahl (Abschnitt 2.10.4) eine Dichte von 1×10^6 Endothelzellen/ml beziehungsweise 5×10^6 THP-1 Zellen/ml eingestellt. Die Kryoröhrchen wurden mit je 1 ml der gewünschten Zellsuspension befüllt und nach Zugabe von jeweils 100 μ l FCS und DMSO als penetrierendes Gefrierschutzmittel sorgfältig verschlossen. Das fertige Einfriermedium bestand anteilig aus 70% zellspezifischem Kulturmedium, 20% FCS und 10% DMSO. Unmittelbar danach schloss sich die Einsortierung der Kryoröhrchen in die Einfrierhilfe Mr. Frosty an, welche zügig in den -80°C Gefrierschrank gestellt wurde.

Nach weiteren 24 Stunden folgte die Überführung der eingefrorenen Kryoröhrchen in den Flüssigstickstofftank (-180°C).

Zur Rekultivierung der Zellen wurden 9 ml des zellspezifischen und 37°C warmen Mediums in einem Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Das eingefrorene Zellmaterial wurde mit Kälteschutzhandschuhen aus dem Stickstofftank entnommen und zügig im Wasserbad bei 37°C unter Schwenken aufgetaut, bis nur noch sehr kleine Eisklumpchen erkennbar waren. Nach dem Überführen der Zellsuspension in das vorgelegte Medium im Zentrifugenröhrchen folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 1200 rpm. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet in frischen und vorgewärmten Medium resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche ausgesät.

2.10.4 Zellzählung

Die Zellzahl wurde lichtmikroskopisch mit einem 10er-Objektiv unter Zuhilfenahme einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können, fand zusätzlich eine Viabilitätsfärbung mit Trypanblau Anwendung. Trypanblau kann sich intrazellulär nur in jenen Zellen anreichern, deren Zellmembran geschädigt und folglich permeabel für das relativ große Molekül (960,8 g/mol) ist [53]. Tote beziehungsweise geschädigte Zellen erscheinen daher dunkelblau und lebende ungefärbt. Für die Trypanblau-Färbung wurden 20 μ l der auszuzählenden Zellsuspension mit 20 μ l Trypanblau-Lösung vermischt (Verdünnungsfaktor 2). Anschließend wurde die Zell-/Farbsuspension in die Zählkammer pipettiert, sodass diese vollständig befüllt war. Die hellen, ungefärbten Zellen in den vier großen Quadranten wurden unter Missachtung von zwei der jeweils vier randbildenen Linien ausgezählt (Abbildung 2.2). Aus der ermittelten Lebendzellzahl für die vier Quadranten wurde der Mittelwert Z für einen Quadranten gebildet. Die Gesamtzellzahl der Zellsuspension errechnete sich mithilfe folgender Formel [53]:

$$Z \times VF \times \text{Volumen}_{Zellsuspension} \times KF = \text{Zellzahl im Gesamtvolumen}$$

Z = Mittelwert der Lebendzellzahl für einen Quadranten, VF = Verdünnungsfaktor, KF = Kammerfaktor = 10^4 für eine Neubauer Zählkammer

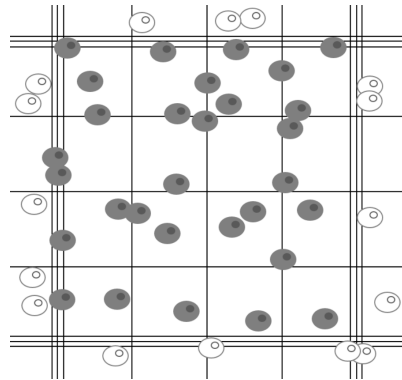


Abbildung 2.2 Ausschnitt des Zählfeldes einer Neubauer Zählkammer. Dargestellt ist ein Quadrant, der in jeweils 16 kleine Quadrate unterteilt ist. Wie abgebildet, werden nur die hier grau markierten und viablen Zellen unter Missachtung von zwei der vier Randlinien des Quadranten gezählt.

2.11 Aufbau des 2D *in vitro* Modells

Bevor der Aufbau eines komplexen 3D *in vitro* Blutgefäß-/Gewebemodells erfolgen konnte, mussten die optimalen Versuchsbedingungen für eine Kokultur unterschiedlicher Zellen ermittelt werden. Ferner war die erwünschte Wirkung der zu testenden Therapeutika prinzipiell nachzuweisen, wobei die Einflussvariablen (wie zum Beispiel (Wirkstoff-)Konzentration und Inkubationsdauer) sinnvoll definiert werden sollten. Aus Praktikabilitätsgründen wurde dafür zunächst ein 2D Modell herangezogen.

Das 2D Modell beschränkte sich bezüglich des Zellmaterials auf die THP-1 Zellen und eventuell die PBMCs als Effektorzellen bei den Antikörperversuchen. Diese wurden als Monozellkultur jeweils in RPMI Medium kultiviert. Die spätere Kokultivierung humaner Endothelzellen mit THP-1 Zellen im 3D Modell machte die Auswahl eines geeigneten gemeinsamen Mediums erforderlich. Da sich THP-1 Zellen im Vergleich zu Endothelzellen in der Zellkultur als unempfindlicher erwiesen, wurde primär die Kompatibilität dieser mit dem Endothelzellmedium VascuLife getestet. Pro Versuchsansatz wurden 2×10^5 THP-1 Zellen ausgezählt. Diese wurden nach Abzentrifugation (1200 rpm für 5 Minuten) des alten Mediums in einem definierten Volumen neuen Mediums gegebenenfalls versetzt mit Tipifarnib beziehungsweise Antikörperkonstrukt(en) und 2×10^5 PBMCs in einer 12-well Zellkulturtestplatte resuspendiert (Abbildung 2.3).

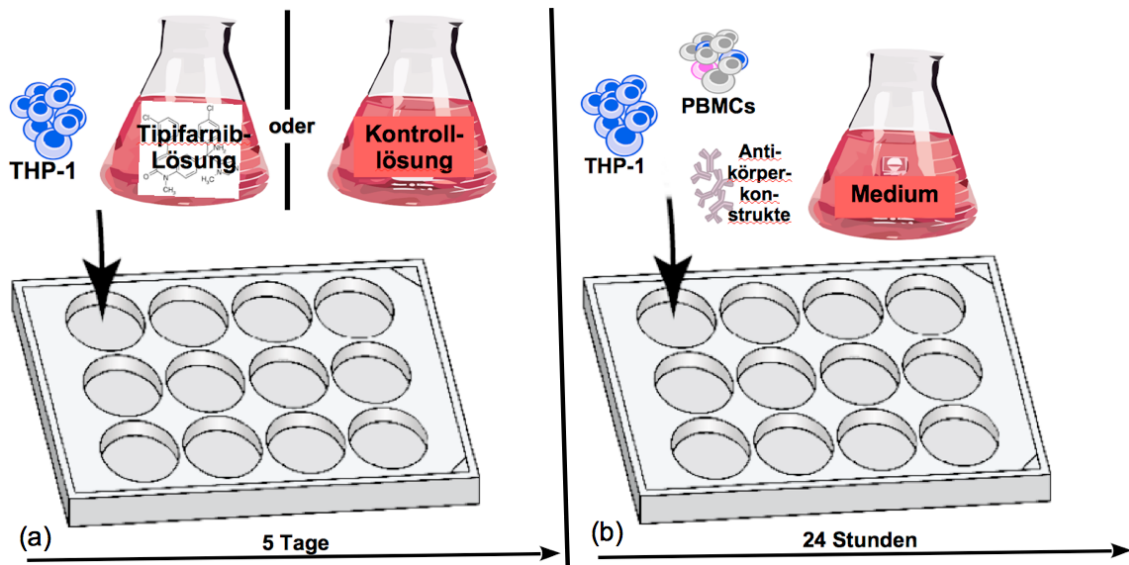


Abbildung 2.3 Darstellung des Aufbaus der 2D Modelle für die Versuche mit Tipifarnib (a) und Antikörperkonstrukten (b)

Um eine zu hohe oder niedrige Zellkonzentration im Endvolumen und damit eine Wachstumsbeeinträchtigung zu vermeiden, war eine Ermittlung des möglichen Gesamtvolumens nötig. Dazu wurden verschiedene Endvolumina eingestellt und die Zellen lichtmikroskopisch analysiert. Für die Versuche mit Tipifarnib erwies sich ein Gesamtvolumen von $1000 \mu\text{l}$ und für die Antikörperversuche eines von $600 \mu\text{l}$ als praktikabel.

Damit Therapeutika einen Effekt auf Zielzellen haben können, müssen sie in wirksamen Konzentrationen eingesetzt werden. Unter Berücksichtigung von Anhaltswerten aus publizierten *in vitro* und *in vivo* Versuchen [37, 38, 39, 41, 54] wurde Tipifarnib in den Stoffmengenkonzentrationen von 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM und 1000 nM ausgetestet. Die Herstellung der verschiedenen Tipifarnib-Arbeitslösungen erfolgte wie in Tabelle 2.6 angegeben. Da das unlösliche Tipifarnib-Pulver initial in DMSO gelöst werden musste, welches hoch konzentriert ebenfalls zytotoxisch ist, wurde den Medien für die Kontrollversuche DMSO in entsprechenden Konzentrationen zugesetzt (Herstellung der Kontrolllösungen nach Tabelle 2.6). Für die Inkubation der THP-1 Zellen mit unterschiedlich konzentrierten Tipifarnib-/Kontrolllösungen wurde eine Dauer von fünf Tagen, mit Medienwechsel am dritten

Tag, als sinnvoll erachtet. Für die Versuche mit den Antikörperkonstrukten empfahl Priv.-Doz. Dr. med. G. Stuhler eine Einsatzkonzentration von 30 nM je Hemibody und eine Inkubationsdauer von 6 - 24 Stunden.

Anhand des 2D Modells sollte die Etablierung des Verfahrens für den Apoptosenachweis in den nicht adhärenen THP-1 Zellen mittels Durchflusszytometrie vorgenommen werden. Da hierbei (wie in Kapitel 2.13 genauer erläutert) 7-AAD als später Apoptosemarker Anwendung fand, war von der Apoptoseinduktion bis zu ihrer Messung ein Zeitintervall von circa 12 Stunden zu beachten. Um folglich zu vermeiden, dass eine mögliche Apoptose unerkant blieb, wurde für die Versuche mit den T-Zell-rekrutierenden bimolekularen Antikörpern eine Inkubationszeit von 24 Stunden gewählt.

2.12 Aufbau des 3D *in vitro* Modells

Nach Etablierung des 2D Modells konnte der Ausbau zum 3D Modell vorgenommen werden. Dazu sollte die Kultivierung der Suspensionszellen künftig auf einem humanen Endothelzellmonolayer erfolgen, der auf der Kollagenmatrix eines dezellularen porzinen Jejunumsegments wuchs.

2.12.1 Optimierung und Besiedlung der Matrix

Die Beschaffenheit der Matrix ist von entscheidender Bedeutung für die 3D Mikroumgebung der humanen primären Endothelzellen und trägt wesentlich zur Ausbildung eines konfluenten Endothelzellmonolayers bei. Um die optimale Matrix für das Gefäß-/Gewebe Modell zu ermitteln, wurden verschiedene Unterformen der SIS erprobt.

Damit eine Besiedlung der verwendeten Matrices mit Zellen möglich war, mussten die Trägerstrukturen stets in flach ausgebreitetem Zustand verbleiben. Dies wurde durch Einspannen der Matrices in Zellkronen realisiert. Hierzu wurden die verschiedenen Matrices in einer 145x 20 mm großen Petrischale ausgelegt (Abbildung 2.4 A). Der einzelne Darmmatrixschlauch wurde mit dem Skalpell durch Abtrennung eines 1 - 2 mm schmalen Randstreifens eröffnet (Abbildung 2.4 B und C). Anschließend wurde die Matrix aufgeklappt (Abbildung 2.4 D).

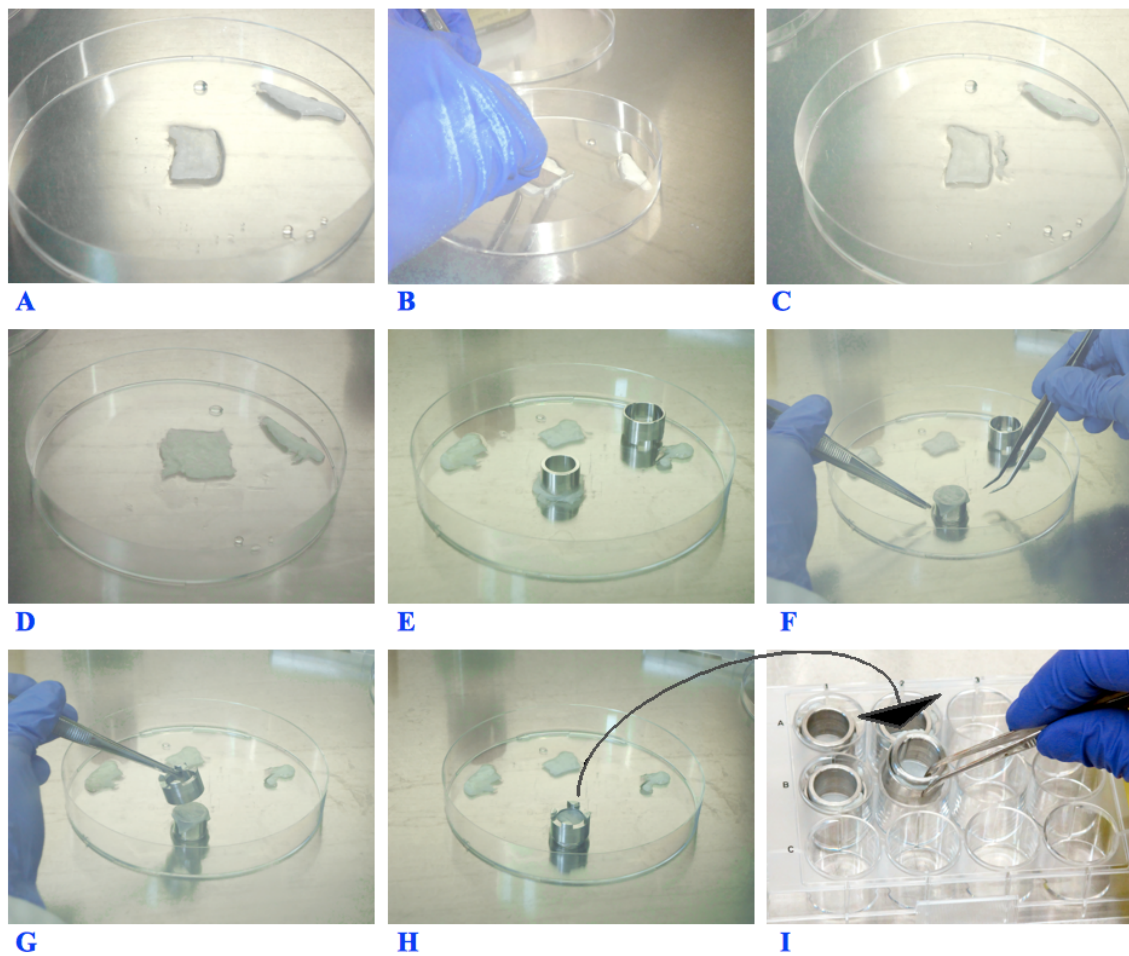


Abbildung 2.4 Einspannen der Matrix in die Zellkronen. A: Ausgebreiteter Matrixschlauch. B-C: Eröffnung des Darmschlauches mittels Randschnitt. D: Aufgeklappte Matrix. E: Zurechtschneiden der Matrix. F: Mit Matrix bezogener Innenring. G-H: Fixierung der Matrix zwischen den beiden Ringen der Zellkrone. I: Umdrehen und Platzieren der Zellkrone in einer 12-well Zellkulturtestplatte

Bei der SIS-Ser zeigte nun die Serosaseite nach oben. Die Matrix wurde mittels Skalpell zu Quadraten zugeschnitten, die so groß waren, dass sie den Durchmesser der Zellkronen gerade überragten (Abbildung 2.4 E). Der Innenring der zuvor autoklavierten Zellkronen wurde wie folgt mit Matrix bezogen (Abbildung 2.4 F):

Für die Besiedlung der

- Serosa der SIS-Ser wurde der Innenring umgekehrt mit Matrix bezogen, sodass die Serosaseite anschließend nach unten in das Innere des Innenrings zeigte (Abbildung

2.5 (a)).

- ehemaligen Mukosaseite der SIS-Ser wurde der Innenring nach Entfernung der Serosa gleichsinnig mit Matrix bezogen, sodass die ehemalige Mukosaseite anschließend nach unten in das Innere des Innenrings zeigte (Abbildung 2.5 (b)).
- ehemaligen Serosaseite der SIS-Ser wurde der Innenring nach Entfernung der Serosa umgekehrt mit Matrix bezogen, sodass die ehemalige Serosaseite anschließend nach unten in das Innere des Innenrings zeigte (ähnlich Abbildung 2.5 (a)).

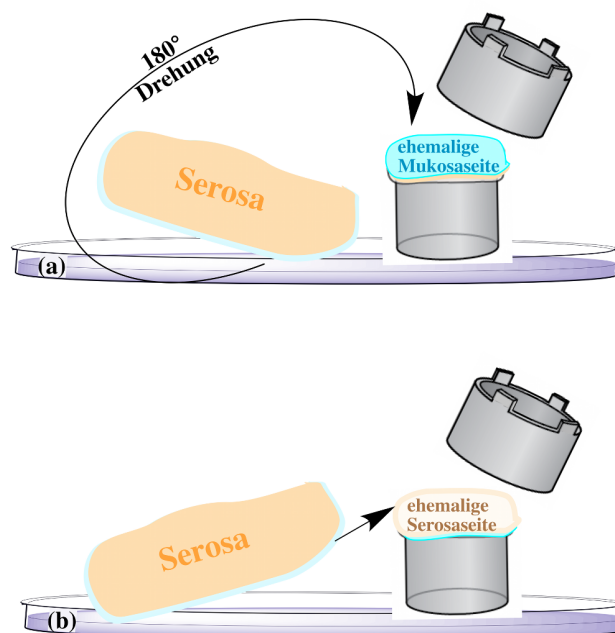


Abbildung 2.5 Handhabung der SIS-Ser bei Bezug des Innenrings der Zellkrone. Zur Besiedlung der (ehemaligen) Serosa mit Zellen musste der Innenring der Zellkrone mit einer um 180° gedrehten SIS-Ser bezogen werden (a). Sollte die ehemalige Mukosaseite der SIS-Ser besiedelt werden, musste der Innenring gleichsinnig mit Matrix bezogen werden (b).

Die Matrix wurde abschließend zwischen den beiden Ringen der Zellkrone fixiert, indem der Außenring über den Innenring gestülpt wurde (Abbildung 2.4 G und H). Die Zellkrone wurde umgedreht und in eine 12-well Zellkulturtestplatte gesetzt (Abbildung 2.4 I). Kleine „Füßchen“ auf der Außenringunterseite der Zellkrone (siehe Abbildung 2.4 H) sollten dabei ein Aufsitzen der Matrix am Boden der Zellkulturplatte verhindern.

Die mit Matrix bezogenen Zellkronen wurden innen mit 1 ml und außen mit 5 ml VasuLife Medium befüllt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt. Die Inkubation der Matrix mit Zellmedium diente der Matrixdurchtränkung, sodass die Zellen bei Besiedlung verbesserte Kulturbedingungen vorfanden.

Zur Besiedlung der Matrix mit Zellen wurden pro Versuchsansatz 2×10^5 Endothelzellen abgezählt und in einem Gesamtvolumen von 100 μl VasuLife in einem 0,5 mL Reagiergefäß resuspendiert. Bei den Antikörperversuchen wurden des Weiteren nur Endothelzellen mit zuvor durchflusszytometrisch bestätigtem positiven HLA-A2-Status verwendet. Danach wurden die am Vortag eingespannten und mit Medium durchtränkten Matrices aus dem Brutschrank entnommen. Das alte Medium wurde mit einer Pasteurpipette vorsichtig entfernt. Anschließend erfolgte die Überschichtung der Matrix mit jeweils 100 μl Endothelzellsuspension, welche vorsichtig innen auf die Matrix pipettiert wurde. Die Zellen erhielten zusätzlich sofort 5 ml VasuLife Medium von außen, während innen (in das Innere der Zellkrone) erst drei Stunden später 900 μl VasuLife hinzugegeben wurden. Auf diese Weise konnte eine bessere Adhärenz der Endothelzellen auf der Matrix erwirkt und ein Abspülen verhindert werden. Zugleich war eine Zellversorgung mit Medium von außen und unten via Diffusion sicher gestellt. Die Endothelzellen wurden 14 Tage lang in Kultur gehalten, wobei an jedem zweiten bis dritten Tag ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt wurde. Erwartungsgemäß war am Ende dieser Inkubationsdauer ein konfluenter Endothelzellmonolayer ausgebildet und das Gefäßmodell konnte zum Gewebemodell mit Leukämiezellen erweitert werden. An diesem sollten präklinisch verschiedene Therapeutika zur Leukämiebehandlung getestet werden.

2.12.2 Statische Kokultur im 3D Modell

Nach 14-tägiger Zellkultur wurde das Medium der auf der Matrix wachsenden Endothelzellen mittels Pasteurpipette komplett abgesaugt. In Analogie zu den 2D Modellen wurden pro Versuchsansatz 2×10^5 THP-1 Zellen ausgezählt und nach Abzentrifugation (1200 rpm für 5 Minuten) des alten Mediums in einem definierten Volumen VasuLife resuspendiert. Für die Versuche mit dem Farnesyltransferase-Inhibitor wurde das Medium mit 50 nM und 500 nM Tipifarnib beziehungsweise der entsprechenden DMSO-Konzentration als Kontrolle versetzt (Herstellung der

Arbeitslösungen nach Tabelle 2.6), sodass sich ein Gesamtvolumen von 1000 μl ergab. Anschließend wurde die THP-1 Zellsuspension beziehungsweise, im Rahmen der Kontrollansätze, auch nur das Vasculife Medium mit und ohne Tipifarnib/DMSO in das Innere der Zellkrone auf den Endothelzellmonolayer pipettiert (Abbildung 2.6).

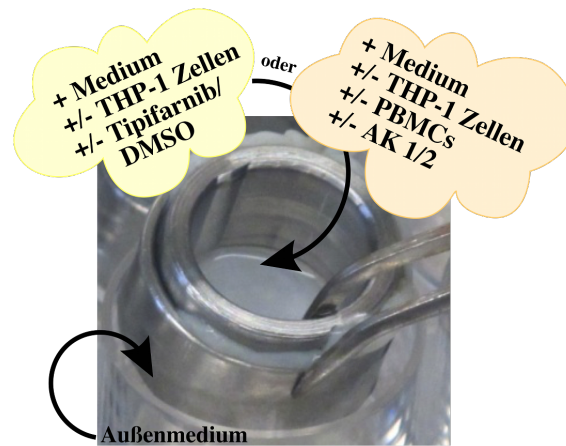


Abbildung 2.6 Darstellung des Aufbaus der 3D Modelle für die Versuche mit Tipifarnib (gelbe Textblase) oder mit Antikörperkonstrukten (AK) (orange Textblase)

Zur Durchführung der Versuche mit Antikörperkonstrukten wurden zu den THP-1 Zellen im Inneren der Zellkrone noch 2×10^5 in Vasculife resuspendierte PBMCs hinzugegeben. Je nach Versuchsansatz wurde kein, ein oder beide Antikörperkonstrukt(e) (Konzentration pro Konstrukt 30 nM) hinzupipettiert, sodass sich ein Gesamtinnenvolumen von 600 μl pro Zellkrone ergab. Als Außenmedium fungierte bei beiden Testsubstanzen das dem jeweiligen Versuchsansatz entsprechende zellfreie Innenmedium. Dieses wurde ebenfalls zugefügt, sodass das Gesamtaußenvolumen für die Versuche mit Tipifarnib jeweils 1000 μl beziehungsweise für die Antikörperkonstrukte 600 μl betrug. Die Inkubationsdauer für die Antikörperkonstrukte belief sich auf 24 Stunden, während die Tipifarnib-Behandlung über fünf Tage, mit Mediumwechsel am dritten Tag, durchgeführt wurde.

2.13 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit zur quantitativen Charakterisierung inklusive Immunphänotypisierung (HLA-A2-, CD3-, CD13-, CD14- und CD45-Status) von Zellen, zum Apoptosenachweis in Suspensionszellen und untergeordnet zur simultanen automatisierten Zellzahlbestimmung eingesetzt. Synonym wird diese Methode auch als fluorescence activated cell sorting (FACS, *engl.*) bezeichnet, was jedoch oft inkorrekt ist. Zum einen handelt es sich dabei um eine geschützte Handelsmarke der Firma Becton Dickinson (BD) [55] und zum anderen sollten nur jene Methoden so benannt werden, bei denen nach der Messung tatsächlich eine Zelltrennung anhand einer bestimmten Fluoreszenz im elektrischen Feld erfolgt. Da in dieser Arbeit zwar ein BD FACSCalibur herangezogen wurde, eine Zellsortierung aber ausblieb, wird in den nachfolgenden Abschnitten die Bezeichnung „Durchflusszytometrie“ präferiert.

2.13.1 Aufbau und Funktionsprinzip

Bei der Durchflusszytometrie wird zunächst eine Einzelzellsuspension, welche gegebenenfalls mit bestimmten fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gefärbt wurde, mithilfe einer sogenannten Hüllflüssigkeit (*engl.* sheath fluid) verdünnt (Abbildung 2.7 (a)). Diese ermöglicht es den Zellen in der Durchflusszelle einzeln und fokussiert an einer monochromatischen Lichtquelle (meist ein bei 488 nm emittierender Argon-Laser und im BD FACSCalibur System zusätzlich ein räumlich getrennter, bei 635 nm emittierender Dioden-Laser) vorbeizufließen. Bei Passage der Lichtquelle, welche rechtwinklig zum Probenfluss angeordnet ist, streuen die Zellen einen Teil des Anregungslichtes in verschiedene Richtungen. Dies kann mittels Detektoren registriert und durch Photomultiplier in elektrische Signale umgewandelt werden (Abbildung 2.7 (b)). Das Streulicht, welches entlang der Achse des einfallenden Laserstrahls auftritt, wird als Vorwärtsstreulicht (FSC, *engl.* forward scatter) bezeichnet und gibt Aufschluss über das Zellvolumen beziehungsweise die Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (SSC, *engl.* side scatter), welches durch eine Vielfachstreuung von Zellorganellen und Brechung im rechten Winkel zum einfallenden Laserstrahl entsteht, gibt Hinweise zur Granularität und Binnenstruktur der Zelle [56].

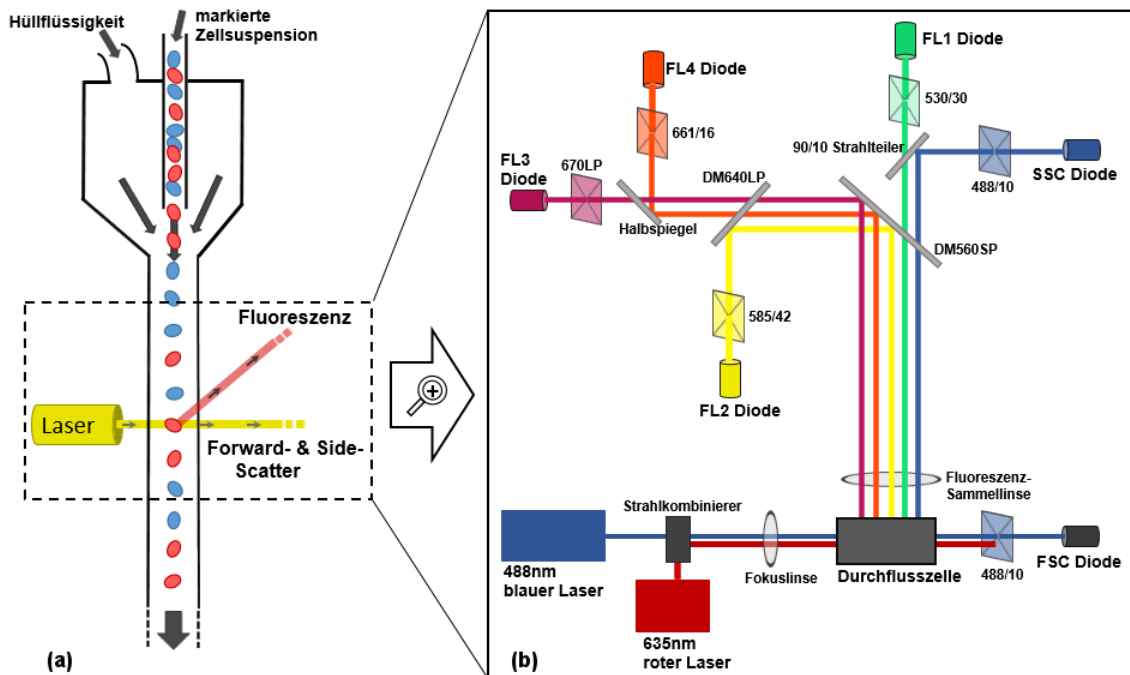


Abbildung 2.7 Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der Durchflusszytometrie. Das optische System, welches vereinfacht dem Rechteck in Abbildung (a) entspricht, ist rechts in Abbildung (b) detaillierter beschrieben und entspricht dem Aufbau im BD FACSCalibur.

Parallel zur Detektion der Lichtstreuung und Zellzahlbestimmung ist eine Fluoreszenzmessung über bestimmte Detektoren mit vorgeschalteten Bandpassfiltern (FL1-4) an zuvor eingefärbten Zellen möglich. Diese Messung erfolgt ebenfalls im Winkel von 90° . Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist dabei proportional zur Menge des gebundenen Farbstoffes. Auch Mehrfachfärbungen sind möglich. Dies gilt insbesondere dann, wenn das Durchflusszytometer mit verschiedenen Lasern und Filtern ausgestattet ist und sich die verwendeten Fluorochrome in ihrem Emissionsspektrum nicht überlappen.

In dieser Arbeit fanden als Fluorochrome das zwischen die Nukleotidbasen Cytosin und Guanin interkalierende 7-AAD und fluoreszenz-gekoppelte Primärantikörper (Details dazu in Tabelle 2.5) Einsatz. Bei Gebrauch von 7-AAD zum Nachweis der Apoptose in nicht-viablen Zellen war eine zeitliche Abstimmung des Färbeprotokolls auf die Testversuche vonnöten. Eine Interkalation in die DNA kann nämlich

nur dann stattfinden, wenn die Zellmembran für das Farbmolekül permeabel ist. Dies ist bei apoptotischen Zellen regelhaft erst im Spätstadium, circa 9 - 12 Stunden nach Apoptoseinduktion, der Fall. Wird diesem Zeitintervall keine Beachtung geschenkt, könnte ein Apoptosenachweisversuch falsch negativ ausfallen, da die Membran im Frühstadium der Apoptose charakteristischerweise noch intakt und nicht durchlässig ist. Zur sicheren Detektion der Apoptose wurde die 7-AAD-Färbung bei den Antikörperversuchen daher erst nach einem festgesetzten Inkubationsintervall von 24 Stunden nach der Apoptoseinduktion durchgeführt.

2.13.2 Vorbereitung der Zellen

Zur Durchführung der durchflusszytometrischen Vermessung mussten die Zellen entsprechend vorbereitet werden. Aufgrund der verschiedenen Anforderungen war ferner eine Auswahl und Optimierung geeigneter Färbeprotokolle für die Immunphänotypisierung und den Apoptosenachweis in Suspensionszellen vorzunehmen.

Die zu untersuchenden Zellen mussten methodenbedingt als Einzelzellsuspension vorliegen. Die adhärennten Endothelzellen wurden auf die gleiche Weise wie bei der Zellpassage von der Zellkulturplatte abgelöst und nach Zellzählung auf 2×10^5 Suspensionszellen pro Reagiergefäß eingestellt. Analog dazu wurden je 2×10^5 THP-1 Zellen beziehungsweise PBMCs abgezählt, welche ebenfalls in je ein Reagiergefäß überführt wurden. Im 2D Modell wurden die Zellen nach mechanischer Resuspension in je ein Reagiergefäß beziehungsweise flow cytometry tube (FC-Tube, *engl.*) pro well pipettiert. Die Zellsuspension über den adhärennten Endothelzellen im 3D Modell wurde mittels Eppendorfpipette vorsichtig abgenommen und in ein FC-Tube je Zellkrone überführt. Auch das zugehörige Außenmedium wurde in je ein Reagiergefäß pipettiert und der Überstand bei 20°C und 1200 rpm über 5 Minuten abzentrifugiert. Dieses Vorgehen war nötig, um die möglicherweise durch die Matrix „durchgelaufenen“ Zellen nicht unberücksichtigt zu lassen. Das Zellpellet wurde anschließend zu der entsprechenden, zuvor abgenommenen Zellsuspension im FC-Tube hinzupipettiert.

Das weitere Prozedere war abhängig von der Fragestellung:

- Für die Immunphänotypisierung wurden die Suspensionszellen zunächst bei 4°C und 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Pasteurpi-

pette vorsichtig abgesaugt und das Zellsediment mit 1 ml eiskaltem FC-Puffer gewaschen. Anschließend wurde zu der verbliebenen Zellsuspension in 100 μ l FC-Puffer je 5 μ l entsprechender Primärantikörper (aus Tabelle 2.5) hinzugesetzt. Daraufhin wurde die Zell-/Antikörpermischung gevortext und 20 Minuten auf Eis unter Lichtabschluss inkubiert. Für eine simultane Mehrfachmarkierung wurden entsprechend verschiedene Primärantikörper zu der Zellsuspension hinzupipettiert. Dabei galt zu beachten, dass nur solche fluorochrom-konjugierten Antikörper kombiniert wurden, welche sich in ihrem Emissionsspektrum deutlich voneinander unterschieden. Zum Ausschluss unspezifischer Fluoreszenzsignale wurden FITC- beziehungsweise PE-gekoppelte IgG1-Antikörper als Isotypenkontrollen eingesetzt. Die Inkubation mit Antikörpern wurde mit einem erneuten Zentrifugierschritt (4°C, 1200 rpm für 5 Minuten) beendet. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet zweimalig mit 1 ml kaltem FC-Puffer gewaschen, wobei das Pellet nach dem zweiten Waschen in 500 μ l FC-Puffer resuspendiert wurde. Die Zellen verblieben bis zur Messung auf Eis in Dunkelheit.

- Zum alleinigen und quantitativen Apoptosenachweis wurde das Medium der Suspensionszellen abzentrifugiert (4°C, 1200 rpm für 5 Minuten) und anschließend mit 1 ml eiskaltem FC-Puffer gewaschen. Nach Resuspension des Zellpellets in 500 μ l FC-Puffer wurden je 5 μ l 7-AAD pro FC-Tube hinzupipettiert. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten auf Eis in Dunkelheit. Die Zellen verblieben bis zu ihrer Vermessung unter diesen Bedingungen.

- Bei den Versuchen mit Antikörperkonstrukten kam es teilweise zur Kombination der beiden zuvor beschriebenen Protokolle: Nach Durchführung des Protokolls zur Immunphänotypisierung wurden je 5 μ l 7-AAD pro 500 μ l Zellsuspension zugegeben. Anschließend folgte eine zehnminütige Inkubation auf Eis unter Lichtabschluss.

- Zur maximal möglichen Reduktion eines (selektiven) Zellverlustes durch Zentrifugation und Waschschriffe wurde ein vereinfachtes Protokoll zum quantitativen Apoptosenachweis in Suspensionszellen aus den 2D und 3D Modellen entwickelt. Die Suspensionszellen aus dem Überstand wurden nach Überführung in das FC-Tube ohne Zentrifugations- oder Waschschriffe direkt mit je 5 μ l 7-AAD für 10 Minuten auf Eis bei Dunkelheit inkubiert. Anschließend erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse.

Für die Grundeinstellungen und den Datenabgleich wurden jeweils native und 7-AAD-markierte THP-1 Zellen und PBMCs einzeln vermessen. Zusätzlich wurden ungefärbte THP-1 Zellen in Kombination mit PBMCs sowie apoptotische und 7-AAD-markierte THP-1 Zellen als FC-Kontrollen verwendet. Die Induktion der Apoptose in den THP-1 Zellen erfolgte, indem die Zellen in frisch hergestellter CPT-Arbeitslösung (Herstellung laut Tabelle 2.6) resuspendiert und für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert wurden. Die Zellzahl bei allen FC-Kontrollen betrug pro Zellsorte 2×10^5 Zellen, das heißt bei Kombination zweier Zellsorten dementsprechend 4×10^5 Zellen.

2.13.3 Messung und Auswertung

Das BD FACSCalibur ermöglichte während der Messung die Detektion von bis zu 3500 Ereignissen/Sekunde. Die emittierten Fluoreszenzsignale konnten mithilfe der in Tabelle 2.13 aufgelisteten Detektoren registriert werden.

Tabelle 2.13 Auflistung spezifischer Detektoren zur Registrierung verschiedener Fluoreszenzsignale im BD FACSCalibur

| Anregungsspektrum | Fluorochrom | Detektor | Filter |
|-------------------|-------------|----------|-----------|
| 488 nm | FITC | FL1 | 530/30 nm |
| | PE | FL2 | 585/42 nm |
| | 7-AAD | FL3 | > 670 nm |

Die Stichprobengröße betrug 1×10^5 Zellen pro Messung. Zur Reduktion unspezifischer Hintergrundsignale wurden die Grundeinstellungen unter Zuhilfenahme von Negativkontrollen durchgeführt und Schwellenwerte (*engl.* threshold) festgelegt. Das bedeutet, dass nicht alle gemessenen Daten gespeichert wurden, sondern nur diejenigen, welche einen definierten Schwellenwert überschritten haben. Die Messergebnisse wurden anschließend für jede Zelle einzeln in einem Datenspeicher abgelegt und konnten nach Bearbeitung mittels entsprechender Software (in dieser Arbeit FlowJo X) graphisch dargestellt werden.

Eine häufig zur Anwendung kommende eindimensionale Darstellung ist das Histogramm. Hierbei wird eine bestimmte Signalintensität gegen die Zellzahl aufgetragen (Abbildung 2.8).

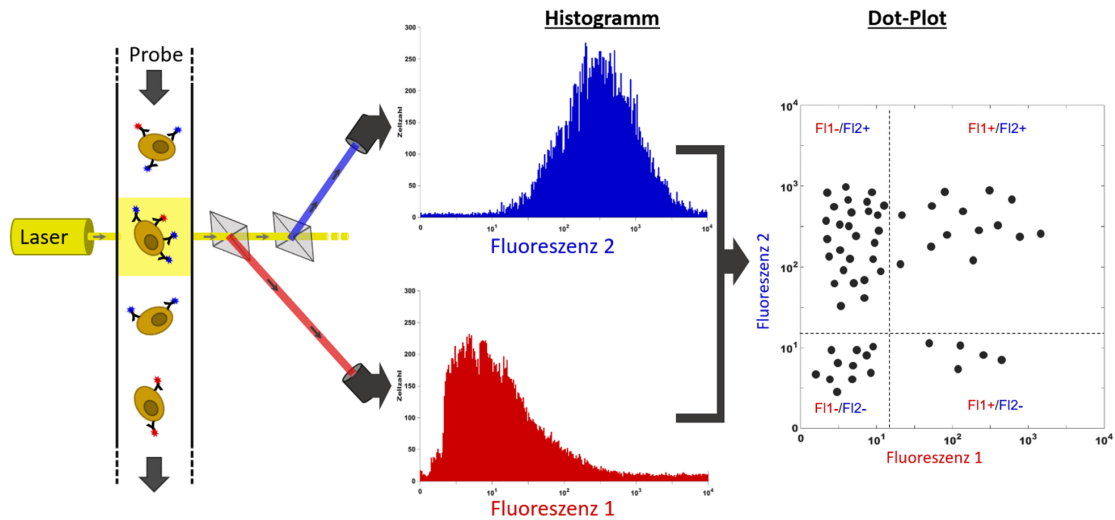


Abbildung 2.8 Graphische Darstellung der Messergebnisse anhand eines Histogramms oder Dot-plots.

Eine weitere, zweidimensionale Darstellung ist die Punkteauftragung (*engl.* dot plot), bei welcher die Signalintensitäten von zwei Messparametern jeweils auf beiden Achsen abgebildet werden. In den Graphen können manuell beliebig viele Regionen festgelegt werden, die zum Beispiel Zellpopulationen beschreiben. Durch Setzen von Auswertungsfenstern (*engl.* gating) können mehrere Regionen in Beziehung zueinander gesetzt und detaillierte Aussagen über Subpopulationen getroffen werden, welche sich über mehr als zwei Messparameter charakterisieren lassen. In dieser Arbeit wurden insbesondere die THP-1 Zellen gated und hinsichtlich ihres Fluoreszenzverhaltens im FL3-Kanal genauer analysiert. Die experimentellen Rohdaten wurden einer Datenanalyse mittels IBM SPSS Statistics unterzogen und durch den t-Test für ungepaarte Stichproben miteinander verglichen. Bei Durchführung von multiplen Paarvergleichen mit den gleichen Daten wurden die p -Werte zusätzlich nach dem Verfahren von Bonferroni korrigiert. Signifikanz wurde bei einem p -Wert < 0.05 angenommen.

2.14 Histologie

Die adhärennten Zellen des Gewebes wurden zur Darstellung des Endothelzellmonolayers entweder vital mittels Calcein Red gefärbt (Abschnitt 2.14.1) oder zur Beurteilung von pathologischen Veränderungen einer feingeweblichen Untersuchung unterzogen. Hinsichtlich Letzterem musste das zu untersuchende Gewebe aufgearbeitet und gefärbte Gewebeschnitte hergestellt werden (Abschnitt 2.14.2 - 2.14.8).

2.14.1 Vitalfärbung mit Calcein Red

Um die Zellarchitektur und das physiologische Verhalten der Endothelzellen auf den verschiedenen Matrices beurteilen zu können, wurde eine Vitalfärbung durchgeführt. Diese erfolgte direkt nach Abschluss der 14-tägigen Kulturphase von Endothelzellen auf der entsprechenden Matrix im 3D Gefäßmodell. Dazu wurde das VascuLife Medium aus den Zellkronen komplett (innen und außen) abgesaugt. Die Endothelzellen im Inneren der Zellkrone wurden jeweils mit 500 μL der Calcein-Arbeitslösung (Herstellung nach Tabelle 2.8) überschichtet und eine Stunde lang bei 37°C lichtgeschützt inkubiert. Das Funktionsprinzip des Calcein Reds ist dabei ähnlich dem des farblosen Calcein Acetoxymethylesters (AM) (Abbildung 2.9 a)): Calcein AM wird transportervermittelt in die Zelle aufgenommen. Intrazellulär katalysieren unspezifische Esterasen die Abspaltung der AM-Gruppe vom Calcein, sodass das Calcein anschließend wieder in der Lage ist, Calciumionen zu komplexieren und auf diese Weise grün zu fluoreszieren [57]. Aufgrund der Impermeabilität der Zellmembran reichert sich der gebildete Komplex intrazellulär an, was die Zellfunktion jedoch kaum beeinträchtigt.

Ein größeres Problem stellt eher die Expression von MDR (*engl.* multi drug resistance)-Transportern in den anzufärbenden Zellen dar, welche zu den ABC (*engl.* ATP binding cassette)-Transportern gehören. Über diese Effluxtransporter kann das gerade in die Zelle aufgenommene Calcein AM aktiv wieder hinaus transportiert werden, ohne dass zum Beispiel eine enzymatische Deacylierung und damit eine Anfärbung der Zelle stattgefunden hat. Um falsch-negative Ergebnisse sowie eine hohe Hintergrundfärbung zu vermeiden, wurde der Calcein-Arbeitslösung 2,5 mM Probenecid beigefügt, welches Effluxtransporter inhibiert (Abbildung 2.9 b)).

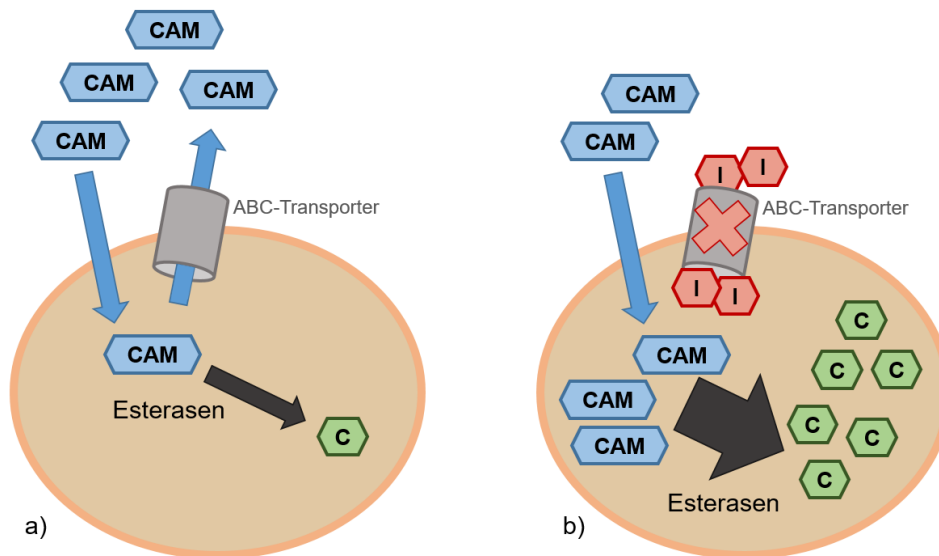


Abbildung 2.9 Funktionsprinzip der Vitalfärbung mit Calcein Acetoxymethylester (AM).
 a) Calcein AM (CAM) wird transportvermittelt in die Zelle aufgenommen. Unspezifische Esterasen katalysieren intrazellulär die Abspaltung der AM-Gruppe, wodurch das Calcein (C) Calciumionen komplexieren und grün fluoreszieren kann. Zellmembranständige ABC (*engl.* ATP binding cassette)-Transporter können einen Efflux von CAM vermitteln und einer Zellanfärbung entgegen wirken.
 b) Durch ABC-Transporter-Inhibitoren (I) wie Probenecid kann dem CAM-Efflux entgegen gewirkt werden, sodass sich dieses intrazellulär anreichern kann.

Zur weiteren Reduktion eines unspezifischen Hintergrundsignals wurde das Zellmedium außerhalb der Zellkrone durch 3 mL HHBS während der Inkubation mit Calcein Red ersetzt. Um die Zellbeurteilung mikroskopisch zu erleichtern, wurden die Endothelzellkerne im Anschluss an die Calcein-Färbung mit dem zellpermeablen und an die DNA bindenden Hoechst Stain 33342 eingefärbt. Hierzu wurde die Calcein-Arbeitslösung im Zellkroneninneren vorsichtig mittels Pasteurpipette abgesaugt und durch jeweils 400 μL Hoechst-Reagenz (Herstellung laut Tabelle 2.8) ersetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C in Dunkelheit wurden die Endothelzellen im Inneren der Zellkrone für weitere 5 Minuten mit PBS gewaschen. Schließlich wurde die Flüssigkeit aus den Zellkronen komplett abgesaugt und durch frische HHBS (innen zusätzlich mit 2,5 mM Probenecid versetzt) ersetzt. Die Begutachtung der Zellen erfolgte am Konfokalmikroskop SP5 von Leica. Calcein Red wies dabei ein Anregungs-/Emissionsspektrum von 635/670 nm auf, Hoechst Stain 33342 eines von 365/480 nm.

2.14.2 Gewebefixierung

Nach Abnahme der Suspensionszellen (THP-1 Zellen und gegebenenfalls PBMCs) für durchflusszytometrische Untersuchungen wurden die in Zellkronen eingespannten und mit Endothelzellen besiedelten Matrices einmalig mit PBS gespült. Danach wurden sie mit 4%igem PFA in der 12-well Zellkulturtestplatte überschichtet und für mindestens zwei Stunden unter dem Abzug inkubiert. PFA dringt dabei in das Gewebe ein und sorgt für eine reversible Vernetzung der Proteine unter Erhalt der Antigenität und Enzymaktivität. Abschließend wurde das PFA mithilfe einer Pipette abgenommen.

2.14.3 Paraffineinbettung

Die fixierten Gewebestücke wurden unter Zuhilfenahme von Pinzetten aus den Zellkronen herausgelöst und auf je einen schmalen Filterpapierstreifen flach ausgebreitet. Der überstehende Anteil des Papierstreifens wurde über die Matrix geklappt und zusammen mit dieser in eine Einbettkassette hineingelegt. Die Einbettkassetten wurden nach ihrem Verschluss in einen Becher mit Leitungswasser gegeben und verblieben dort für eine weitere Stunde zur Entfernung der PFA-Reste. Anschließend wurden die Kassetten in den Wassertank des Einbettautomats überführt. Die Paraffineinbettung erfolgte über Nacht nach dem in Tabelle 2.14 dargestellten Programmablauf.

Tabelle 2.14 Programmablauf zur automatisierten Paraffineinbettung nach laborinternen Angaben

| Zweck | Lösung | Zeit [Stunden] |
|--|-------------------------|----------------|
| Auswaschen des Fixans | Leitungswasser | 1 |
| Aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung | Ethanol 50% | 1 |
| | Ethanol 70% | 1 |
| | Ethanol 80% | 1 |
| | Ethanol 96% | 1 |
| | Isopropanol I | 1 |
| | Isopropanol II | 1 |
| Alkoholextraktion aus dem Gewebe | Isopropanol/Xylol (1:2) | 1 |

Tabelle 2.14 Programmablauf zur automatisierten Paraffineinbettung (Fortsetzung)

| Zweck | Lösung | Zeit [Stunden] |
|----------------------------------|-------------|----------------|
| | Xylol I | 1 |
| | Xylol II | 1 |
| Gewebedurchtränkung mit Paraffin | Paraffin I | 1,5 |
| | Paraffin II | 1,5 |

2.14.4 Herstellung der Schnittpräparate

Nach Paraffineinbettung und anschließendem Einlegen in Flüssigparaffin für 30 Minuten wurden die Gewebemodelle aus den Einbettkassetten an der Blockstation entnommen und zugeschnitten. Der (durch das Einspannen der Matrix bedingte) zellfreie Rand wurde mit einem erwärmten Skalpell entfernt und das verbleibende Gewebestück in drei gleiche Anteile zerteilt. Diese wurden senkrecht, mit dem Schnitttrand nach unten, in eine mit wenig Flüssigparaffin gefüllte Edelstahlgussform eingesetzt. Nach Beginn der Paraffinaushärtung wurde die Metallform sukzessiv mit Flüssigparaffin aufgefüllt. Bei diesem Vorgang war auf die Vermeidung von Luftblasen zu achten. Der untere Teil der Einbettkassette wurde auf die Metallgussform gesetzt und abschließend nochmals mit Paraffin überschichtet. Nach vollständiger Aushärtung wurden die Paraffinblöcke aus den Gussformen herausgelöst und bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

Für die Herstellung der Schnittpräparate wurden die Paraffinblöcke zunächst auf einer Kühlplatte gekühlt. Das überschüssige Paraffin am Rand wurde mittels Skalpell entfernt. Die zugeschnittenen Blöcke wurden in das Mikrotom eingespannt, welches eine Anfertigung von Schnitten mit einer Dicke von $3\ \mu\text{m}$ ermöglichte. Die hauchdünnen Schnitte wurden zur Entfaltung beziehungsweise zum Glätten sofort in ein 20°C und anschließend mittels Objektträger in ein 50°C warmes Wasserbad überführt. Die Präparate, die für eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung, Abschnitt 2.14.6) bestimmt waren, wurden von dort aus auf einen unbeschichteten Objektträger aufgenommen. Für die restlichen Gewebeschnitte wurden zugunsten einer besseren Haftung bei (immun)histochemischen Färbungen (Abschnitt 2.14.8) Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger verwendet. Die mit Schnittpräparate bezo-

genen Objektträger wurden über Nacht bei 38°C im Wärmeschrank getrocknet.

2.14.5 Entparaffinieren

Da für histologische und immunhistochemische Färbungen meist wässrige Lösungen verwendet werden, musste das Paraffin aus den Schnittpräparaten zunächst mittels Xylol entfernt werden. Zusätzlich erfolgte die Rehydrierung der Gewebeschnitte durch eine absteigende Alkoholreihe. Um das Paraffin zu schmelzen und die Paraffinentfernung zu erleichtern, wurden die Schnitte vor der Xylolbehandlung 30 - 60 Minuten bei 60°C im Wärmeschrank inkubiert. Die darauf folgenden Arbeitsschritte sind in Tabelle 2.15 zusammengefasst.

Tabelle 2.15 Entparaffinieren und Rehydrieren von Paraffinschnittpräparaten

| Zweck | Lösung | Zeit [Minuten] |
|------------------|----------------|--|
| Entparaffinieren | Xylol I | 10 |
| | Xylol II | 10 |
| Rehydrierung | Ethanol 96% I | 3x auf- und abtauchen |
| | Ethanol 96% II | 3x auf- und abtauchen |
| | Ethanol 70% | 3x auf- und abtauchen |
| | Ethanol 50% | 3x auf- und abtauchen |
| | VE-Wasser | schwenken, bis keine Schlierenbildung mehr |

2.14.6 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die H.E.-Färbung zählt zu den Standardfärbungen in der Histologie. Sie wird vor allem zur lichtmikroskopischen Identifizierung von Zellkernen (Blaufärbung) und Zellplasma beziehungsweise Extrazellulärmatrix (Rotfärbung) eingesetzt. Grundlage der unterschiedlichen Darstellbarkeit von Zellbestandteilen sind elektrostatische Interaktionen: Kationische (basische) Farbstoffe wie das Hämalaun (= Oxidationsprodukt des Hämatoxylins, welches als Komplexverbindung mit einem Metallion vorliegt) binden an anionische Zellbestandteile (zum Beispiel DNA und Ribosomen). Anionische (saure) Farbstoffe, darunter Eosin, binden dagegen an kationische Zellkomponenten (zum Beispiel zytoplasmatische Proteine und Kollagen) [58].

Für eine H.E.-Färbung wurden die Schnittpräparate direkt nach dem Entparaffinieren und Rehydrieren (Tabelle 2.15) in Hämalau überführt und nach dem Standardprotokoll des Labors gefärbt (Vorgehensweise in Tabelle 2.16 beschrieben).

Tabelle 2.16 Standardlaborprotokoll für die H.E.-Färbung

| Zweck | Lösung | Zeit [Minuten] |
|--------------------------------|--------------------|------------------------------|
| Zellkernfärbung | Hämalau | 8 |
| Auswaschen von Farbresten | VE-Wasser | bis die Flüssigkeit klar ist |
| Differenzieren des Hämalau | HCl/Ethanol-Lösung | 2x kurz eintauchen |
| Spülen | VE-Wasser | 1x eintauchen |
| Bläuen | Leitungswasser | 5 |
| Färbung von Zytoplasma und EZM | Eosin-Lösung | 1 |
| Auswaschen von Farbresten | VE-Wasser | bis die Flüssigkeit klar ist |
| Entwässern | Ethanol 70% | 2x kurz eintauchen |
| | Ethanol 96% | 2 |
| | Isopropanol I | 5 |
| | Isopropanol II | 5 |
| Entfernung des Alkohols | Xylol I | 5 |
| | Xylol II | 5 |
| Eindecken | Entellan | |

2.14.7 TUNEL Assay

Der TUNEL (*engl.* TdT-mediated dUTP-X nick end labeling) Assay fand Anwendung zur Detektion von DNA-Schäden in adhären Endothelzellen, welche durch Apoptose, Nekrose, aber auch unspezifisch durch Nährstoffmangel oder Einfluss von Noxen entstehen können. Bei dieser Methode verknüpft das Enzym TdT (*engl.* terminal deoxynucleotidyl transferase) Vorlagen-unabhängig die freiliegenden 3'-OH-Gruppen bei DNA-Strangbrüchen mit fluorescein-dUTP, welches unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (im FITC-Kanal) grün erscheint.

Die Paraffinschnitte wurden dazu entparaffiniert (Tabelle 2.15), in den Waschpuf-

fer TBST überführt und anschließend, wie in Tabelle 2.17 zusammengefasst, behandelt. Vor dem Auftragen der Einwirklösungen und der Inkubation in der Feuchtekammer wurden die Gewebepreparate mit einem Fettstift umrandet. Dieser ermöglichte den Einsatz kleiner Lösungsvolumina (100 μ L) und verhinderte deren Abfließen. Für die Demaskierung der Epitope, welche die fixansbedingte Proteinquervernetzung aufheben und eine Bindung der eingesetzten Enzyme beziehungsweise Antikörper an ihre Epitope ermöglichen soll, wurden zwei verschiedene Verfahren ausgetestet (Details in Tabelle 2.17 „Epitop-Demaskierung“). Zudem wurde der TUNEL Assay probeweise mit Mehrfachimmunfluoreszenzfärbungen kombiniert, sodass anstatt dem Eindecken mit der IHC-Färbung fortgefahren wurde (Abschnitt 2.14.8). Nach dem Eindecken wurden die gefärbten Gewebeschnitte bis zur Untersuchung am Fluoreszenz-Mikroskop BZ-9000 von Keyence in Dunkelheit bei 4 °C gelagert.

Tabelle 2.17 Einzelarbeitsschritte des TUNEL Assays

| Zweck | Lösung | Zeit [Minuten] |
|--|--|-----------------------|
| Positivkontrolle mit enzymatisch gespaltener DNA | DNase I Lösung | 10, Raumtemperatur |
| Separates Waschen | TBST | 3x 5 |
| Epitop-Demaskierung | 1) Enzymatisch mit Proteinase K | 15, 37°C |
| Waschen | TBST | 3x 5 |
| | 2) Hitzeinduziert mit 100°C warmen Citratpuffer (pH 6) | 20 |
| Waschen | TBST | 5, Raumtemperatur |
| Blocken unspezifischer Bindungsstellen | Blockierlösung | 30, Raumtemperatur |
| Waschen | TBST | 3x 5 |
| TUNEL-Reaktion | TUNEL-Reagenz | je 120 in Dunkelheit, |
| Negativkontrolle | Lediglich Markerlösung | 37°C |
| Waschen | TBST | 3x 5 |
| Weiter mit oder Eindecken | Immunfluoreszenzfärbung (Tabelle 2.19) Mowiol DABCO mit 0,1% DAPI | |

2.14.8 Immunhistochemie

Die IHC-Färbung beruht auf dem Nachweis einer Struktur, die als Antigen fungiert und über eine Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar gemacht wird. Dazu werden die Gewebeschnitte zunächst mit einem Primärantikörper überschichtet, der spezifisch an das Antigen bindet. Für die Visualisierung des Primärantikörpers können unterschiedliche Verfahren herangezogen werden.

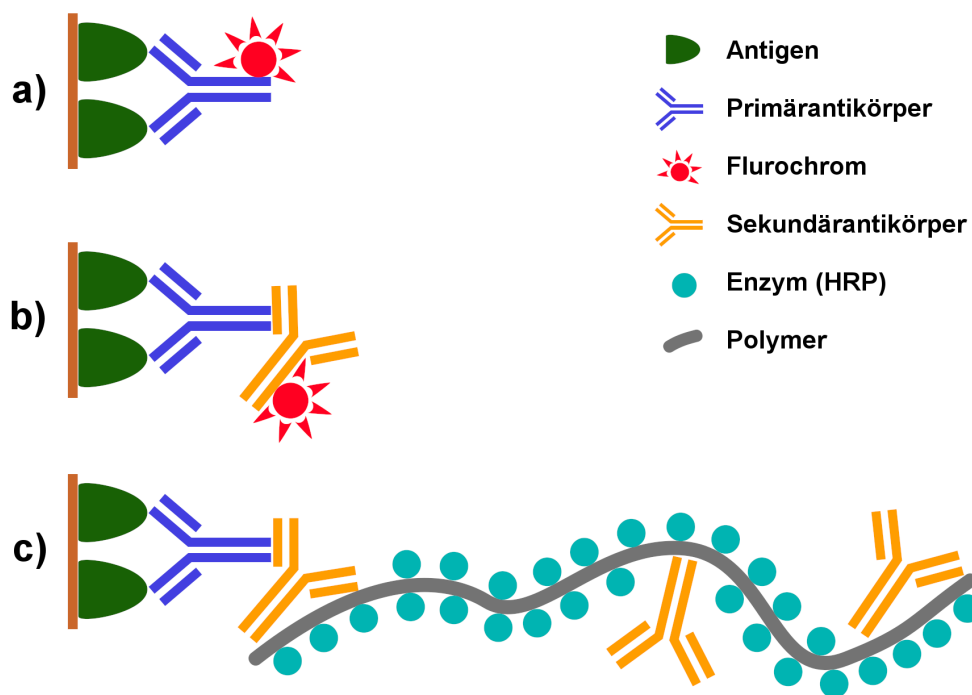


Abbildung 2.10 Darstellung immunhistochemischer Färbemethoden, wobei Abbildung a) auf einer direkten beziehungsweise b) auf einer indirekten immunfluoreszenzvermittelten Methode und c) auf einer indirekten Polymer-Methode beruht.

Bei der direkten Immunfluoreszenz ist der Primärantikörper direkt mit einem Fluorochrom gekoppelt (Abbildung 2.10 a)). Bei der indirekten Immunfluoreszenz ist der Sekundärantikörper, der gegen das Fc-Fragment (*engl.* fragment crystallisable) des Primärantikörpers gerichtet ist, fluoreszenzfarbstoff-markiert (Abbildung 2.10 b)). Bei der indirekten enzymkonjugierten Polymer-Methode ist der an den Primärantikörper (aus Maus oder Kaninchen) gebundene Sekundärantikörper zusätz-

lich gegen ein Mikropolymer gerichtet, welches reichlich mit Meerrettichperoxidase (HRP, *engl.* horseradish peroxidase) konjugiert ist (Abbildung 2.10 c)). Wird das Substrat-Chromogen-Gemisch, bestehend aus Wasserstoffperoxid und farblosen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), hinzugegeben, katalysiert die Peroxidase die Reduktion von Wasserstoffperoxid. Die dabei frei werdenden Protonen oxidieren das DAB zu einem braunen, unlöslichen Reaktionsprodukt. Dieses kann lichtmikroskopisch wahrgenommen werden. Durch die relativ hohe Enzymkonzentration im Verhältnis zum Primär-/Sekundärantikörper ist eine Signalverstärkung möglich und somit auch ein gering exprimierter/s Marker(protein) nachweisbar.

Vor Durchführung der IHC-Färbung wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert (Tabelle 2.15) und in TBST überführt. Die Waschschritte wurden jeweils auf einem Wippschüttler durchgeführt. Die Epitop-Demaskierung erfolgte bei IHC-Färbungen lediglich hitzeinduziert mit Citratpuffer nach dem gleichen Vorgehen wie beim TUNEL Assay. Nach Antigendemaskierung wurden die Gewebeschnitte mit einem Fettstift umrandet und in einer Feuchtekkammer einsortiert. Die darauf folgenden Arbeitsschritte zur Durchführung einer HRP-basierten DAB-Färbung werden in Tabelle 2.18 erläutert. Die Schritte für eine Immunfluoreszenzfärbung sind in Tabelle 2.19 dargestellt. Die eingesetzten Antikörper sind inklusive Konzentrationsangaben in Tabelle 2.5 aufgeführt. Die Inkubation erfolgte dabei jeweils bei Raumtemperatur. Zum Ausschluss unspezifischer Antikörperbindungen wurden, je nach Art des Primärantikörpers, Isotypenkontrollen in äquivalenten Konzentrationen als Negativkontrollen eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde für die Anti-CD13/DAB-Färbung nativer Dünndarm (physiologisch CD13 positiv (+)) eingefärbt. Vor Beginn einer spezifischen Einfärbung musste bei der enzymkonjugierten Polymer-Methode zur Vermeidung falsch-positiver Farbumschläge die endogene Gewebe-Peroxidase durch Zugabe von Wasserstoffperoxid abgesättigt werden.

Tabelle 2.18 Einzelschritte für die HRP-basierte DAB-Färbung

| Zweck | Lösung | Zeit [Minuten] |
|----------------------------------|--|----------------|
| Blocken der endogenen Peroxidase | 3% H ₂ O ₂ | 10 |
| Waschen | TBST | 5 |
| Inkubation mit Primär-Ak | Primär-Ak/Isotyp in Ak-Verdünnungslösung | 60 |

2 Material und Methoden

Tabelle 2.18 Einzelschritte für die HRP-basierte DAB-Färbung (Fortsetzung)

| Zweck | Lösung | Zeit [Minuten] |
|---|---------------------|--------------------|
| Waschen | TBST | 3x 5 |
| Inkubation mit Sekundär-Ak | DCS Enhancer Lösung | 10 |
| Waschen | TBST | 3x 5 |
| Inkubation mit enzymkonjugierten Polymer | DCS Polymer Lösung | 20 |
| Waschen | TBST | 3x 5 |
| Inkubation mit Substrat-Chromogen-Gemisch | DAB-Lösung | 5 |
| | TBST | überführen |
| Zellkernanfärbung | Hämalaun | 0,5 - 0,75 |
| Bläuen | Leitungswasser | 1 - 1,5 |
| | VE-Wasser | überführen |
| Entwässern | Ethanol 70% | 2x kurz eintauchen |
| | Ethanol 96% | 2 |
| | Isopropanol I | 5 |
| | Isopropanol II | 5 |
| Entfernung des Alkohols | Xylol I | 5 |
| | Xylol II | 5 |
| Eindecken | Entellan | |

Tabelle 2.19 Einzelschritte für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung

| Zweck | Lösung | Zeit [Minuten] |
|---|--|--------------------|
| Blocken unspezifischer Gewebeeptope zur Reduktion der Autofluoreszenz | Blockierlösung | 20 |
| Inkubation mit Primär-Ak | Primär-Ak/Isotyp in Ak-Verdünnungslösung | 60 |
| Waschen | TBST | 3x 5 |
| Inkubation mit konjugierten Sekundär-Ak | Sekundär-Ak in Ak-Verdünnungslösung | 60 im Dunkeln |
| Waschen | TBST | 3x 5 im Dunkeln |
| Eindecken | Mowiol DABCO mit 0,1% DAPI | dunkel lagern, 4°C |

Zwecks Mehrfachimmunfluoreszenzfärbung waren die Arbeitsschritte vor dem Eindecken ab dem Blockierschritt zu wiederholen. Eine Ausnahme stellte die simultane Doppelfärbung dar. Diese war nur möglich, sofern die Primärantikörper aus verschiedenen Spezies abstammten und zusammen in einer Verdünnungslösung angeboten werden konnten. Die entsprechenden Sekundärantikörper wurden ebenfalls gemeinsam in einer Verdünnungslösung zur Inkubation bereit gestellt. Um die antigenen Determinanten schließlich voneinander differenzieren zu können, war auf eine unterschiedliche und sinnvolle Konjugation der Sekundärantikörper mit Fluorochromen zu achten.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines 3D *in vitro* Blutgefäß-/Gewebe-modells

3.1.1 Auswahl einer Zelllinie

Um eine Wirkung durch die Antikörperkonstrukte in der Testung erzielen zu können, musste die auszuwählende Zelllinie die Epitope HLA-A2 und CD45 exprimieren. Zu Identifikationszwecken musste sie sich ferner immunphänotypisch eindeutig von den noch vorhandenen Zellen im Testsystem unterscheiden lassen. Das heißt, sie sollte zum Beispiel gegenüber humanen Endothelzellen beziehungsweise T-Zellen bezüglich CD34/CD3 negativ (-) sein.

Die Auswahl fiel auf die THP-1 Zelllinie, da sie formal alle genannten Kriterien erfüllt [17, 52]. Zur Verifizierung wurden die THP-1 Zellen erfolgreich im Durchflusszytometer vermessen (Abbildung 3.1 A bis C). Zusätzlich konnten die THP-1 Zellen in dieser Arbeit sehr gut über die Markierung von CD13/CD14 charakterisiert werden. Dabei betrug der Monozytenanteil (CD13+) an den verwendeten PBMCs lediglich circa 8% (FC-Daten nicht dargestellt). Bei durchflusszytometrischer Analyse der THP-1 Zellen bezüglich ihres CD13- und CD14-Status zeigte sich die Anfärbung von CD13 stärker und damit als geeigneter (Abbildung 3.1 D und E). Diese wurde für weitere Immunmarkierungen präferiert.

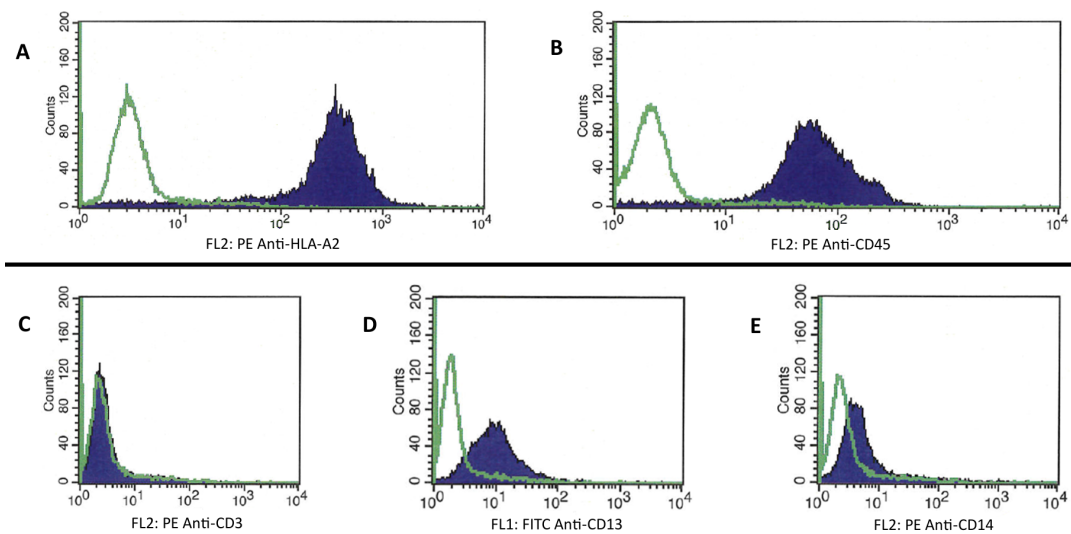


Abbildung 3.1 Durchflusszytometrische Vermessung der THP-1 Zellen bezüglich ihres Immunphänotyps. Das grün hinterlegte Histogramm bildet die Negativkontrolle ab, das blau gefüllte Histogramm die mit entsprechendem Antikörper markierte Zellpopulation. Zusammenfassend lassen sich die THP-1 Zellen als HLA-A2+, CD45+, CD3-, CD13+ und CD14 schwach positiv (+) charakterisieren.

3.1.2 Auswahl eines Mediums für die Kokultur im 3D Modell

Um THP-1 Zellen und Endothelzellen im 3D Modell gemeinsam kultivieren zu können, wurden verschiedene Wachstumsbedingungen getestet. Nach mehrtägiger Kultivierung der THP-1 Zellen in ihrem zellspezifischen Medium (RPMI versetzt mit 10% FCS) beziehungsweise in dem Endothelzellmedium VascuLife und wiederholtem lichtmikroskopischen Vergleich der Nativzellen, ergab sich hinsichtlich Zellmorphologie und Wachstumsverhalten kein Unterschied. Auch in den 2D Vorversuchen zum Aufbau des 3D Gewebemodells wurde die Kompatibilität der THP-1 Zellen mit VascuLife getestet und mittels Durchflusszytometrie quantitativ analysiert: 2×10^5 THP-1 Zellen wurden ohne Zwischenschritte direkt mit 7-AAD-markiert und anschließend gegatet, nachdem sie zusammen mit der gleichen Anzahl an PBMCs in VascuLife Medium für 24 Stunden in Kultur gehalten worden waren. Der Mittelwert der Apoptoserate betrug bei dreifacher Versuchswiederholung ($n = 3$) $2,9\% \pm 0,86\%$. Im Vergleich zu 2×10^5 7-AAD-markierten THP-1 Zellen, die zuvor sepa-

rat in ihrem zellspezifischen Medium kultiviert worden waren, ergab sich bei einer Apoptoserate von 3,45% ($n = 1$) kein signifikanter Unterschied. Somit wurde das VascuLife Medium für die Kokultur im 3D Modell eingesetzt.

3.1.3 Auswahl einer geeigneten Matrix

Für die Etablierung des 3D Modells war es entscheidend, eine geeignete Matrix zur Ausbildung eines optimalen und konfluenten Endothelzellmonolayers auszusuchen. Zur Beurteilung der Zellarchitektur und des Verhaltens von Endothelzellen, welche 14 Tage lang auf verschiedenen Matrices kultiviert worden waren, erfolgte die Anfärbung der Endothelzellen auf der Matrix mittels Calcein Red und Hoechst Stain 33342 (Kapitel 2.14.1).

Konfokalmikroskopisch von oben gesehen erschien dabei das Endothel, welches auf der:

- ehemaligen Mukosaseite der SIS-Ser gewachsen war, als lückenhaft und sich uneben entlang der Matrix auszubreiten (Abbildung 3.2 A).
- Serosa der SIS-Ser gewachsen war, als nahezu konfluenter Monolayer mit gut ausgebildeten Zell-Zellkontakten (Abbildung 3.2 B).
- ehemaligen Serosaseite der SIS-Ser gewachsen war, als nahezu konfluenter Monolayer mit ebenso gut ausgebildeten Zell-Zellkontakten (Abbildung 3.2 C).

Aufgrund der fehlenden Serosa stellte die zuletzt verwendete Matrix die dünnste aller SIS-Formen dar. Bei ähnlich guten konfokalmikroskopischen Ergebnissen zeigte sie sich aber in der Handhabung (zum Beispiel bei dem Beziehen der Zellkronen) labiler im Vergleich zur SIS-Ser mit bewachsener Serosa.

Daher wurde die SIS-Ser mit Besiedlung der Serosa als optimale Matrix für die Ausbildung des gewünschten Endothelzellmonolayers angesehen und in den folgenden Experimenten verwendet.

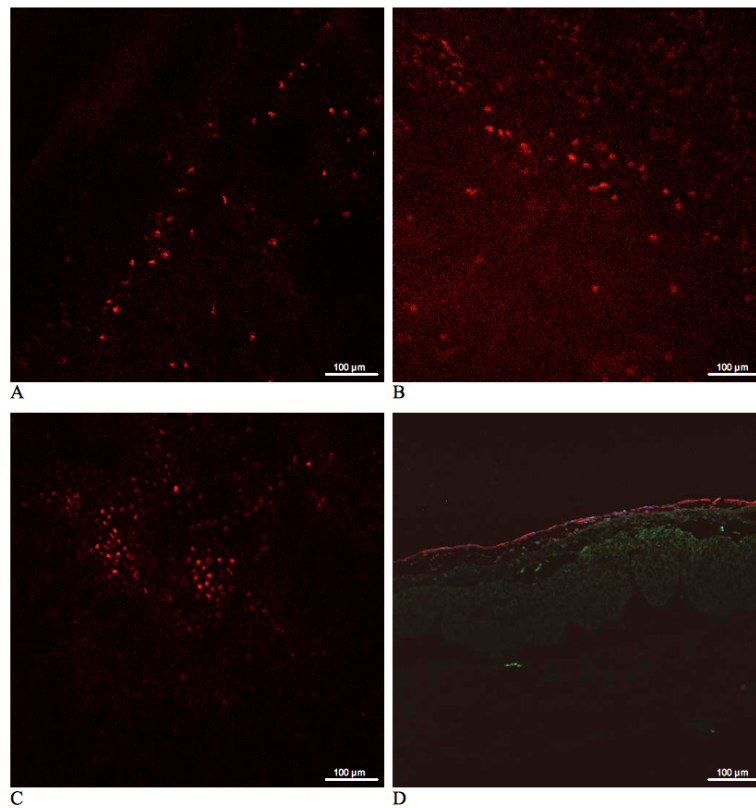


Abbildung 3.2 A-C: Konfokalmikroskopisch zeigt Calcein Red nativ markierte Endothelzellen (Blick von oben auf das Endothel), welche 14 Tage lang auf unterschiedlichen Matrizes kultiviert wurden. Besiedelt wurde bei A: die ehemalige Mukosaseite der SIS-Ser, bei B: die Serosa der SIS-Ser und bei C: die ehemalige Serosaseite der SIS-Ser. D: 3D Gewebemodellparaffinschnitt nach kombinierter Immunfluoreszenzfärbung und TUNEL Assay zur Darstellung des Endothelzellmonolayers in rot (Anti-CD34) mit blau markierten Zellkernen (DAPI) auf grün autofluoreszierender (TUNEL negativ) SIS-Ser-Matrix mit erhaltener Serosa.

3.2 Optimierung der Nachweismethoden

3.2.1 Durchflusszytometrie

Zur Erfassung der Apoptoserate von behandelten THP-1 Zellen aus den 2D und 3D Modellen musste zunächst ein geeignetes Färbeprotokoll erstellt werden. Neben einer 7-AAD-Färbung zum Apoptosenachweis wurde bei den Antikörperversuchen anfangs zusätzlich eine simultane Mehrfachimmunphänotypisierung mittels Anti-CD13 und -CD3 zur Unterscheidung der THP-1 Zellen von den ebenfalls in Suspension be-

findlichen PBMCs vorgenommen. Als Vorzug zur alleinigen Markierung mit 7-AAD erhoffte man sich durch die durchflusszytometrische Ermittlung der THP-1 Subpopulation eine exaktere Bestimmung der Apoptoserate der mit Antikörperkonstrukten behandelten THP-1 Zellen.

Anhand der Darstellung im FSC und SSC sowie der zusätzlichen Immunmarkierung konnten die THP-1 Zellen bei den Antikörperversuchen eindeutig von den PBMCs unterschieden werden. Bei Vergleich der Antikörperversuche mit den Tipifarnibversuchen stellte sich aber in den Antikörperansätzen eine verminderte Gesamtzellzahl von THP-1 Zellen (bei jeweils gleicher Einsatzmenge) heraus und damit einhergehend auch eine fälschlich niedrigere Apoptoserate. Die reduzierte Zellzahl wurde auf einen Zellverlust zurückgeführt, welcher zudem an einer längeren Gesamtmesszeit abzulesen war. Der Unterschied zwischen den Versuchsreihen bestand darin, dass bei den Versuchen mit Tipifarnib lediglich eine Anfärbung mit 7-AAD erfolgte, da die THP-1 Zellen als einzige Suspensionzellen analysiert wurden und eine durchflusszytometrische Subgruppenanalyse damit hinfällig war. Aufgrund der größeren Gesamtzellzahl bei den Tipifarnib-Versuchen und des sonst ähnlichen Färbeprotokolls wurde der beschriebene Zellverlust primär auf die vielen Wasch- und Zentrifugierschritte bei der Immunphänotypisierung (insgesamt fünf Waschschritte anstatt zwei Zentrifugierschritte bei den Versuchen mit Tipifarnib) zurückgeführt.

Zur Bestätigung dessen, wurden die Suspensionzellen aus den 2D Antikörper-testmodellen nach Überführung in das FC-Tube sowohl mit als auch ohne Immunfärbung mit 7-AAD inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch begutachtet. Zur Unterscheidung von den restlichen Suspensionzellen wurden die THP-1 Zellen im letzteren Fall unter Zuhilfenahme von entsprechenden Kontrollen im FSC und SSC gated und hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften im FL3-Kanal analysiert. Bei anschließender Auswertung zeigte sich nach kombinierter Immunfluoreszenzfärbung mit 7-AAD eine Apoptoserate (7-AAD+ Zellen) von $13,57\% \pm 2,24\%$ ($n = 3$). Nach alleiniger 7-AAD-Markierung wurde eine Apoptoserate von $37,85\% \pm 11,7\%$ festgestellt ($n = 6$). Referenz war dabei jeweils der gleiche Versuchsansatz mit 24-stündiger Inkubation von THP-1 mit PBMCs unter Zugabe beider Antikörperkonstrukte. Bei Betrachtung des Versuchsansatzes mit 24-stündiger Inkubation von THP-1 und PBMCs ohne anzunehmenden, zellvermittelten zytotoxischen Ein-

fluss von Antikörperkonstrukten, fiel der Unterschied bezüglich der Apoptoserate weniger gravierend aus, nämlich 2,73% (Immunfluoreszenzfärbung mit 7-AAD, n = 1) versus $2,9\% \pm 0,86\%$ (alleinige 7-AAD-Färbung, n = 3). Damit wurde der durch Zentrifugation und Waschschrte bedingte Zellverlust zusätzlich als selektiv angesehen. Das heißt, dass besonders die durch Therapeutika vorgeschädigten Zellen in Mitleidenschaft gezogen wurden. Das FC-Protokoll wurde zur maximal möglichen Reduktion eines selektiven Zellverlustes angepasst (siehe Abschnitt 2.13.2, „vereinfachtes Protokoll“). Dieses wurde schließlich für alle Apoptosenachweise in den 2D und 3D Modellen angewandt.

3.2.2 Histologie

Die möglicherweise durch die Therapeutika bedingten Kollateralschäden am dreidimensionalen Endothel sollten ursprünglich mithilfe eines Protokolls für eine Zellcharakterisierung mit simultanen Apoptosenachweis visualisiert werden. Dazu wurden die 3D Gewebemodelle in Paraffin eingebettet und einer feingeweblichen Untersuchung unterzogen. Zu Übersichtszwecken und dem grundsätzlichen Zellaachweis auf der eingebetteten Matrix erfolgte zunächst eine H.E.-Färbung, welche Letzteres bestätigte (Abbildung 3.3 A und B).

Damit eine Identifizierung der auf der Matrix eingebetteten Zellen vorgenommen werden konnte, sollten diese über eine Immunfluoreszenzfärbung eindeutig markiert werden:

- Endothelzellen via Anti-CD34,
- eventuell verbliebene und nicht für die Durchflusszytometrie abgenommene THP-1 Zellen via Anti-CD13,
- PBMCs lediglich durch Ausschluss via DAPI.

Neben der Immunfärbung sollte zugleich ein TUNEL Assay erfolgen, der geschädigte Zellen grün markiert. Für die Doppelfärbung musste zunächst eine geeignete Epitop-Demaskierung ermittelt werden, da der Hersteller des TUNEL-Reagenzes standardmäßig eine mit Proteinase K empfahl, während bei der am Lehrstuhl etablierten Immunfluoreszenzfärbung meist eine hitzeinduzierte mit Citratpuffer eingesetzt wurde. Nach unterschiedlicher Epitop-Demaskierung wurden die ansonsten gleich behandelten Paraffinschnitte einer Doppelfärbung unterzogen. Hierbei zeigte

sich die hitzeinduzierte Demaskierung aufgrund der geringeren Hintergrundfärbung und der besseren spezifischen Anfärbung (zum Beispiel bezüglich Anti-CD34) als überlegen (Abbildung 3.3 C und D).

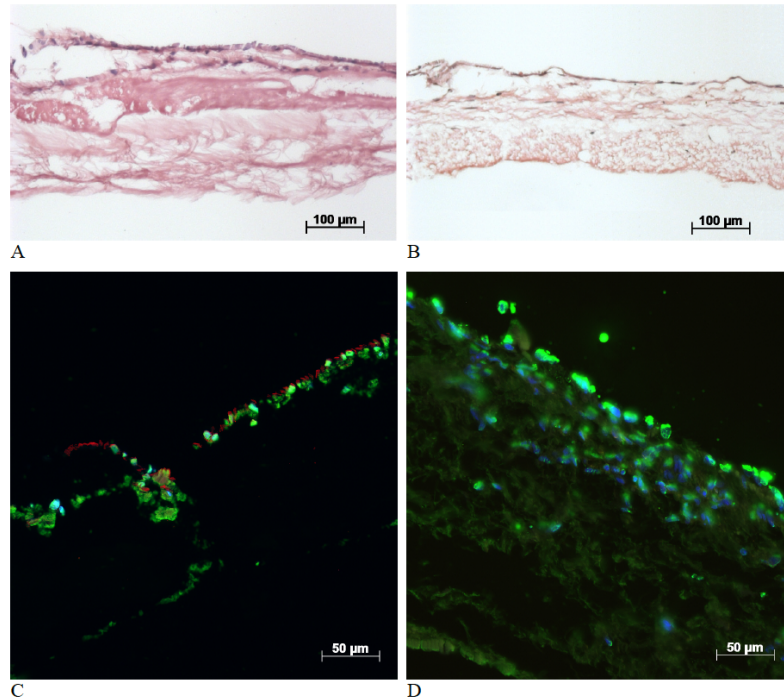


Abbildung 3.3 H.E.-Färbung (A-B) und Immunfluoreszenzfärbung mit 7-AAD (C-D) von 3D Gewebeparaffinschnitten markieren Endothel aus der Versuchsreihe mit Tipifarnib. A-B: Darstellung von Endothelzellen (blaue Zellkerne), welche alleine (A)/mit unbehandelten THP-1 kokultiviert wurden (B). C-D: Doppelfärbung mit hitzeinduzierter (C) beziehungsweise enzymatischer (D) Epitop-Demaskierung zur Darstellung des DNase vorbehandelten, TUNEL positiven (grün) Endothelzellmonolayers in rot (Anti-CD34) mit blau markierten Zellkernen (DAPI). Die Hintergrundfärbung bei hitzeinduzierter Demaskierung erscheint im Vergleich geringer.

Die Doppelfärbung mit hitzeinduzierter Demaskierung (Tabelle 2.17) wurde daraufhin an allen Paraffinschnitten durchgeführt, welche aus einer 3D Versuchsreihe mit Tipifarnib stammten (Abbildung 3.4).

3 Ergebnisse

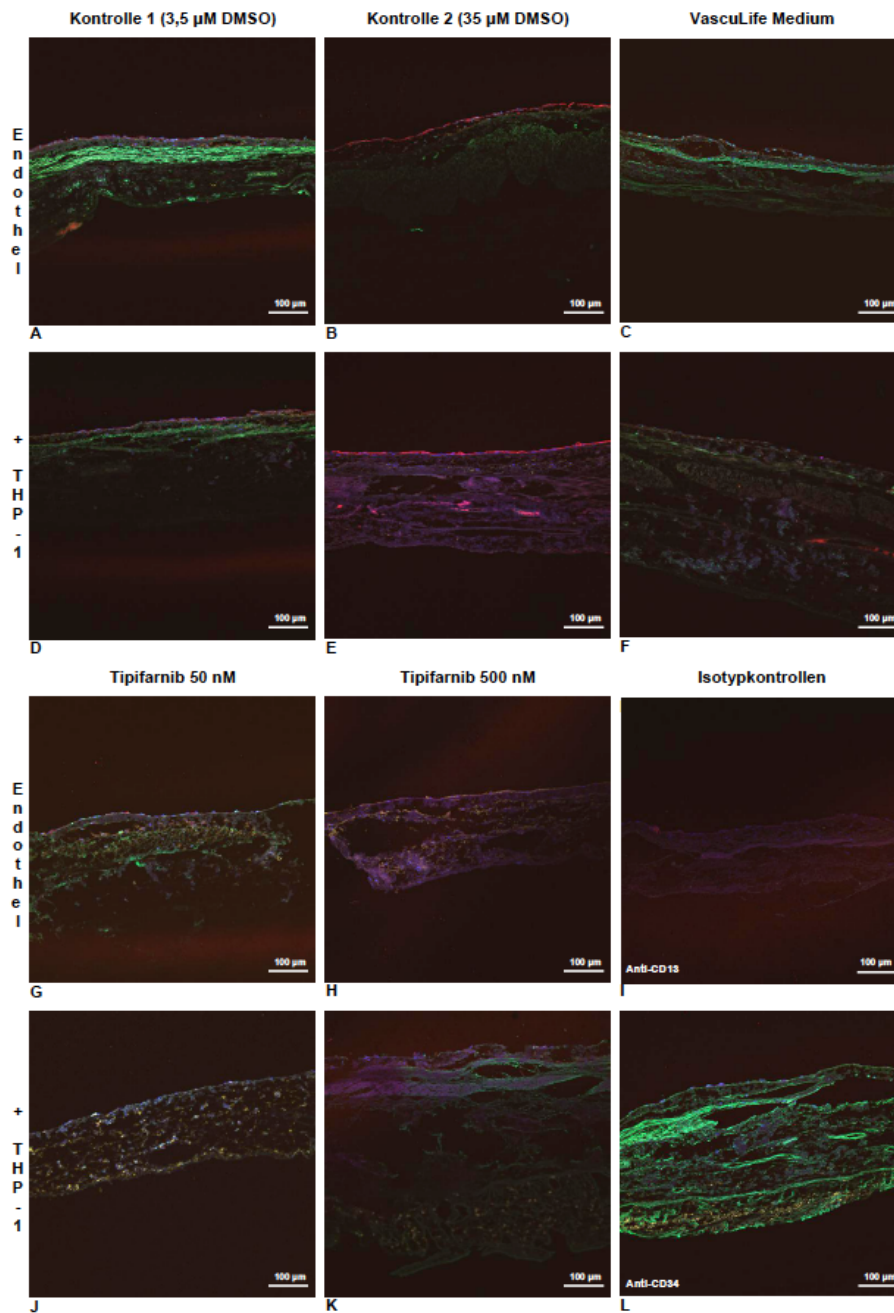


Abbildung 3.4 Mehrfachimmunfluoreszenzfärbung (Anti-CD34/-CD13) mit kombiniertem TUNEL Assay und DAPI an Paraffinschnitten aus der Versuchsreihe mit Tipifarnib zeigt eine unterschiedliche, teils sehr starke, unspezifische Hintergrundfärbung (meist seitens TUNEL (A, C, D, G, L) und Anti-CD34 (E, H, I, K), welche sich mit der Matrixtiefe ändert (A, C, L). Die unspezifische Hintergrundfärbung bestätigt sich auch in den Isotypkontrollen (I, L) und den TUNEL Kontrollen (Abbildung 3.5). Die Negativkontrollen (A, B, D, E) waren den Tipifarnib-Ansätzen entsprechend mit äquivalenten DMSO-Konzentrationen versetzt.

Fluoreszenzmikroskopisch zeigte sich eine unterschiedliche und teils sehr starke, unspezifische Hintergrundfärbung (meist TUNEL und Anti-CD34 > Anti-CD13, DAPI), welche sich auch noch mit der Matrixtiefe änderte. Die unspezifische Hintergrundfärbung bestätigte sich auch in den Isotyp- und TUNEL Kontrollen (Abbildung 3.5). Diese Tatsache impliziert folglich die nicht valide Auswertbarkeit der durchgeführten Mehrfachfärbung und machte sowohl eine eindeutige Zellklassifizierung als auch eine Interpretation des TUNEL Assays impraktikabel.

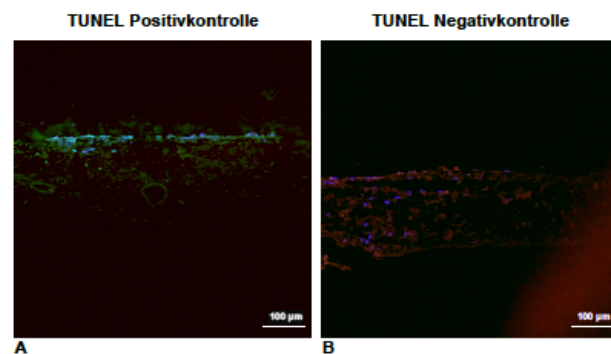


Abbildung 3.5 TUNEL Kontrollen zur Mehrfachimmunfluoreszenzmarkierung mit TUNEL Assay (Abbildung 3.4) zeigen auch eine unspezifische Hintergrundfärbung.

Die Idee, eine Zellcharakterisierung mit einem simultanen Apoptosenachweis in einem einzigen Verfahren zu kombinieren, wurde zwar verworfen, aber erfolgreich in Einzelnachweiskomponenten zerlegt: Zum Ausschluss von auf der Matrix verbliebenen und durchflusszytometrisch nicht erfassten Zellen wurde stellvertretend für alle Suspensionszellen eine Anti-CD13/DAB-Färbung durchgeführt. Diese fiel sowohl für die 3D Versuche mit Tipifarnib als auch mit Antikörperkonstrukten negativ aus (Abbildung 3.6 und 3.7). Dies zeigt, dass die THP-1 Zellen nicht in das Gewebe eingewandert sind und dass in der durchflusszytometrischen Analyse die Gesamtzahl der THP-1 Zellen erfasst wurde. Anschließend erfolgte der reine TUNEL Standard Assay (nach Herstellerangaben und Epitop-Demaskierung mit Proteinase K) zum Nachweis möglicher Kollateralschäden am Endothel.

Zur Bestätigung der Ergebnisse des TUNEL Assays wurde zusätzlich eine Anti-Annexin V/DAB-Färbung vorgenommen (Ergebnisse dazu in Kapitel 3.3 und 3.4).

3 Ergebnisse

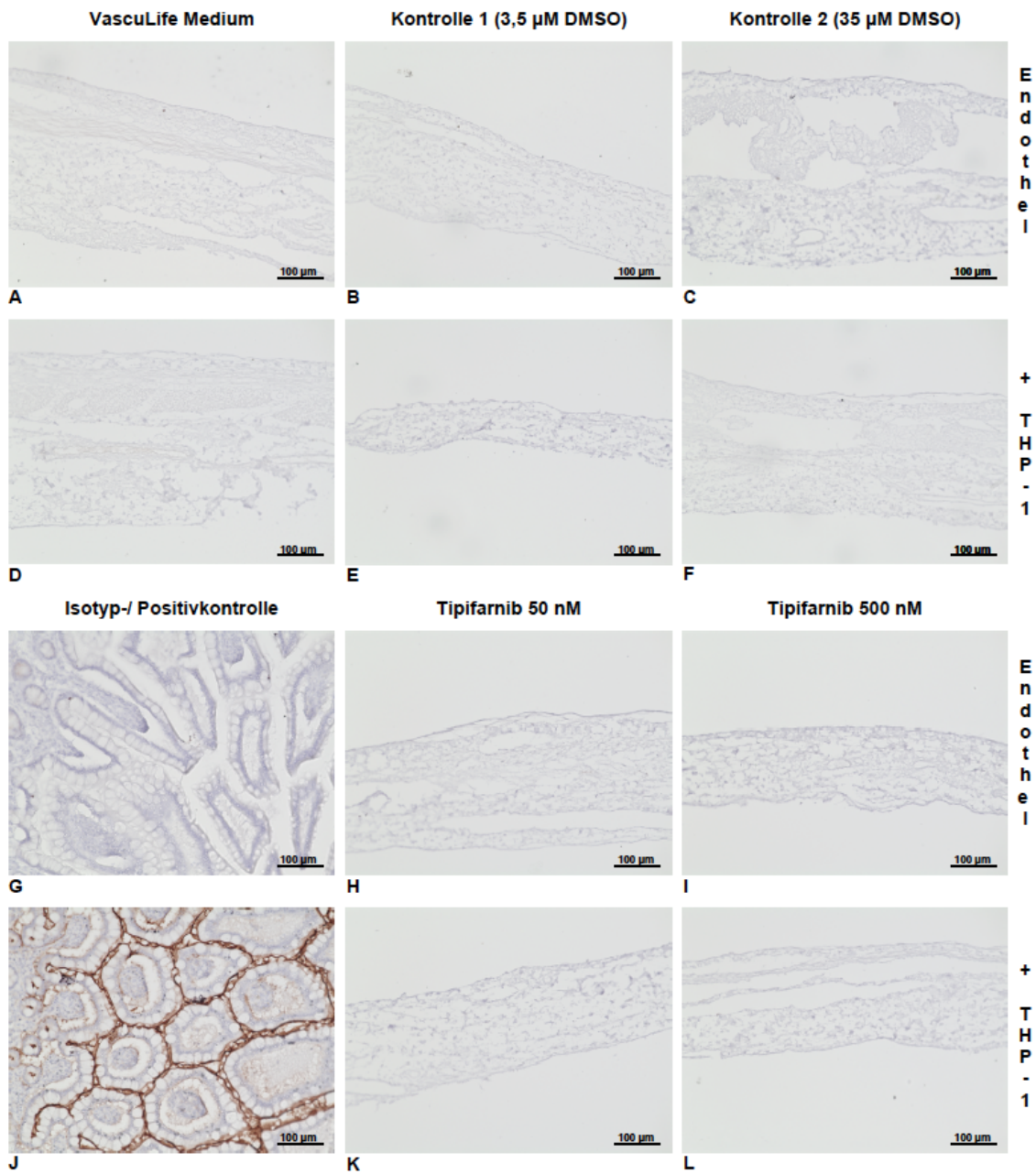


Abbildung 3.6 Anti-CD13/DAB-Färbung von 3D Gewebeparaffinschnitten aus der Versuchsreihe mit Tipifarnib fällt bis auf eine Braunfärbung im humanen Darmschleimhautpräparat (Positivkontrolle J) negativ aus. Damit sind keine THP-1 Zellen auf der Matrix verblieben.

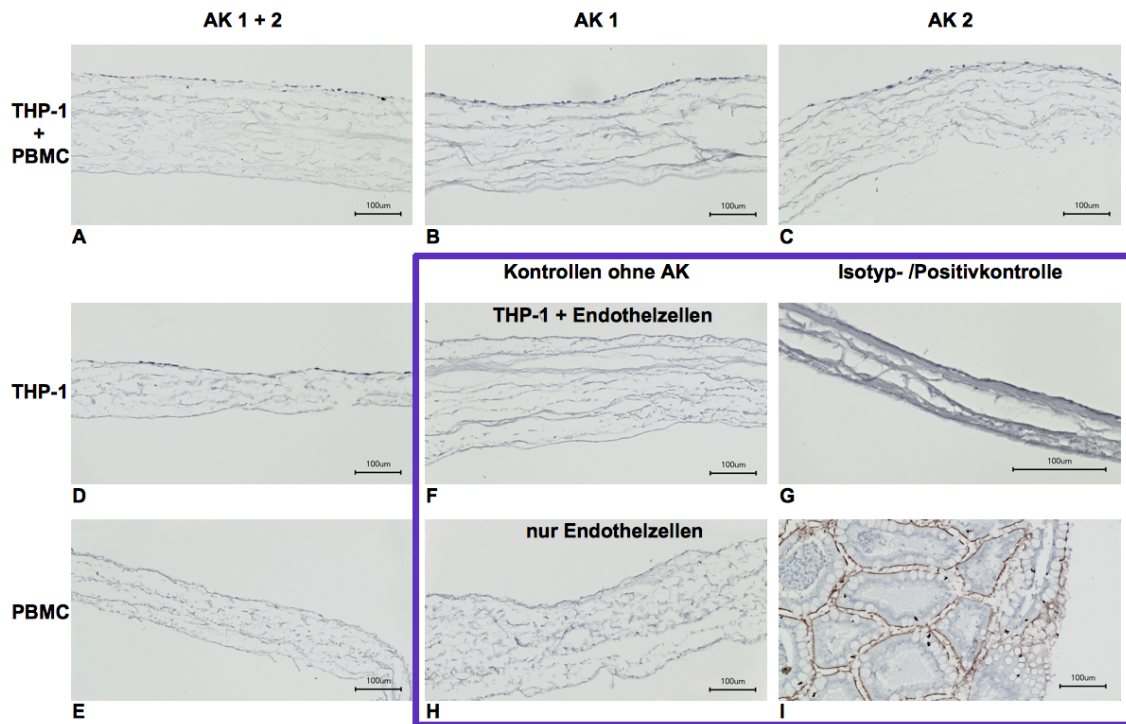


Abbildung 3.7 Anti-CD13/DAB-Färbung von 3D Gewebeparaffinschnitten aus der Versuchsreihe mit Antikörperkonstrukten fällt bis auf die Positivkontrolle (I) negativ aus.

3.3 Applikation von Tipifarnib

Nach Etablierung des humanen 3D *in vitro* Blutgefäß-/Gewebe-modells und Optimierung der Nachweismethoden konnten die Wirkstoffe zur Malignomtherapie zunächst an THP-1 Zellen in konventioneller 2D Kultur und schließlich im 3D Modell ausgetestet werden. Die Behandlungsergebnisse sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

3.3.1 Auswirkungen auf die THP-1 Zellen

Nach 5-tägiger Inkubation der 2×10^5 THP-1 Zellen mit definierten Tipifarnibkonzentrationen beziehungsweise Kontrolllösung(en) in einer 12-well Zellkulturtestplatte (2D Modell) / auf dem Endothel in Zellkronen (3D Modell) wurden die Zellen einer 7-AAD-Färbung unterzogen und durchflusszytometrisch untersucht.

Dabei waren an den THP-1 Zellen im 2D Modell dosisabhängige, antileukämische Effekte zu verzeichnen (Abbildung 3.8 links). Die Kontrolllösung (THP-1 Medium versetzt mit 70 μM DMSO, was der gleichen DMSO-Konzentration wie in 1000 nM Tipifarnib entsprach) sowie die 10 nM Tipifarnib-Lösung hatten keine Auswirkungen auf die THP-1 Zellen.

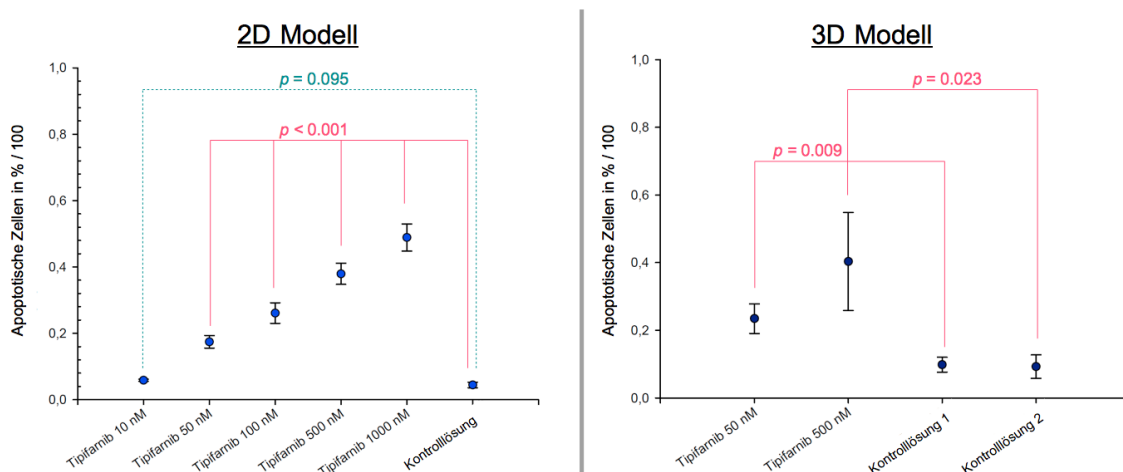


Abbildung 3.8 Durchflusszytometrische Analyse der THP-1 Zellen nach Applikation von Tipifarnib zeigt sowohl im 2D als auch im 3D Modell dosisabhängige, antileukämische Effekte. Im 2D wie im 3D zeigten sich bei 50 nM Tipifarnib etwa 20% der THP-1 Zellen apoptotisch, bei 500 nM Tipifarnib etwa 40% der Zellen. Die Kontrolllösung im 2D Modell bestand aus THP-1 Medium versetzt mit 70 μM DMSO. Die Kontrolllösungen im 3D Modell waren zusammengesetzt aus VascuLife Medium mit 3,5 μM (1) beziehungsweise 35 μM DMSO (2). Im 2D Modell wurde damit die höchste DMSO-Konzentration als Kontrolle gewählt. Im 3D Modell wurde jeweils die entsprechende Konzentration an DMSO als Kontrolle verglichen. Die p -Werte im 2D Modell wurden Bonferroni-korrigiert, $n = 4$ (2D), $n = 3$ (3D).

Im 3D Modell wurde zum einen die kleinste Tipifarnibmenge getestet, die Effekte im 2D Modell zeigte. Zum anderen wurde Tipifarnib in der (Stoffmengen-) Konzentration von 500 nM (= 244,7 ng/mL) eingesetzt, da dies in etwa der durchschnittlich erzielten Plasmakonzentration von 389 ± 162 ng/mL nach 300 mg oral verabreichtem Tipifarnib entspricht. Dabei gilt nach diversen klinische Studien eine Oraldosis von 300 mg als empfehlenswert [38, 54]. Die Kontrolllösungen bestanden aus VascuLife Medium versetzt mit 3,5 μM (Kontrolllösung 1) beziehungsweise 35 μM DMSO (Kontrolllösung 2). Die genannten DMSO-Konzentrationen waren äquivalent zu denen in 50 nM beziehungsweise 500 nM Tipifarnib. Die Kontrolllösungen 1 und

2 zeigten weder signifikante Auswirkungen auf die THP-1 Zellen, noch wiesen sie signifikante Unterschiede zu THP-1 Zellen auf, die über fünf Tage in reinem Vasculife Medium kultiviert wurden (Bonferroni-korrigierter p -Wert > 0.7). An den mit Tipifarnib behandelten Zellen aus dem 3D Modell konnte dagegen erneut ein dosisabhängiger, antileukämischer Effekt bestätigt werden (Abbildung 3.8 rechts).

Zusammenfassend hatten die Kontrolllösungen keinen Einfluss auf die THP-1 Zellen, während die Tipifarnib-Ansätze sowohl im 2D als auch im 3D Modell äquivalente antileukämische Effekte auf die THP-1 Zellen zeigten.

3.3.2 Auswirkungen auf das 3D Blutgefäß-/Gewebemodell

Nach Abnahme der Suspensionszellen für die Durchflusszytometrie wurden die 3D Gewebemodelle in Paraffin eingebettet und einer feingeweblichen Untersuchung unterzogen, um festzustellen, ob das Endothel durch die Behandlung eine Schädigung erlitten hatte. Die Zellkerne der eingebetteten Zellen wurden via DAPI blau eingefärbt. Die Endothelzellen, welche durch die Behandlung einen DNA-Einzel- oder -Doppelstrangbruch erlitten hatten, wurden zusätzlich mittels TUNEL Assay grün markiert.

Bei Applikation von reinem Vasculife Medium zeigte sich in den Negativkontrollen ein konstanter Endothelzellmonolayer auf der Oberfläche der Matrix (Abbildung 3.9 A und D). Die Kontrolllösungen 1 und 2, welche mit DMSO versetzt waren, führten zu einer konzentrationsabhängigen Schädigung des Endothelzellmonolayers mit Lückenbildung (Abbildung 3.9 B, C, E und F). Daher kann nach Anwendung der Tipifarnib-Lösungen retrospektiv der Einfluss von DMSO und Tipifarnib auf die Gewebeschädigung nicht genau unterschieden werden. Denn auch die Behandlung mit Tipifarnib-Lösung führte zu einer dosisabhängigen Destruktion des ursprünglichen Endothelzellmonolayers (Abbildung 3.9 G, H, J und K). Außerdem zeigte sich in diesen Gewebeschnitten eine verstärkte Invasion und Durchwanderung der SIS-Ser-Matrix mit Endothelzellen (insbesondere Abbildung 3.9 H und K). Die TUNEL Kontrollen (Abbildung 3.9 I und L) bestätigten die Funktionalität des durchgeführten TUNEL Assays.

3 Ergebnisse

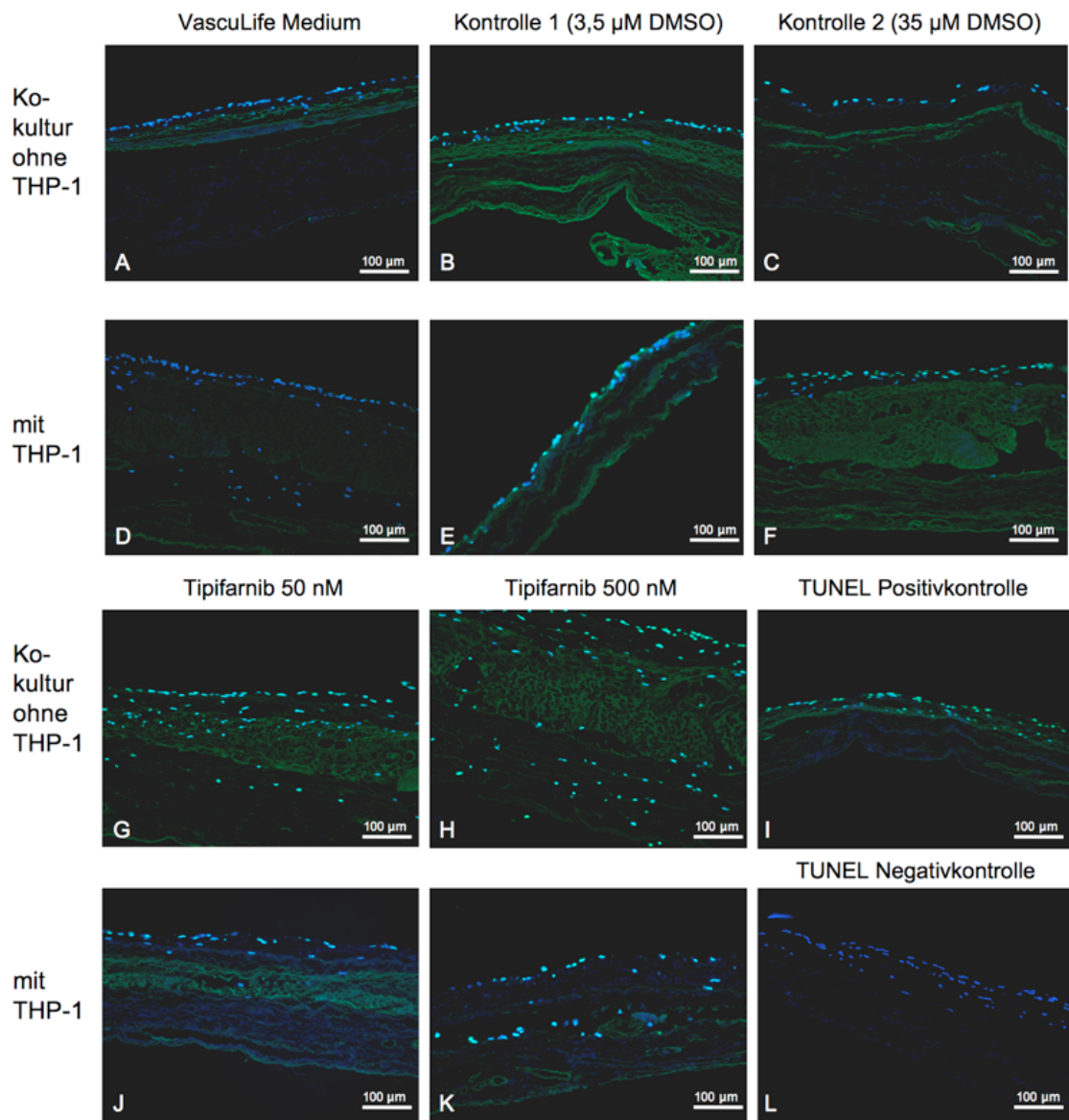


Abbildung 3.9 TUNEL Assay nach Applikation von Tipifarnib zeigt eine Endothelschädigung im 3D Modell. Die Zellkerne sind via DAPI blau, geschädigte Endothelzellen via TUNEL grün markiert. Die Negativkontrollen mit Anwendung von reinem VascuLife Medium zeigen einen konstanten Endothelzellmonolayer auf der Oberfläche der Matrix (A, D). Die mit DMSO versetzten Kontrolllösungen führten zu einer konzentrationsabhängigen Endothelzellschädigung (B, C, E, F). Aus der Applikation von Tipifarnib-Lösungen resultierte nicht nur eine dosisabhängige Destruktion des Endothels, sondern auch eine verstärkte Durchwanderung der SIS-Ser mit Endothelzellen (G, H, J, K). Die TUNEL Positivkontrolle stellt die mit DNase vorbehandelte Gewebeschnitte grün dar (I). In der TUNEL Negativkontrolle kommt lediglich die blaue Zellkernmarkierung durch DAPI zur Geltung (L).

Zur Bestätigung der Ergebnisse des TUNEL Assays wurde ferner eine Anti- Annexin V/DAB-Färbung durchgeführt (Abbildung 3.10). Diese unterstrich im weitesten Sinne die Ergebnisse des TUNEL Assays, indem sie einen (frühen) schädigenden Effekt von Tipifarnib/DMSO in hohen Konzentrationen braun visualisierte (Abbildung 3.10 H, K > G, J).

Die Positivkontrolle der Annexin V-Färbung wurde an einem Darmschleimhautpräparat vorgenommen, da die Apoptose (braun dargestellt) physiologischerweise bei dem Epithelumsatz in der gastrointestinalen Schleimhaut eine große Rolle spielt.

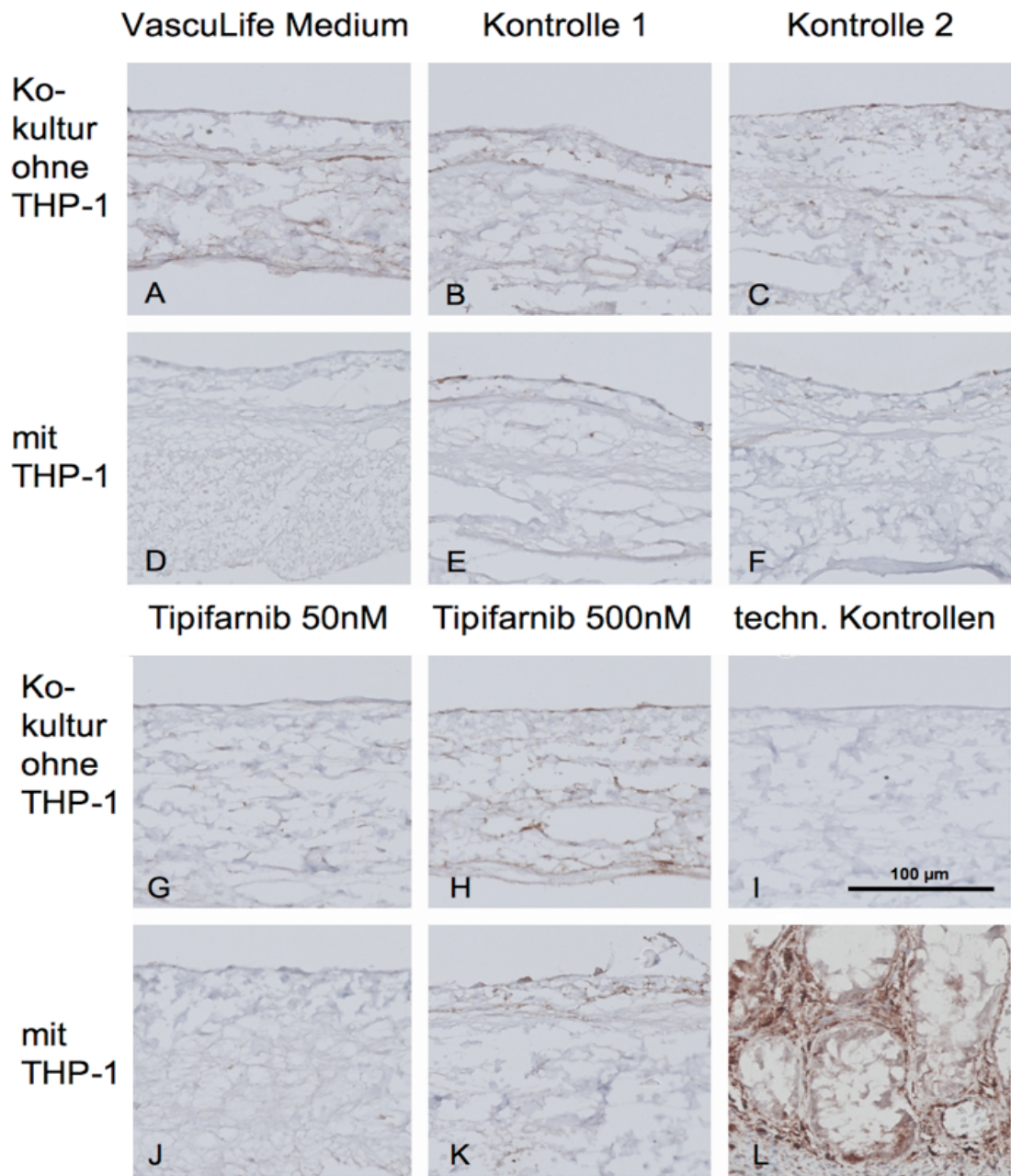


Abbildung 3.10 Anti-Annexin V/DAB-Färbung zeigt eine frühe Apoptose in Endothelzellen nach Behandlung mit Tipifarnib/DMSO. Die Negativkontrollen mit VascuLife Medium visualisieren apikal einen ungefärbten und konstanten Endothelzellmonolayer (A, D). Die Inkubation mit Kontrolllösungen führte zu einer geringen Endothelzellschädigung (Braunfärbung bei B, C, E, F). Die Applikation von Tipifarnib/DMSO ergab, wie beim TUNEL Assay, eine dosisabhängige Endothelzellschädigung (H, K > G, J). Die technische Positivkontrolle wurde an einem Darmschleimhautgewebe mit physiologisch erhöhter Apoptoserate durchgeführt (L). I stellt die technische Negativkontrolle (mit Isotypen) dar.

3.4 Applikation von T-Zell-rekrutierenden Antikörperkonstrukten

3.4.1 Auswirkungen auf die THP-1 Zellen

Analog zu den Versuchen mit Tipifarnib wurden die THP-1 Zellen einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen, nachdem sie über 24 Stunden mit der gleichen Anzahl an PBMCs und, je nach Versuchsansatz, mit keinem, einem oder beiden Antikörperkonstrukt(en) in einer 12-well Zellkulturtestplatte (2D Modell) / auf dem Endothel in Zellkronen (3D Modell) inkubiert worden waren. Innerhalb der untersuchten Suspensionzellen war primär die Apoptoserate in THP-1 Zellen von Interesse. Daher wurden diese durchflusszytometrisch gegatet und anschließend graphisch dargestellt.

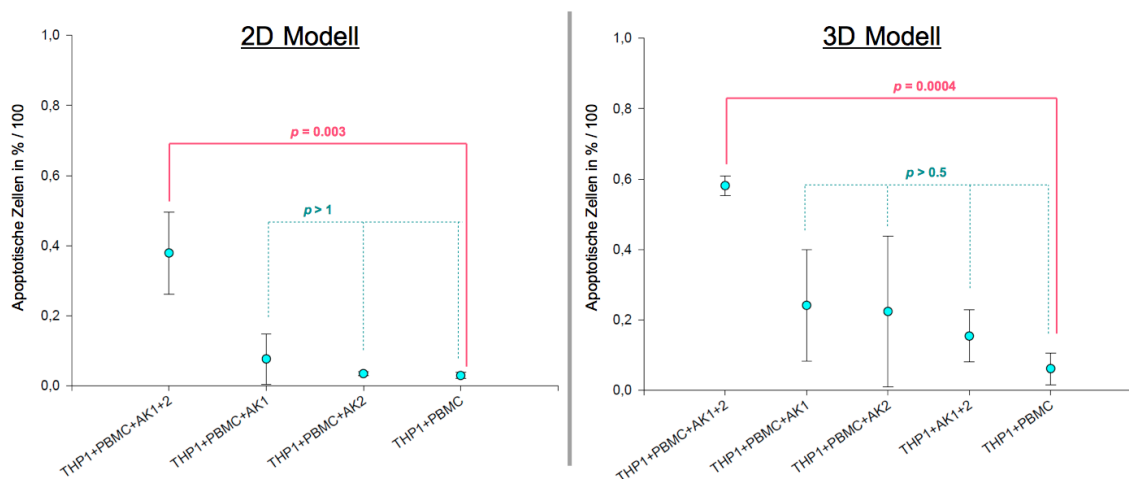


Abbildung 3.11 Durchflusszytometrische Analyse der THP-1 Zellen (gegatet) nach Applikation von Antikörperkonstrukten zeigt sowohl im 2D als auch im 3D Modell nur bei Kombination beider Antikörperkonstrukte signifikante Auswirkungen auf die THP-1 Zellen. Alle anderen Versuchsansätze hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Apoptoserate von THP-1 Zellen. Alle in der Abbildung angegebenen p -Werte wurden Bonferroni-korrigiert. $n = 3$ (2D und 3D).

Die THP-1 Zellen im 2D Modell wiesen nur bei Applikation beider Antikörperkonstrukte eine signifikante Apoptoserate mit einem Mittelwert von 38% auf (Abbildung 3.11 links). Sowohl bei Gebrauch von nur jeweils einem Antikörperkonstrukt als auch

bei völliger Abwesenheit von Antikörpern zeigten sich keine signifikanten antileukämischen Auswirkungen auf die THP-1 Zellen. Im 3D Modell ließ sich die spezifische Wirksamkeit beider Antikörperkonstrukte sogar mit einer noch höheren Apoptose rate (Mittelwert von 58%) bestätigen (Abbildung 3.11 rechts). Die Versuchsansätze mit Einsatz je eines Antikörperkonstruktes beziehungsweise beider Antikörperkonstrukte aber ohne PBMCs unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrolle mit THP-1 Zellen und PBMCs ohne Hemibodies. Im 2D wie im 3D Modell betrug die Anzahl der Versuchswiederholungen drei ($n = 3$).

3.4.2 Auswirkungen auf das 3D Blutgefäß-/Gewebemodell

Die 3D Gewebemodelle wurden in Analogie zu den Versuchen mit Tipifarnib einer histologischen Untersuchung mithilfe von DAPI (Zellkerndarstellung blau) und TUNEL Assay (DNA-Strangbruchmarkierung grün) unterzogen.

In den Negativkontrollen (Inkubation von Endothelzellen gegebenenfalls mit THP-1 Zellen und PBMCs in reinem VasuLife Medium) bildet sich jeweils ein nahezu konstanter Endothelzellmonolayer ab (Abbildung 3.12 H und I). Auch die anderen Versuchsansätze mit Kokultivierung von Endothelzellen mit THP-1 Zellen, gegebenenfalls PBMCs und Zugabe von Antikörperkonstrukt(en) lassen keinen schädigenden Einfluss auf den Endothelzellmonolayer erkennen (Abbildung 3.12 A bis D). Lediglich die Kokultur von Endothelzellen mit PBMCs (ohne THP-1 Zellen) und Einsatz beider Antikörperkonstrukte ergab uneindeutige Ergebnisse bei $n = 3$. Der Endothelzellmonolayer erscheint in diesen Versuchsansätzen sowohl intakt und unbeeinflusst (Abbildung 3.12 E) als auch lückenhaft (Abbildung 3.12 F) und zusätzlich apoptotisch (Abbildung 3.12 G). Die TUNEL Kontrollen sind zur Bestätigung der Funktionalität des durchgeführten TUNEL Assays abgebildet (Abbildung 3.12).

In der zusätzlich durchgeführten Anti-Annexin V/DAB-Färbung ließ sich in keinem der Gewebeschnitte (ausgenommen die Positivkontrolle mit Darmschleimhautzellen) eine frühe Apoptose nachweisen (Abbildung 3.13).

3 Ergebnisse

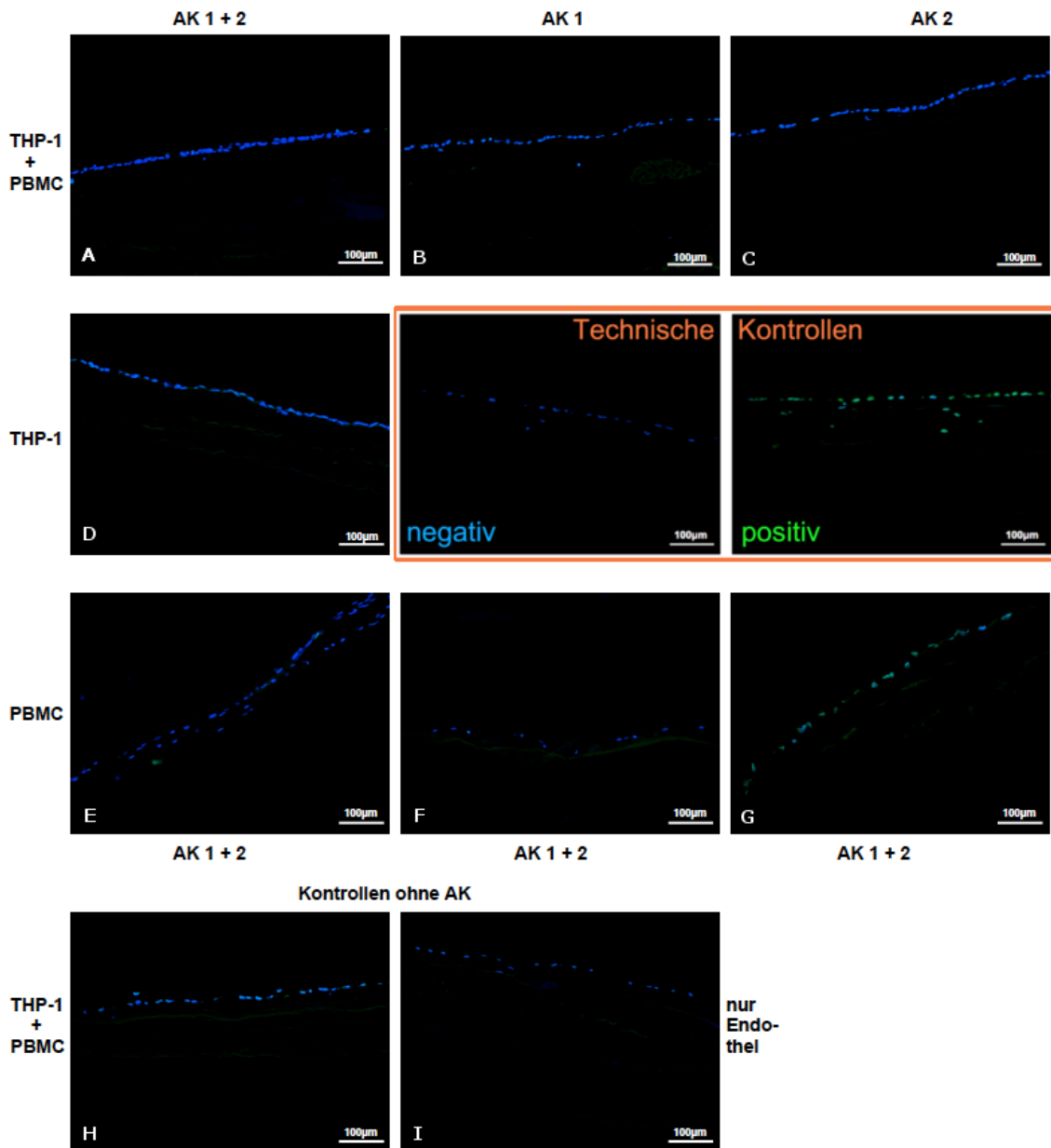


Abbildung 3.12 TUNEL Assay nach Applikation von beiden Antikörperkonstrukten zeigt keine Endothelschädigung im 3D Modell. Die Zellkerne sind via DAPI blau, geschädigtes Endothel via TUNEL grün markiert. Die Kokultivierung von Endothelzellen mit THP-1 Zellen, gegebenenfalls PBMCs und Zugabe von Antikörperkonstrukten (A-D) lässt im Vergleich zu den Negativkontrollen ohne Antikörperkonstrukte (H, I) keinen schädigenden Einfluss auf den Zellmonolayer erkennen. Lediglich die Kokultur von Endothelzellen mit PBMCs (ohne THP-1 Zellen) und Einsatz beider Antikörperkonstrukte (E-G) zeigt zum Teil schädigende Auswirkungen auf das Endothel (G > F). In der TUNEL Negativkontrolle kommt die blaue Zellkernmarkierung durch DAPI zur Geltung. Die TUNEL Positivkontrolle stellt die mit DNase vorbehandelte Gewebeschnitte grün dar.

3 Ergebnisse

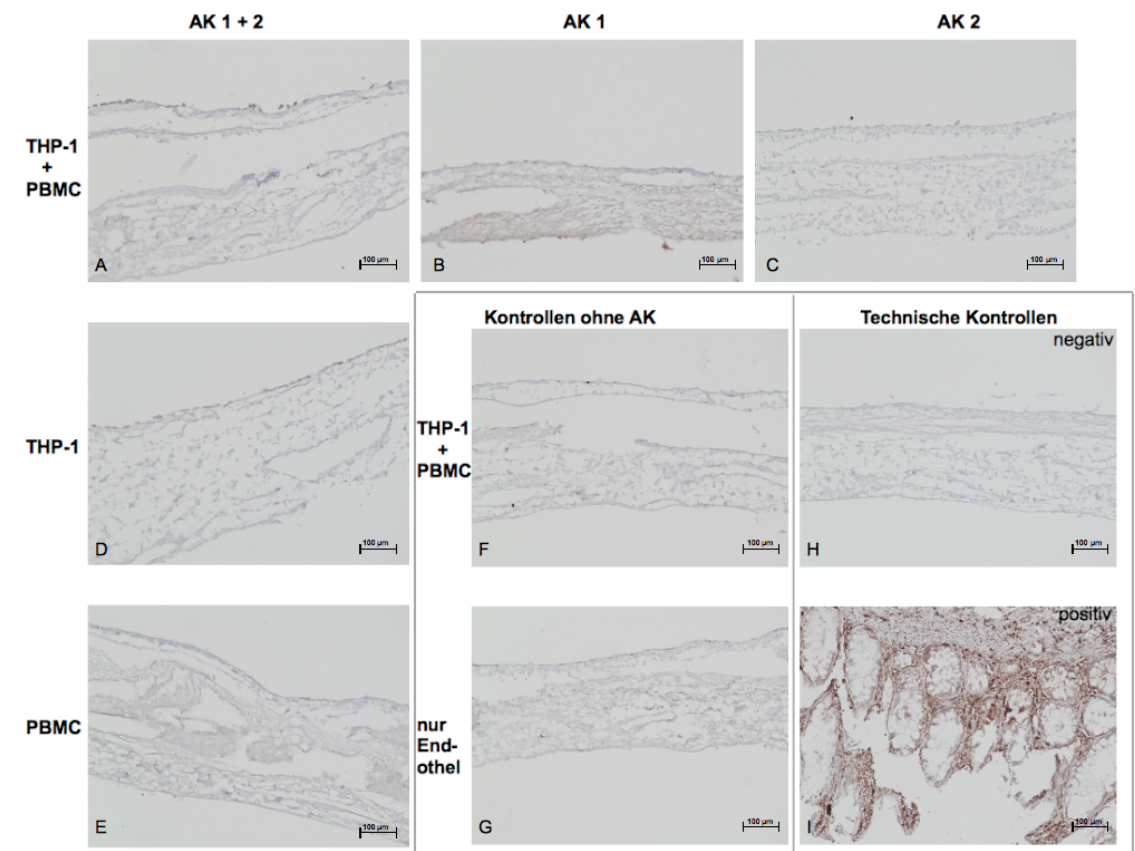


Abbildung 3.13 Anti-Annexin V/DAB-Färbung nach Applikation von Antikörperkonstrukten zeigt keine Apoptose in Endothelzellen. Mit Ausnahme der Positivkontrolle (Braunfärbung) ließ sich in keinem der Gewebeschnitte eine frühe Apoptose im Endothelzellmonolayer auf der Oberfläche der Matrix nachweisen (A-G). Die technische Positivkontrolle (I) wurde an einem Darmschleimhautgewebe durchgeführt. H stellt die technische Negativkontrolle dar.

4 Diskussion

In Ermangelung suffizienter präklinischer Testsysteme [8] erfolgte in dieser Arbeit der Aufbau eines humanen 3D *in vitro* Blutgefäß-/Gewebe-modells, an welchem präklinisch zwei verschiedene Therapeutika zur Leukämiebehandlung ausgetestet wurden. Diesem Vorgehen war die Etablierung der Einzelkomponenten des 3D Testsystems vorangestellt, auf welche im Folgenden genauer eingegangen werden soll. Anschließend wird das Gesamtsystem inklusive Analysemethoden kritisch beurteilt.

4.1 Etablierung eines 3D *in vitro* Blutgefäß-/Gewebe-modells

Für den Aufbau des humanen 3D *in vitro* Modells war die Auswahl von geeigneten (Leukämie-)Zellen ein essentieller Bestandteil. Da zwei verschiedene potentielle Therapeutika anhand des 3D Testsystems verifiziert werden sollten, mussten die Zellen entsprechend darauf abgestimmt sein und gewisse Eigenschaften erfüllen: Laut Weinberg und Goemans et al. zeigten sich die Zellen der AML(-M5)-Linie am empfindlichsten gegenüber Tipifarnib, auch wenn der Wirkmechanismus im Detail noch ungeklärt ist [37, 42]. Im Vergleich dazu sollten die bimolekularen Antikörperkonstrukte ausgetestet werden, welche die Expression ihrer spezifischen Epitope HLA-A2 und CD45 auf den Zielzellen voraussetzten. Aufgrund der Kokultivierung von Zielzellen mit PBMCs als Effektorzellen für die zellvermittelte Zytotoxizität mussten sich die behandelten Leukämiezellen zusätzlich immunphänotypisch eindeutig von den vorhandenen Suspensionszellen im Testsystem unterscheiden.

Die aus der AML-M5-Reihe stammenden THP-1 Zellen, welche bereits in Studien hinsichtlich Wirksamkeit von Tipifarnib überprüft wurden [39, 59], waren leicht bei der DSMZ inklusive Charakterisierung erhältlich und erfüllten die genannten Kri-

terien (Kapitel 3.1.1). Dabei stimmten die durchflusszytometrisch erhobenen Daten aus dieser Arbeit zuverlässig mit denen aus der Literatur [17, 52] überein. Somit eignete sich die THP-1 Zelllinie sowohl für die Austestung von Tipifarnib als auch von Antikörperkonstrukten. Bei durchflusszytometrischer Unterscheidung der behandelten THP-1 Zellen von den PBMCs mittels CD13 war ein gewisser Störfaktor zu beachten, da die PBMCs selbst zu etwa 8% CD13+ waren. Dadurch, dass die verwendeten PBMCs lediglich von einem Spender stammten und vor Gebrauch gut durchmischt wurden, konnte diese Störvariable für alle Versuchswiederholungen mit Antikörperkonstrukten als annähernd konstant angesehen werden. Anstatt der genannten Zelllinie wäre auch der Einsatz von primären Leukämiezellen unter entsprechenden Kriterien denkbar. Dabei müsste wahrscheinlich, gesehen auf die Gesamtheit der Versuchswiederholungen, mit einer höheren Variabilität in der Replizierbarkeit gerechnet werden. Grund hierfür ist eine Beschränkung in der Passagenanzahl für Primärzellen. Bei einer kürzeren Zellkulturphase unterliegen primäre Zellen dagegen keinem Selektionsdruck mit konsekutiven genetischen Mutationen und könnten womöglich die *in vivo* Situation besser widerspiegeln. Hierzu gibt es ebenfalls Veröffentlichungen, welche die Überschätzung dieses Effekts in Zelllinien diskutieren. So konnten Wang et al. durch vergleichende Genexpressionsanalysen zeigen, dass teilweise auch nach jahrelanger Zellkultur 51 (darunter auch mehrere Leukämiezelllinien) der 59 untersuchten NCI60 Zelllinien ihren mutmaßlichen Ursprungstumor repräsentierten [24]. Setzt man diese Erkenntnis für die THP-1 Zelllinie voraus [60], eignet sich die bereits 1978 etablierte, gut charakterisierte und stabile Zelllinie für eine ökonomische und schnelle Wirksamkeitsprüfung der zu testenden Therapeutika [20].

Für das humane 3D *in vitro* Gewebemodell ist neben der Zellkomponente auch eine geeignete Trägerstruktur von Bedeutung. Dafür wurde das physiologische Verhalten von Calcein Red markierten Endothelzellen auf unterschiedlichen Matrices herangezogen. Konfokalmikroskopisch konnte gezeigt werden, dass das Endothel nach 14-tägiger Kultur auf der luminalen, ehemaligen Mukosaseite der SIS-Ser als lückenhaft erschien, während es auf der abluminalen, (ehemaligen) Serosaseite einen nahezu konfluenten Monolayer ausbildete. Die dabei angewandte Analysemethode ist qualitativer Art und untersucherabhängig. Hodde et al. führten quantitative Analysen

zur Adhärenz von radioaktiv markierten, humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMECs, *engl.* human microvascular endothelial cells) durch, indem diese für 20 Minuten auf je einer Seite der SIS inkubiert, anschließend abtrypsiniert und in den Flüssigszintillationszähler überführt wurden. Dabei adhärten $16,5\% \pm 1,8\%$ der Zellen von der ehemaligen Mukosaseite im Vergleich zu $22,1\% \pm 4,8\%$ der Zellen von der ehemaligen Serosaseite, wobei die Unterschiede in den Messwerten als nicht signifikant bewertet wurden [61]. Mit einer ähnlichen histologischen Methode zeigte die Arbeitsgruppe in der gleichen Publikation, dass die HMECs nach 7-tägiger Zellkultur einen konfluenten Monolayer auf beiden Seiten der SIS ausbilden konnten. Allerdings war dabei auf der abluminalen SIS-Seite gelegentlich Zellinvasion und Rebesiedlungen von ehemaliger Gefäßstrukturen zu sehen. Die beschriebene Zellinvasion nach Besiedlung der ehemaligen Serosaseite ist kritisch zu bewerten, da sie im Widerspruch zu bisherigen, vergleichbaren *in vitro* Studien [34] steht. Im Bezug auf Tiermodelle gibt es jedoch Übereinstimmungen mit alten experimentellen Studien über rezellularisierte Transplantate [62, 63].

Ausschlaggebender für das Anwachsen und die Ausbildung eines konfluenten Endothelzellmonolayers auf der Matrixoberfläche könnte vielmehr die qualitative Beschaffenheit der EZM sein. So konnten Badylak et al. zeigen, dass die Adhärenz von HMECs signifikant von einem guten Hydrierungszustand der SIS abhängig war [64]. Dieser Zustand hängt wiederum von der Matrixschicht und deren Permeabilität für Flüssigkeiten ab. Ferrand et al. kamen zu dem Ergebnis, dass die Permeabilität für Flüssigkeiten von der (locker organisierten) Serosa- zur (dichten) Mukosaseite um circa das vierfache größer war als in umgekehrter Richtung [65]. Die Permeabilität verhielt sich dabei reziprok zu der Testdauer und war nicht vom Ausgangsgewicht des Schweines abhängig, von welchem die SIS stammte. In diesem Kontext erscheint die Verwendung der SIS mit erhaltener Serosa (SIS-Ser) und Besiedlung derselben als logisch: Die Serosa dient den Endothelzellen mit ihrem einschichtigen Plattenepithel, welches auf der Lamina propria serosae verankert ist [66], als Leitstruktur für die Ausbildung eines ebenen Monolayers. Dahingegen wird das Anwachsen sowie die Versorgung der Zellen über eine gute Permeabilität der Serosaseite sichergestellt. Bei gleich guten konfokalmikroskopischen Ergebnissen hinsichtlich Besiedlung der Serosaseite beziehungsweise der ehemaligen Serosaseite der SIS in dieser Arbeit, könnte

der Einfluss der Serosa als Leitstruktur auch überschätzt werden.

Die Besiedlung der SIS-Ser mit humanen Endothelzellen in einer Zellkrone und anschließender Kokultur mit THP-1 Zellen und gegebenenfalls PBMCs stellt ein statisches 3D Gewebemodell dar. Es berücksichtigt im Vergleich zum 2D Modell die Ausbildung einer physiologischeren 3D Mikroumgebung für Zellen in ihrem umgebenden Stroma und zum Teil in unterschiedlichen Kompartimenten mit verschiedenartigen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten. Da bis auf die EZM alle Bestandteile humanen Ursprungs sind, ist im Gegensatz zu Tiermodellen nicht mit artspezifischen Interferenzen zu rechnen. Das statische 3D Modell ist relativ kostengünstig, schnell herstellbar, kann modular um zusätzliche zelluläre Komponenten erweitert werden und ist einfach in der Handhabung. Mit Hilfe von diesem können Zellkulturbedingungen leicht verändert und deren Auswirkungen auf die Zellbiologie beobachtet werden. Des Weiteren kann die Wirksamkeit von Testsubstanzen untersucht werden, indem diese dem Medium zugesetzt werden. Das etablierte Gewebemodell stellt somit ein komplexes humanes *in vitro* Testmodell dar und kann zur Verbesserung von präklinischen Modellen zur Erforschung neuer Substanzen beitragen. Die Untersuchung gewisser pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Eigenschaften der Testsubstanz ist im *in vitro* System allerdings zum Beispiel durch die fehlenden Entgiftungsorgane erschwert. Auch über physikalische Einflüsse, wie beispielsweise Scherkräfte, welche im blutdurchflossenen Gefäßsystem vorkommen, oder Metastasierungswege und das Immunsystem können keine Aussagen getroffen werden. Eine Abhilfe könnte hier zum Beispiel die Implementierung der bereits genannten BioVaSc als Trägerstruktur schaffen. Sie ermöglicht das Verhalten von im ehemaligen Darmlumen angesiedelten Zellen unter dynamischen Zellkulturbedingungen bei guter Zellversorgung über eine nahezu intakte Gefäßstruktur zu studieren [50, 51]. Damit wären auch Aussagen zur Angiogenese und Metastasierung denkbar. Bindet man in das humane 3D *in vitro* Tumormodell statt Zelllinien noch primäre Malignomzellen aus Biopsien ein, könnte man der *in vivo* Situation noch ein Stück näher kommen und die Vision von einer personalisierten Medizin vorantreiben.

4.2 Nachweismethoden

4.2.1 Durchflusszytometrie

Die Apoptoserate der mit Hemibodies inkubierten THP-1 Zellen aus den 2D und 3D Modellen sollte initial durch eine Mehrfachimmunphänotypisierung zur exakten Unterscheidung der behandelten THP-1 Zellen von den PBMCs in Kombination mit einer 7-AAD-Färbung zum Apoptosenachweis ermittelt werden. Im Vergleich zu den Tipifarnib-Versuchen mit alleiniger 7-AAD-Markierung von THP-1 Zellen konnte ein selektiver Zellverlust detektiert werden, der primär auf die vielen Wasch- und Zentrifugierschritte (insgesamt fünf) bei der Immunphänotypisierung zurückgeführt wurde (Kapitel 3.2.1).

Diese Beobachtung und Interpretation geht konform mit den Ergebnissen aus bisherigen Publikationen: Pro Waschschrift können selbst unter optimalen Bedingungen 10% der Zellen verloren gehen, darunter insbesondere solche, die klein (auch ein Merkmal apoptotischer Zellen [67]) oder weniger kompakt sind [68]. Eine damit in Verbindung stehende Leukozytenadhärenz am FC-Tube kann zusätzlich durch Polystyrol (auch Bestandteil der FC-Tubes in dieser Arbeit), das Fehlen von Proteinen im Waschpuffer, den Zusatz von Fixanzien und die Zentrifugalkraft (beim Zentrifugieren) verstärkt werden [69]. Wird in der Summe auf viele Wasch- und Zentrifugierschritte verzichtet, spart man sich neben der Arbeitszeit und dem Zellverlust auch die dabei anfallende Kosten [69, 70]. Nachteile sind eine höhere Hintergrundfärbung durch frei schwimmende Fluoreszenzfarbstoffe und Zelltrümmer sowie eine schlechtere Signalunterscheidung bei Mehrfachfärbungen und schwach exprimierten Epitopen [69, 71]. Daher wird einmaliges Waschen zur Hintergrundreduktion als suffizient angesehen, während mehrere Waschschriffe nicht die Qualität verbessern, sondern zu einem signifikanten Zellverlust führen [68, 71]. Wie in anderen Versuchen gezeigt [72, 73], konnten die THP-1 Zellen auch in dieser Arbeit mittels FSC, SSC und entsprechenden Kontrollen gut von den restlichen Suspensionszellen unterschieden werden. Zugunsten eines selektiven Zellverlustes konnte folglich auf eine Immunphänotypisierung mit weiteren Wasch- und Zentrifugierschritten verzichtet werden.

Es blieb lediglich bei einer Markierung von behandelten THP-1 Zellen mit 7-AAD

zum Apoptosenachweis. Diese Färbemethode bietet viele Vorteile [74]: Sie setzt keine Wasch- oder andere Vorbereitungsprozedere voraus und ist daher nicht nur schnell und ökonomisch, sondern ermöglicht den Zellen ihren aktuellen Zustand (zum Beispiel vital, apoptotisch oder nekrotisch) für eine gewisse Zeit beizubehalten. Womöglich geht dies im Vergleich zu anderen Nachweismethoden mit einer zuverlässigeren Quantifizierung von apoptotischen beziehungsweise absterbenden Zellen einher.

Da das für intakte Membranen impermeable 7-AAD sowohl spät apoptotische als auch tote Zellen markiert, wäre zum Beispiel eine simultane Annexin V-Färbung hilfreich, mit der vitale von apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden können [67, 74]. Die entsprechende Doppelfärbung wurde in dieser Arbeit vernachlässigt, sodass keine differenzierte Aussage bezüglich nekrotischen und apoptotischen Zellen in der Durchflusszytometrie getroffen werden kann. Bei einer Mehrfachimmunfluoreszenzfärbung gilt es ferner, eine gewisse Überlappung der Emissionsspektren von PE und 7-AAD zu beachten. Diese sollte jedoch keine Beeinträchtigung darstellen, wenn sie bei der Geräteeinstellung vor der Messung berücksichtigt wird [74]. Werden dementsprechend bestimmte Aspekte (Überlappungsspektrum mit anderen Farbstoffen, angemessenes Zeitintervall bis zur Messung der Apoptose) beachtet, kann 7-AAD allein zur Ermittlung der Apoptose ausreichen, wie beispielsweise die Arbeitsgruppen Donner et al. und Prieto et al. zeigen konnten [75, 76].

4.2.2 Histologie

Die therapeutisch eventuell bedingten Nebenwirkungen am Endothel sollten ursprünglich mithilfe einer Mehrfachimmunfluoreszenzfärbung zur Zellcharakterisierung (Anti-CD34/-CD13, DAPI) und einem simultanen Apoptosenachweis (TUNEL) dargestellt werden. Nach der beschriebenen Doppelfärbung mit hitzeinduzierter Epitop-Demaskierung bei einem pH-Wert von 6 zeigte sich jedoch teilweise eine prominente Anfärbung von Kollagenfasern (grünes subendotheliales Band) sowie eine unterschiedlich starke und unspezifische Hintergrundfärbung, welche einer validen Auswertung entgegen stand (Kapitel 3.2.2, Abbildung 3.4).

Auch in heutiger Zeit stellt das optimale Protokoll für den Apoptosenachweis eine Herausforderung dar. Der programmierte Zelltod ist ein komplexer Vorgang. Die Zellen aus der gleichen Population können nach Apoptoseinduktion unterschiedlich

schnell in die Apoptose eintreten und unterschiedlich lang in verschiedenen Stadien verharren [77, 78, 79]. Daher ist ein erfolgreicher Apoptosenachweis vom richtigen Zeitpunkt abhängig und gestaltet sich für die Detektionssysteme, die auf bestimmte Apoptosestadien fokussiert sind, als schwierig (Abbildung 4.1).

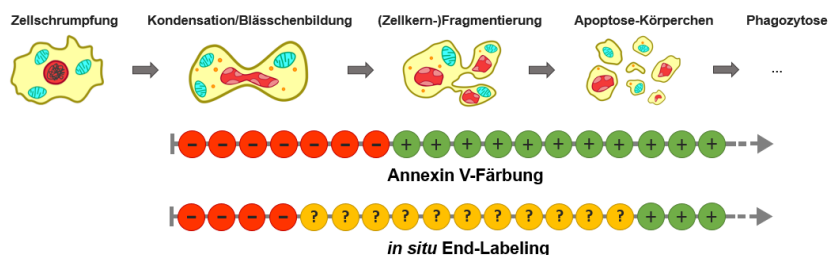


Abbildung 4.1 Apoptosedetektion durch verschiedene *in situ* Assays im Zusammenhang mit morphologischen Veränderungen. Da die End-Labeling Methode beispielsweise sehr von Fixations- und Vorbereitungsprozedere beeinflusst werden kann, wurden in bisherigen Studien unterschiedliche Zeitpunkte für einen positiven Signalumschlag (+) angegeben [79].

Selbst wenn der Nachweis positiv ausfällt, ist Vorsicht bei der Interpretation geboten. Der TUNEL Assay ist nur eingeschränkt in der Lage, Apoptose von Nekrose zu unterscheiden, da DNA-Strangbrüche nicht apoptosespezifisch sind [79]. Fällt der Assay negativ aus, könnte das nicht nur an einer fehlenden Apoptose, sondern auch an einer Quervernetzung der Proteine nach Formalinfixierung liegen, welche mit einer Substrat-Unzugänglichkeit für die TdT einhergeht [79, 80, 81]. Um das Problem zu lösen, wird beispielsweise vor einer Immunfluoreszenzfärbung oder dem TUNEL Assay eine Epitop-Demaskierung empfohlen. Diese verbessert generell nicht nur die Spezifität und Reproduzierbarkeit von Ergebnissen, sondern erlaubt auch höhere Antikörperverdünnungen mit potentiell niedrigeren Hintergrundsignalen [80]. Bei Mehrfach-IHC-Färbungen kann sie ferner als Blockierungsmethode eingesetzt werden, da sie Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen Antigenen und Antikörpern verhindert [81].

Das gängigste Verfahren ist die hitzeinduzierte Epitop-Demaskierung, welche die meisten Quervernetzungen von Proteinen bei verschiedenen pH-Werten aufheben kann. Der pH-Wert ist wichtig, weil die Epitope bei einem neutralen pH-Wert aufgrund gleichzeitig vorhandener hydrophobischer und ionischer Kräfte im Protein verfangen sind. Bei einem basischen oder sauren pH-Wert sind die Epitope dagegen

4 Diskussion

geladen und frei zugänglich [80]. Die hitzeinduzierte Demaskierung wird unter anderem (auch vom Hersteller) als Alternative zu der mit Proteinase K beim TUNEL Assay angegeben [81, 82, 83]. In Übereinstimmung mit den Versuchsergebnissen zur Epitop-Demaskierung in dieser Arbeit (Kapitel 3.2.2) konnte die Arbeitsgruppe Labat-Moleur et al. mit alleiniger hitzeinduzierter Epitop-Demaskierung (versus Proteinase K) eine gute Anfärbung von in Paraffin eingebetteten Schilddrüsengewebe bei ausbleibendem Hintergrundsignal erreichen (Abbildung 4.2) [78].

Table 1 Comparison of TUNEL sensitivity and specificity in five formalin- and Bouin-fixed archival samples of Graves' thyroid according to combined pretreatments (retrospective study)^{a,b}

| | Proteinase K (20 mg/μl, 15 min at RT) | | Microwaves | | | |
|---|--|---------------------|------------|---------------------|--------------|----------------------------|
| | Alone | + Triton 0.1% | Alone | + Triton 0.1% | + Prot. K | + Triton and Prot. K |
| Formaldehyde | | | | | | |
| Citrate buffer, pH 3, 5 min × 2,752 W, 99.6C | | | | | | |
| Fraction of apoptotic cells labeled | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ |
| Labeling intensity | + | + to ++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Epithelial background | - to +++ | - to ++ | - | - | - | - |
| Connective tissue background | ++ | + to ++ | - | - | - | - |
| Bouin's fluid | | | | | | |
| TRIS solution, pH 10.6, 3 min, 752 W + 7 min 376 W, 99.6C | | | | | | |
| Fraction of apoptotic cells labeled | (+) | (+) | + | ++ | ++ | +++ |
| Labeling intensity | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ |
| Epithelial background | - to +++ | - to +++ | (+) | - to ++ | - to ++ | - |
| Connective tissue background | - | - | + | + | - | - |

^a Labeling of apoptotic cells: -, 0-1%; (+), 1-10%; +, 10-30%; ++, 30-60%; +++, 60-100%.

^b Labeling of background intensity: -, none; (+), very light; +, mild; ++, sustained; +++, intense.

Abbildung 4.2 Sensitivität und Spezifität der TUNEL Methode [78]

Die gleiche Arbeitsgruppe detektierte auch, dass das Schilddrüsenbindegewebe teilweise sehr stark farblich hervor trat, was auf eine Interaktion von TdT mit Kollagen zurückgeführt wurde [78]. Diese Beobachtung ist ebenfalls mit den hier publizierten Ergebnissen zur Doppelfärbung konform, bei der neben einer unspezifischen Hintergrundfärbung auch subendotheliale Bereiche teils sehr prominent zur Darstellung kamen. Die hier aufgetretenen, unspezifischen Hintergrundfärbungen können von vielen Faktoren abhängen: Hohe Temperaturen bei der hitzeinduzierten Demaskierung sorgen für eine Denaturierung der Proteine und starke unspezifische Hintergrundsignale, weshalb Ezaki eine Temperatur von 80°C für 10 bis 15 Minuten (in dieser Arbeit: 100°C für 20 Minuten im Dampfgarer) empfiehlt [84]. Für individuelle Ansätze können auch höhere Temperaturen notwendig werden, wobei laut Shi et al. die Zeit entsprechend kürzer gewählt werden sollte [83]. Zu lang angesetzte oder aggressive (enzymatische > hitzeinduzierte) Demaskierungsmethoden können nämlich

empfindliche Epitope zerstören [80]. Des Weiteren sind die eingesetzten Antikörperkonzentrationen wichtig: Unspezifische hydrophobische und ionische Bindungen zwischen (verschiedenen) Antikörpern und (denaturierten) Proteinen sorgen für ein hohes Hintergrundsignal [81]. Unspezifische Bindungen zwischen TdT und Kollagen könnten durch Vorbehandlung der Gewebeschnitte mit 20%igem Rinderserum verhindert werden [78]. Möglicherweise hätte auch eine Kombination von hitzeinduzierter Demaskierung (pH 3) mit Proteinase K die Ergebnisse der Doppelfärbung in dieser Arbeit verbessert [78]. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit durch die Trennung der Mehrfachimmunmarkierung von der TUNEL Methode die unspezifische Hintergrundfärbung reduziert werden und der TUNEL Assay zur Darstellung der Gewebeschädigung im 3D Modell etabliert werden. Zusammen mit der morphologischen Zellkernanalyse liefert der TUNEL Assay damit auch anerkannt verlässliche Ergebnisse für Gewebeschnitte [79].

Neben der erwähnten Zellkernfärbung mit DAPI wurde eine Anti-Annexin V/DAB-Färbung zur Detektion der frühen Apoptose und zur Bestätigung der Ergebnisse des TUNEL Assays durchgeführt. Obwohl der in dieser Arbeit zum Einsatz kommende Anti-Annexin V-Antikörper vom Hersteller explizit als zulässig für IHC-Färbungen an Paraffinschnitten deklariert wurde, widerspricht Willingham diesem Vorgehen. Dies erscheint nachvollziehbar, denn um apoptotische Zellen zuverlässig detektieren zu können, sollte der Anti-Annexin V-Antikörper nur an extrazellulär transloziertes Annexin V binden, was jedoch eine intakte und impermeable Zellmembran voraussetzt [79]. Diese könnte in fixierten Gewebeschnitten beeinträchtigt sein, sodass extrazellulär von intrazellulär (physiologisch) gebundenem Annexin V nicht mehr unterschieden werden kann. Zusätzlich konnte Willingham im Einklang mit weiteren Autoren zeigen, dass der Annexin V-Nachweis in nur weniger als einem Drittel der Zellen während der Apoptose gelang [79]. Somit ist die Anti-Annexin V/DAB-Färbung in dieser Arbeit lediglich als Ergänzung zum TUNEL Assay anzusehen, dessen Ergebnisse sie aber unterstreicht. Unabhängig vom Nachweissystem bleibt bei den Versuchen mit den Hemibodies ungeklärt, welche Rolle die Phagozytose in der Beseitigung von apoptotischen Zellen spielt, da die Zellen für die Detektionssysteme infolge nicht mehr erfassbar sind [79].

4.3 Testung und Vergleich der potentiellen Therapeutika zur Leukämiebehandlung

Nachdem das humane 3D *in vitro* Blutgefäß-/Gewebe Modell sowie die entsprechenden Nachweismethoden etabliert worden waren, konnten die auszutestenden Wirkstoffe appliziert werden. Zunächst werden die Behandlungsergebnisse nach Anwendung von Tipifarnib diskutiert, gefolgt von den Ergebnissen nach Inkubation mit T-Zell-rekrutierenden Antikörperkonstrukten.

4.3.1 Tipifarnib

Im Anschluss an die 5-tägige Inkubation der THP-1 Zellen aus den 2D und 3D Modellen mit definierten Tipifarnib-Konzentrationen (10 nM - 1000 nM) beziehungsweise Kontrolllösung(en) konnten durchflusszytometrisch dosisabhängige, antileukämische Effekte verzeichnen werden (Kapitel 3.3.1). Die mit DMSO versetzten Kontrolllösungen sowie Tipifarnib in der Konzentration von 10 nM zeigten dabei keine signifikanten Auswirkungen auf die THP-1 Zellen.

Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen aus vergleichbaren Studien: Goemans et al. stellten zum Beispiel nach 4-tägiger Inkubation von unterschiedlichen akuten Leukämiezellen mit verschiedenen Tipifarnib-Konzentrationen eine dosisabhängige Zytotoxizität fest [37]. Raponi et al. führten entsprechende Versuche an THP-1 Zellen durch und ermittelten neben einer dosisabhängigen Wachstumshemmung nach 7-tägiger Tipifarnib-Behandlung eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50} , *engl.* half maximal inhibitory concentration) von 19 nM [39]. Dies könnte erklären, warum die THP-1 Zellen bei der Hälfte der IC_{50} (~ 10 nM Tipifarnib) noch keine signifikanten Apoptoseraten aufwiesen. Weitere, in dieser Arbeit publizierte Apoptoseraten von etwa 26% (100 nM Tipifarnib) beziehungsweise 4,4% (Kontrolllösung aus dem 2D Modell versetzt mit 0,0005% DMSO) stimmten nahezu überein mit denen, die Raponi et al. durchflusszytometrisch (mittels Annexin V) im Zytotoxizitätsassay an THP-1 Zellen nach 5-tägiger Applikation von 100 nM Tipifarnib (23%) beziehungsweise Medium mit 0,1% DMSO (6%) ermittelten [39]. In Widerspruch zu ihren eigenen Ergebnissen aus der IC_{50} -Bestimmung und denen aus dieser Arbeit konnte die letztgenannte Arbeitsgruppe allerdings in der Durchflusszytometrie kei-

nen signifikanten Unterschied in den Apoptoseraten bezüglich 100 nM und 1000 nM Tipifarnib erkennen.

Betrachtet man die Auswirkungen der Tipifarnib-Lösungen auf die Endothelzellen, so führten diese in der vorliegenden Arbeit zu einer dosisabhängigen Destruktion des Endothelzellmonolayers mit verstärkter Zellinvasion und Durchwanderung der Matrix (Kapitel 3.3.2). Entgegen den Erwartungen und den Negativkontrollen mit reinem VascuLife Medium zeigten aber auch die Kontrolllösungen, welche mit maximal 0,00025% DMSO versetzt waren, eine konzentrationsabhängige Schädigung des Endothelzellmonolayers mit Lückenbildung. Im direkten Vergleich konnte jedoch bei den Tipifarnib-Lösungen, die mit DMSO versetzt waren, eine deutlich stärkere Schädigung festgestellt werden als bei den Kontrollen mit reinem DMSO.

Die eingesetzten DMSO-Konzentrationen in dieser Arbeit waren deutlich niedriger (maximal 0,00025% DMSO im 3D Modell) als die aus den äquivalenten Referenzstudien (0,1% DMSO), wobei dort auch keine humanen primären Endothelzellen, sondern per se resistenter, maligne Zellen herangezogen wurden [37, 39, 41]. Bei primären Zellen können manchmal schon die Isolationsmaßnahmen, welche die Zellen aus ihrem Mikromilieu herausreißen, ausreichend sein, um das Zellwachstum unabhängig von einer zusätzlichen Behandlung einzuschränken [44]. Layman untersuchte die Auswirkungen von DMSO auf bovine Endothelzellen mit dem Ergebnis, dass die IC_{50} für DMSO 2,9% betrug und dosisabhängige Wachstumshemmungen nach dem Absetzen bis zu einer Konzentration von 4% reversibel waren [85]. Auch Koizumi et al. publizierten, dass das membranpermeable DMSO die Gefäßstrukturen konzentrationsabhängig schädigen könne und Veränderungen an humanen Aortenendothelzellen bereits ab 1% DMSO erkennbar wären. Diese seien jedoch bis zu der maximal ausgetesteten Konzentration von 3% DMSO reversibel gewesen [86]. Leider gibt die letztgenannte Studie keinen Aufschluss über Auswirkungen von Langzeitkonzentrationen $< 1\%$ DMSO. Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit eine hohe Empfindlichkeit von primären humanen Endothelzellen auf DMSO beobachtet, sodass im Vergleich zu THP-1 Zellen schon minimalste Konzentrationen ausreichend waren, um eine Schädigung bei einer Inkubationsdauer von 14 Tagen hervorzurufen.

Analysiert man als nächstes die Schädigung des Endothels bei den Tipifarnib-Versuchen, kann retrospektiv keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, in

wie weit das Lösungsmittel für das Tipifarnib-Pulver (DMSO) oder die Kombination aus beidem dafür verantwortlich ist. Letztendlich ist die Ursache wahrscheinlich in einer Kombination von beidem zu sehen, da bei den Tipifarnib-Lösungen neben einer Endothelzellschädigung auch eine erhöhte Zellinvasion mit Durchwanderung der Matrix auffällig war.

Der Farnesyltransferase-Inhibitor Tipifarnib wurde ursprünglich entwickelt, um an *ras*-Mutationen in Malignomen gezielt eingreifen zu können [87]. Bisherige Studien zeigten jedoch, dass der genaue Wirkmechanismus ungeklärt ist [42], weil das Ansprechen auf Tipifarnib sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unabhängig vom *ras*-Status war [37, 41, 88, 89]. Die *ras*-Genfamilie kodiert für vier Proteine (H-, N-, K-Ras4A und -4B), welche zur Reifung während der posttranslationalen Modifizierung unter anderem auf die Farnesyltransferase angewiesen sind [42]. Bis auf H-Ras können jedoch die anderen Ras-Proteine auf Alternativen zur Prenylierung (zum Beispiel Geranylgeranyltransferase) ausweichen [37, 42]. Wird die H-Ras-Funktion in gesunden Endothelzellen zum Beispiel infolge Tipifarnib-Behandlung gehemmt, könnte sich dies negativ auf das Zellüberleben, die Gefäßpermeabilität und die Angiogenese auswirken [41, 90]. Dafür finden sich auch Hinweise bei den aufgetretenen Nebenwirkungen in den bisherigen klinischen Studien: Neben einer dosisabhängigen/-limitierenden Neurotoxizität, einer Myelosuppression, gastrointestinalen Beschwerden und einer Niereninsuffizienz [89, 91, 92], präsentierte sich beispielsweise bei nahe zu allen verabreichten Tipifarnibdosen ein wirkstoffassoziiertes, generalisiertes Exanthem mit kutaner Ödembildung [54]. Die restlich aufgeführten Nebenwirkungen lassen sich vielleicht dadurch erklären, dass Tipifarnib nicht nur Einfluss auf H-Ras, sondern auf viele unüberschaubare Signalwege in den verschiedensten Geweben nimmt, welche unter anderem von aktivierten Ras-Proteinen moduliert werden (Abbildung 4.3): Angiogenese, Apoptose, Immunität, Migration, Wachstum, Zelldifferenzierung und Zellzyklus [39, 93, 94].

Die durch Tipifarnib veränderten Signalwege könnten auch die Erklärung für die detektierte, verstärkte Zellinvasion und Durchwanderung der Matrix sein. Andererseits muss nicht jede *in vitro* beobachtete Wirkung eine Wirksamkeit *in vivo* nach sich ziehen. So treten beispielsweise die *in vitro* beobachteten Endothelzellschäden aus dieser Arbeit nicht explizit auf der Nebenwirkungsliste hervor. Möglicherwei-

sollen alle (auch die malignen) hämatopoetischen Zellen eines HLA-A2+ Individuums markiert und einer spezifischen Elimination durch das Immunsystem zugeführt werden.

Diese Theorie wird durch die hier erzielten Ergebnissen bestätigt: Nach 24-stündiger Inkubation zeigte im Vergleich zu den Kontrollansätzen lediglich die Kombination von beiden Antikörperkonstrukten hoch signifikante Auswirkungen auf die THP-1 Zellen aus den 2D und 3D Modellen (Kapitel 3.4.1). Ferner konnte kein schädigender Einfluss der Antikörperkonstrukte auf den dreidimensionalen Endothelzellmonolayer detektiert werden (Kapitel 3.4.2). Auch Banaszek/Bumm et al. konnten die hoch spezifische Elimination von dual Hemibody-markierten Zielzellen ohne Kollateralschäden *in vitro* und *im vivo* Mausmodell bestätigen (Ergebnisse zum Zeitpunkt der Einreichung (Stand 02.05.2016) noch nicht publiziert).

Die uneindeutigen Ergebnisse im TUNEL Assay nach Kokultur von Endothelzellen mit PBMCs (ohne THP-1 Zellen) und Einsatz beider Antikörperkonstrukte lassen sich eher als Graft-versus-Host-Reaktion (GvHD, *engl.* graft-versus-host disease) interpretieren, da die Endothelzellen HLA-A2+ und die eingesetzten PBMCs HLA-A2- waren. Möglicherweise tritt in den restlichen Versuchsansätzen mit THP-1 Zellen und PBMCs keine GvHD auf, da die in Suspension und räumlich näher befindlichen HLA-A2+ THP-1 Zellen die (Spender-)Leukozyten in Schach halten (eine Art Graft-versus-Leukemia-Reaktion (GvL, *engl.* graft-versus-leukemia)), sodass diese nicht das ebenfalls HLA-A2+ Nachbargewebe (Endothel) angreifen. Zusätzlich ist beschrieben, dass die Expression von HLA-A2 mit einer niedrigeren GvHD-Rate assoziiert ist [99]. Letztendlich ist jedoch jede lokal aktivierte T-Zelle in der Lage einen unspezifischen Kollateralschaden am umgebenden Gewebe über Fehllenkung von Inhaltsstoffen aus lytischen Granula (zum Beispiel Granzyme B) auslösen [100]. Um eine unspezifische oder immunologisch vermittelte Schädigung des Wirtsgewebes aufgrund der transfundierten PBMCs eindeutig beweisen zu können, sind weitere Versuche mit entsprechenden Kontrollen notwendig.

Das Besondere an den verwendeten Hemibodies ist, dass es sich um die ersten Prodrug-artigen, T-Zell-rekrutierenden Antikörperkonstrukte handelt, die jemals eingesetzt wurden [Banaszek et al.]: Erst wenn beide Antikörperkonstrukte simultan ihre entsprechenden Antigene auf der gleichen Zielzelle gebunden haben, sind

die beiden Anti-CD3 variablen Fragmente vollständig und funktionell, sodass darüber eine T-Zell-vermittelte Apoptose in der Zielzelle ausgelöst werden kann. Der Prodrug-artige Ansatz der Antikörperkonstrukte und die Ziel-Zell-restringierte Aktivierung von T-Zellen sollen ferner Beitrag zur Verhinderung eines systemischen Zytokin-Release-Syndroms (CRS, *engl.* cytokine release syndrome) leisten. Dieses trat zum Beispiel als ernst zu nehmende Nebenwirkungen bei bisherigen Antikörpertherapien beziehungsweise Immuntherapien mit Checkpoint-Inhibitoren (vor allem mit Anti-CTLA-4-Antikörpern) oder der CAR (chimärer Antigen Rezeptor)-Therapie auf [44, 101]. Im Vergleich zu murinen Antikörpern ist bei den biotechnologisch hergestellten humanisierten Antikörperkonstrukten auch mit einer geringeren Immunogenität und einer längeren Serum-Halbwertszeit zu rechnen [44, 102]. Zusätzlich zu der längeren Serum-Halbwertszeit sind die Hemibodies sehr ökonomisch: Nach Initiierung des programmierten Zelltodes in der Zielzelle können sich die Hemibodies von ihren Epitopen lösen und an entsprechende Antigene auf der nächst möglichen Zielzelle binden. Auch die T-Zellen werden während der Zielzelleliminierung nicht verbraucht, sodass geringe Einsatzkonzentrationen von Antikörperkonstrukten und Effektorzellen ausreichend sind. Die hier beschriebene Immuntherapie könnte zukünftig erweitert werden, indem andere kolokalisierte Antigene kombiniert und anvisiert werden, sodass weitere und selbst therapieresistente Krebszellen dem Immunsystem zugänglich gemacht werden, welche sich bisher über verschiedenste Mechanismen [103] einer Eliminierung entzogen haben. Sollte es dabei zu einer Anwendung in soliden Tumoren kommen, muss noch geklärt werden, in wie fern die kleinmolekularen Hemibodies dazu in der Lage sind, in das Tumorparenchym einzudringen [102].

4.3.3 Vergleich der potentiellen Therapeutika zur Leukämiebehandlung

Vergleicht man jeweils die Ergebnisse nach Applikation von Tipifarnib und Antikörperkonstrukten, so ließen sich im 2D Modell ähnliche Apoptoseraten in den THP-1 Zellen erzielen (jeweils 38% bei Anwendung von 500 nM Tipifarnib). In den 3D Modellen erzielten die niedriger konzentrierten Antikörperkonstrukte bei kürzerer

Inkubationsdauer eine höhere spezifische Apoptoserate in den THP-1 Zellen (im Mittel 58%) im Unterschied zu 500 nM Tipifarnib (mittlere Apoptoserate 40%). Bezüglich der Nebenwirkungen ließ sich im 3D Modell nach Applikation von Antikörperkonstrukten kein wesentlicher Einfluss auf das Endothel erkennen, während Tipifarnib/DMSO zu einer dosisabhängigen Destruktion des ursprünglichen Endothelzellmonolayers mit vermehrter Zellinvasion führte.

Trotz der guten *in vitro* Wirksamkeit und des immerhin akzeptablen *in vivo* Nebenwirkungsprofils scheint Tipifarnib auch in bisherigen klinischen Studien nicht ausreichend überzeugt zu haben [38, 88, 92]. So hatten die Patienten unter Behandlung mit Tipifarnib keinen Überlebensvorteil im Vergleich zur Kontrollgruppe mit bestmöglicher supportiver Therapie und Hydroxyurea [91]. Die Erprobung einer Kombinationstherapie von Tipifarnib mit weiteren Onkologika oder dem Lipidsenker Simvastatin (wirkt hemmend auf die Geranylgeranylierung [104]) erscheint sinnvoll und könnte synergistisch zu einer besseren Wirksamkeit führen. Ob die damit erzielten Ergebnisse für eine Etablierung von Tipifarnib in der Malignombehandlung ausreichen, bleibt fraglich.

Im Gegensatz dazu zeigt sich die Hemibody-vermittelte Immuntherapie mit ihrer *in vitro* und *in vivo* nachgewiesenen, hoch spezifischen und effizienten Zielzelleliminierung als vielversprechender. Es bleibt abzuwarten, wie die bimolekularen Antikörperkonstrukte bezüglich ihrer Wirksamkeit und des Nebenwirkungsprofils in klinischen Studien abschneiden und welchen Stellenwert sie in der zukünftigen Immun-Onkologie neben den bereits etablierten Therapien einnehmen werden.

5 Zusammenfassung

In Deutschland erkranken jährlich etwa 500.000 Menschen an Krebs, wovon circa 12.000 die Diagnose „Leukämie“ gestellt bekommen [1]. Unter den Leukämien weist die akute myeloische Leukämie (AML) die ungünstigste Prognose auf, sodass hier erheblicher Forschungsbedarf besteht. Zusätzlich schnitten viele potentielle Therapeutika, die sich in bisherigen präklinischen Testsystemen als vielversprechend erwiesen haben, in klinischen Studien schlecht ab [8]. Ziel dieser Arbeit war daher die Etablierung eines 3D *in vitro* Blutgefäß-/Gewebe-modells als verbessertes präklinisches System zur Testung von Therapeutika, die zur erfolgreichen Behandlung von Leukämien beitragen sollen.

Das 3D Blutgefäßmodell bestand aus humanen primären Endothelzellen, welche als Monolayer auf der Serosaseite einer dezellularisierten, porzinen, intestinalen Kollagenmatrix (SIS-Ser) wuchsen. Nach 14-tägiger Zellkultur wurden dem Versuchsansatz entsprechend nichtadhärente THP-1 Zellen (AML-M5-Zelllinie) und Tipifarnib oder entsprechende Kontrolllösungen beziehungsweise bimolekulare Antikörperkonstrukte mit PBMCs als Effektorzellen hinzupipettiert. Nach 5-tägiger Inkubation mit Tipifarnib beziehungsweise 24-stündiger Behandlung mit Antikörperkonstrukten wurde der therapiebedingte Anstieg der Apoptoserate in den malignen THP-1 Zellen mittels durchflusszytometrischer Analyse der Modellüberstände ermittelt. Zum Ausschluss verbliebener und durchflusszytometrisch zu analysierender Zellen wurde, stellvertretend für alle Suspensionszellen, eine Anti-CD13/DAB-Färbung durchgeführt, welche negativ ausfiel. Mögliche Kollateralschäden am Endothel wurden mittels histologischen Färbemethoden an Gewebeparaffinschnitten untersucht.

In der Durchflusszytometrie zeigte Tipifarnib sowohl im 2D als auch im 3D Modell äquivalente, dosisabhängige und antileukämische Auswirkungen auf die THP-1 Zellen. Bei Applikation der Antikörperkonstrukte ließ lediglich die Kombination beider

Hemibodies signifikante Effekte auf die THP-1 Zellen erkennen. Dabei zeigten sich bei konstanten Konzentrationen der Antikörperkonstrukte im 3D Modell deutlich höhere Apoptoseraten (58%) als im 2D Modell (38%). Stellt man Vergleiche von Tipifarnib mit den T-Zell-rekrutierenden Antikörperkonstrukten an, so ließen sich im 2D Modell ähnliche Apoptoseraten in den THP-1 Zellen erzielen (jeweils 38% bei Anwendung von 500 nM Tipifarnib). In den 3D Modellen erzielten jedoch die niedriger konzentrierten Antikörperkonstrukte bei kürzerer Inkubationsdauer eine noch höhere spezifische Apoptoserate in den THP-1 Zellen (im Mittel 58%) als 500 nM Tipifarnib (mittlere Apoptoserate 40%). Bezüglich der Nebenwirkungen ließ sich im 3D Modell nach Applikation von Antikörperkonstrukten kein wesentlicher Einfluss auf das Endothel erkennen, während Tipifarnib/DMSO als auch die mit DMSO versetzten Kontrolllösungen zu einer dosisabhängigen Destruktion des ursprünglichen Endothelzellmonolayers führten. Damit stellt die hier beschriebene, hoch spezifische, Hemibody-vermittelte Immuntherapie einen vielversprechenden Ansatz für zukünftige onkologische Therapien dar.

Mithilfe des etablierten humanen 3D *in vitro* Modells konnte im Vergleich zur konventionellen Zellkultur eine natürlichere Mikroumgebung für Zellen geschaffen und die Auswirkungen der Testsubstanzen sowohl auf maligne Zellen, als auch auf die Gefäßstrukturen untersucht werden.

Literaturverzeichnis

- [1] Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. Krebs in Deutschland 2011/2012. Online publiziert: http://www.gekid.de/Doc/krebs_in_deutschland_2015.pdf (Stand 03.03.2016).
- [2] Deutsche Krebshilfe e. V. Krebszahlen. Krebs in Deutschland. Online publiziert: <http://www.krebshilfe.de/wir-informieren/ueber-krebs/krebszahlen.html> (Stand 10.10.2013).
- [3] Robert Koch-Institut. Krebs gesamt. Online publiziert: http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Krebs_gesamt/krebs_gesamt_node.html (Stand 11.10.2013).
- [4] Krebsinformationsdienst, Deutsches Krebsforschungszentrum. Krebsstatistiken: Wie häufig ist Krebs in Deutschland? Online publiziert: <http://www.krebsinformationsdienst.de/grundlagen/krebsstatistiken.php> (Stand 11.10.2013).
- [5] D. J. DeAngelo, J. Ritz. Imatinib therapy for patients with chronic myelogenous leukemia: are patients living longer? *Clin Cancer Res*, 10(1 Pt 1):1–3. Jan 2004.
- [6] T. P. Hughes, A. Hochhaus, S. Branford, M. C. Müller, J. S. Kaeda, L. Foroni, B. J. Druker, F. Guilhot, R. A. Larson, S. G. O'Brien, M. S. Rudoltz, M. Mone, E. Wehrle, V. Modur, J. M. Goldman, J. P. Radich, I. R. I. S. i. . Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS). *Blood*, 116(19):3758–3765. Nov 2010.

- [7] S. G. O'Brien, F. Guilhot, R. A. Larson, I. Gathmann, M. Baccarani, F. Cervantes, J. J. Cornelissen, T. Fischer, A. Hochhaus, T. Hughes, K. Lechner, J. L. Nielsen, P. Rousselot, J. Reiffers, G. Saglio, J. Shepherd, B. Simonsson, A. Gratwohl, J. M. Goldman, H. Kantarjian, K. Taylor, G. Verhoef, A. E. Bolton, R. Capdeville, B. J. Druker, I. R. I. S. I. . Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 348(11):994–1004. Mar 2003.
- [8] I. Kola, J. Landis. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov*, 3(8):711–715. Aug 2004.
- [9] G. Herold. Leukämien. In: Innere Medizin. pages 86–92. Köln: Gerd Herold, 2012.
- [10] Kompetenznetz Leukämien Universität Heidelberg. Leukämiehäufigkeit. Online publiziert: http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/epidemiologie/leukaemiehaeufigkeit/index_ger.html (Stand 11.10.2013).
- [11] Wikipedia. Altersspezifische Inzidenz von Leukämien (USA 1997-2001). Online publiziert: http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Inzidenz_Leuk%C3%A4mie.jpg (Stand 20.10.2013).
- [12] C. M. Wendtner, P. Dreger, M. Gregor, R. Greil, W. Knauf, J. Schetelig, M. Steurer, S. Stilgenbauer. Chronische Lymphatische Leukämie (CLL). Online publiziert: <http://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/ll> (Stand 11.10.2013).
- [13] M. Schaich. Akute Leukämien. In: Facharzt Hämatologie Onkologie. 2. Auflage. pages 325–351. München: Elsevier, Urban & Fischer Verlag, 2012.
- [14] T. Büchner, D. Niederwieser, M. Schaich, R. Schlenk. Akute Myeloische Leukämie (AML). Online publiziert: <http://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/aml> (Stand 11.10.2013).
- [15] G. Juliusson, P. Antunovic, A. Derolf, S. Lehmann, L. Möllgård, D. Stockelberg, U. Tidefelt, A. Wahlin, M. Höglund. Age and acute myeloid leukemia:

- real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*, 113(18):4179–4187. Apr 2009.
- [16] C. M. Southam, L. F. Craver, H. W. Dargeon, J. H. Burchenal. A study of the natural history of acute leukemia with special reference to the duration of the disease and the occurrence of remissions. *Cancer*, 4(1):39–59. Jan 1951.
- [17] Leibniz Institut DSMZ GmbH. THP-1. Online publiziert: [http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-16.html?tx_dsmzresources_pi5\[returnPid\]=192](http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-16.html?tx_dsmzresources_pi5[returnPid]=192) (Stand 23.10.2013).
- [18] H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell. Die Kultur von Zellen und Viren. In: Molekulare Zellbiologie. 4. Auflage. pages 197–227. Heidelberg - Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, Sep 2001.
- [19] S. L. Holbeck. Update on NCI in vitro drug screen utilities. *Eur J Cancer*, 40(6):785–793. Apr 2004.
- [20] R. H. Shoemaker. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer*, 6(10):813–823. Oct 2006.
- [21] A. Kamb. What’s wrong with our cancer models? *Nat Rev Drug Discov*, 4(2):161–165. Feb 2005.
- [22] R. Sandberg, I. Ernberg. The molecular portrait of in vitro growth by meta-analysis of gene-expression profiles. *Genome Biol*, 6(8):R65. 2005.
- [23] UKCCCR guidelines for the use of cell lines in cancer research. *Br J Cancer*, 82(9):1495–1509. May 2000.
- [24] H. Wang, S. Huang, J. Shou, E. W. Su, J. E. Onyia, B. Liao, S. Li. Comparative analysis and integrative classification of NCI60 cell lines and primary tumors using gene expression profiling data. *BMC Genomics*, 7:166. 2006.
- [25] I. I. Wistuba, D. Bryant, C. Behrens, S. Milchgrub, A. K. Virmani, R. Ashfaq, J. D. Minna, A. F. Gazdar. Comparison of Features of Human Lung Cancer Cell Lines and Their Corresponding Tumors. *Clin Cancer Res*, 5:991–1000. 1999.

- [26] W. C. G. van Staveren, D. Y. W. Solís, A. Hébrant, V. Detours, J. E. Dumont, C. Maenhaut. Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? *Biochim Biophys Acta*, 1795(2):92–103. Apr 2009.
- [27] J. R. Masters. Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1(3):233–236. Dec 2000.
- [28] I. A. Cree, S. Glaysher, A. L. Harvey. Efficacy of anti-cancer agents in cell lines versus human primary tumour tissue. *Curr Opin Pharmacol*, 10(4):375–379. Aug 2010.
- [29] J. I. Johnson, S. Decker, D. Zaharevitz, L. V. Rubinstein, J. M. Venditti, S. Schepartz, S. Kalyandrug, M. Christian, S. Arbuck, M. Hollingshead, E. A. Sausville. Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *Br J Cancer*, 84(10):1424–1431. May 2001.
- [30] L. R. Kelland. Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur J Cancer*, 40(6):827–836. Apr 2004.
- [31] P. Macchiarini, T. Walles, C. Biancosino, H. Mertsching. First human transplantation of a bioengineered airway tissue. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 128(4):638–641. Oct 2004.
- [32] M. A. Lancaster, M. Renner, C.-A. Martin, D. Wenzel, L. S. Bicknell, M. E. Hurles, T. Homfray, J. M. Penninger, A. P. Jackson, J. A. Knoblich. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 501(7467):373–379. Sep 2013.
- [33] R. Lüllmann-Rauch. Die Bindegewebe im eigentlichen Sinn. In: Taschenlehrbuch Histologie. 3. Auflage. pages 116–134. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2009.

- [34] S. F. Badylak, R. Record, K. Lindberg, J. Hodde, K. Park. Small intestinal submucosa: a substrate for in vitro cell growth. *J Biomater Sci Polym Ed*, 9(8):863–878. 1998.
- [35] S. Voytik-Harbin, A. Brightman, B. Waisner, P. Robinson, C. Lamar. Small Intestinal Submucosa: A Tissue-Derived Extracellular Matrix That Promotes Tissue-Specific Growth and Differentiation of Cells in Vitro. *Tissue Engineering*, 4(2):157–174. 1998.
- [36] A. T. Stratmann, G. Dandekar, S. L. Nietzer. Three-dimensional in vitro Tumor Models as an Alternative for Animal Models in Preclinical Studies. *Pharm. Ind.*, 75(4):675–680. 2013.
- [37] B. F. Goemans, C. M. Zwaan, A. Harlow, A. H. Loonen, B. E. S. Gibson, K. Hählen, D. Reinhardt, U. Creutzig, M. C. Heinrich, G. J. L. Kaspers. In vitro profiling of the sensitivity of pediatric leukemia cells to tipifarnib: identification of T-cell ALL and FAB M5 AML as the most sensitive subsets. *Blood*, 106(10):3532–3537. Nov 2005.
- [38] J. E. Karp, J. E. Lancet. Tipifarnib in the treatment of newly diagnosed acute myelogenous leukemia. *Biologics*, 2(3):491–500. Sep 2008.
- [39] M. Raponi, R. T. Belly, J. E. Karp, J. E. Lancet, D. Atkins, Y. Wang. Microarray analysis reveals genetic pathways modulated by tipifarnib in acute myeloid leukemia. *BMC Cancer*, 4:56. Aug 2004.
- [40] Vaccinationist. Skeletal formula of tipifarnib (code name R115777, proposed trade name Zarnesta) - a farnesyltransferase inhibitor. Online publiziert: <https://en.wikipedia.org/wiki/Tipifarnib#/media/File:Tipifarnib.svg> (Stand 21.07.2017).
- [41] D. W. End, G. Smets, A. V. Todd, T. L. Applegate, C. J. Fuery, P. Angibaud, M. Venet, G. Sanz, H. Poignet, S. Skrzat, A. Devine, W. Wouters, C. Bowden. Characterization of the antitumor effects of the selective farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in vivo and in vitro. *Cancer Res*, 61(1):131–137. Jan 2001.

- [42] R. A. Weinberg. Supplementary Sidebar 16.6. In: The biology of cancer. Second edition. page 134. New York: Garland Science, 2014.
- [43] T. Dao, C. Liu, D. A. Scheinberg. Approaching untargetable tumor-associated antigens with antibodies. *Oncoimmunology*, 2(7):e24678. Jul 2013.
- [44] G. J. Weiner. Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nat Rev Cancer*, 15(6):361–370. Jun 2015.
- [45] P. Holliger, P. J. Hudson. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol*, 23(9):1126–1136. Sep 2005.
- [46] J. Kirberg, T. Brocker. CD45 up-regulation during lymphocyte maturation. *Int Immunol*, 8(11):1743–1749. Nov 1996.
- [47] V. Kiefel. HLA und Transplantation. Online publiziert: www.tmed.med.uni-rostock.de/hla.pdf (Stand 18.10.2013).
- [48] T. Dreier, G. Lorenczewski, C. Brandl, P. Hoffmann, U. Syring, F. Hanakam, P. Kufer, G. Riethmuller, R. Bargou, P. A. Baeuerle. Extremely potent, rapid and costimulation-independent cytotoxic T-cell response against lymphoma cells catalyzed by a single-chain bispecific antibody. *Int J Cancer*, 100(6):690–697. Aug 2002.
- [49] R. Repp, T. Valerius, R. Bargou. Bispecific antibodies in hematology and oncology. *Internist*, 42(6):854–859. Jun 2001.
- [50] H. Mertsching, T. Walles, M. Hofmann, J. Schanz, W. H. Knapp. Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation. *Biomaterials*, 26(33):6610–6617. Nov 2005.
- [51] J. Schanz, J. Pusch, J. Hansmann, H. Walles. Vascularised human tissue models: a new approach for the refinement of biomedical research. *J Biotechnol*, 148(1):56–63. Jul 2010.
- [52] H. G. Drexler. Monocytic Cell Lines. In: Human Cell Culture. Vol. 3. Cancer Cell Lines Part 3: Leukemias and Lymphomas. pages 237–257. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 2000.

- [53] S. Schmitz. Zellbiologische und Routinemethoden. In: *Der Experimentator: Zellkultur*. 3. Auflage. pages 206–208. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2011.
- [54] M. Crul, G. J. de Klerk, M. Swart, L. J. van't Veer, D. de Jong, L. Boerrigter, P. A. Palmer, C. J. Bol, H. Tan, G. C. de Gast, J. H. Beijnen, J. H. M. Schellens. Phase I clinical and pharmacologic study of chronic oral administration of the farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in advanced cancer. *J Clin Oncol*, 20(11):2726–2735. Jun 2002.
- [55] M. Holschbach. Durchflusszytometrie (FACS): Messprinzip & Aufbau. Online publiziert: <http://www.antikoerper-online.de/resources/17/1247/Durchflusszytometrie+FACS+Messprinzip++Aufbau/> (Stand 26.12.2015).
- [56] G. Rothe. Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. pages 27–70. Basel: Karger, 2007.
- [57] CHEMIE.DE. Calcein. Online publiziert: <http://www.chemie.de/lexikon/Calcein.html> (Stand 15.01.2016).
- [58] R. Lüllmann-Rauch. Methoden. In: *Taschenlehrbuch Histologie*. 3. Auflage. pages 599–605. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2009.
- [59] M. Raponi, J.-L. Harousseau, J. E. Lancet, B. Löwenberg, R. Stone, Y. Zhang, W. Rackoff, Y. Wang, D. Atkins. Identification of molecular predictors of response in a study of tipifarnib treatment in relapsed and refractory acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*, 13(7):2254–2260. Apr 2007.
- [60] Z. Qin. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis*, 221(1):2–11. Mar 2012.
- [61] J. P. Hodde, R. D. Record, R. S. Tullius, S. F. Badylak. Retention of endothelial cell adherence to porcine-derived extracellular matrix after disinfection and sterilization. *Tissue Eng*, 8(2):225–234. Apr 2002.

- [62] G. C. Lantz, S. F. Badylak, A. C. Coffey, L. A. Geddes, G. E. Sandusky. Small intestinal submucosa as a superior vena cava graft in the dog. *J Surg Res*, 53(2):175–181. Aug 1992.
- [63] J. Pope, 4th, M. M. Davis, E. Smith, Jr, M. J. Walsh, P. K. Ellison, R. C. Rink, B. P. Kropp. The ontogeny of canine small intestinal submucosa regenerated bladder. *J Urol*, 158(3 Pt 2):1105–1110. Sep 1997.
- [64] S. Badylak, A. Liang, R. Record, R. Tullius, J. Hodde. Endothelial cell adherence to small intestinal submucosa: an acellular bioscaffold. *Biomaterials*, 20(23-24):2257–2263. Dec 1999.
- [65] B. K. Ferrand, K. Kokini, S. F. Badylak, L. A. Geddes, M. C. Hiles, R. J. Morff. Directional porosity of porcine small-intestinal submucosa. *J Biomed Mater Res*, 27(10):1235–1241. Oct 1993.
- [66] R. Lüllmann-Rauch. Speiseröhre und Magen-Darm-Kanal. In: Taschenlehrbuch Histologie. 3. Auflage. pages 367–392. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2009.
- [67] S. Glisic-Milosavljevic, J. Waukau, S. Jana, P. Jailwala, J. Rovensky, S. Ghosh. Comparison of apoptosis and mortality measurements in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using multiple methods. *Cell Prolif*, 38(5):301–311. Oct 2005.
- [68] A. Radbruch. Immunofluorescence: Basic Considerations. In: Flow Cytometry and Cell Sorting. pages 34–46. Heidelberg - Berlin: Springer-Verlag, 1992.
- [69] J. W. Gratama, P. Menéndez, J. Kraan, A. Orfao. Loss of CD34(+) hematopoietic progenitor cells due to washing can be reduced by the use of fixative-free erythrocyte lysing reagents. *J Immunol Methods*, 239(1-2):13–23. May 2000.
- [70] T. V. Shankey. Antibodies to Intermediate Filament Proteins as Probes for Multiparameter Flow Cytometry of Human Cancers. In: Methods in Cell Biology. Flow Cytometry Second Edition. Part B. 41:208–229. London: Academic Press, Inc, 1994.

- [71] S. Tanqri, H. Vall, D. Kaplan, B. Hoffman, N. Purvis, A. Porwit, B. Hunsberger, T. V. Shankey, I. C. S. H. C. C. S. W. G. . Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS - part III - analytical issues. *Cytometry B Clin Cytom*, 84(5):291–308.
- [72] Abcam. Introduction to flow cytometry. Online publiziert: <http://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry> (Stand 26.12.2015).
- [73] AbD Serotec. Flow Cytometry Basics Guide. Chapter 3: Data Analysis. Gates and Regions. Online publiziert: <https://www.abdserotec.com/flow-cytometry-gates-regions.html> (Stand 16.02.2016).
- [74] I. Schmid, C. Uittenbogaart, B. D. Jamieson. Live-cell assay for detection of apoptosis by dual-laser flow cytometry using Hoechst 33342 and 7-amino-actinomycin D. *Nat Protoc*, 2(1):187–190. 2007.
- [75] K. J. Donner, K. M. Becker, B. D. Hissong, S. A. Ahmed. Comparison of multiple assays for kinetic detection of apoptosis in thymocytes exposed to dexamethasone or diethylstilbesterol. *Cytometry*, 35(1):80–90. Jan 1999.
- [76] A. Prieto, E. Reyes, D. Diaz, M. P. Hernandez-Fuentes, J. Monserrat, E. Perucha, L. Muñoz, R. Vangioni, A. de La Hera, A. Orfao, M. Alvarez-Mon. A new method for the simultaneous analysis of growth and death of immunophenotypically defined cells in culture. *Cytometry*, 39(1):56–66. Jan 2000.
- [77] J. A. Collins, C. A. Schandi, K. K. Young, J. Vesely, M. C. Willingham. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem*, 45(7):923–934. Jul 1997.
- [78] F. Labat-Moleur, C. Guillermet, P. Lorimier, C. Robert, S. Lantuejoul, E. Brambilla, A. Negoescu. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem*, 46(3):327–334. Mar 1998.
- [79] M. C. Willingham. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem*, 47(9):1101–1110. Sep 1999.

- [80] F. D'Amico, E. Skarmoutsou, F. Stivala. State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. *J Immunol Methods*, 341(1-2):1–18. Feb 2009.
- [81] S.-R. Shi, Y. Shi, C. R. Taylor. Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades. *J Histochem Cytochem*, 59(1):13–32. Jan 2011.
- [82] Roche Applied Science. TUNEL Label Mix. Version 10.0. Online publiziert: www.roche-applied-science.com (Stand 17.02.2016).
- [83] S. R. Shi, R. J. Cote, C. R. Taylor. Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J Histochem Cytochem*, 49(8):931–937. Aug 2001.
- [84] T. Ezaki. Antigen retrieval: its significance and drawbacks in immunohistochemistry. *Kaibogaku Zasshi*, 71(6):615–628. Dec 1996.
- [85] D. L. Layman. Growth inhibitory effects of dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfone on vascular smooth muscle and endothelial cells in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol*, 23(6):422–428. Jun 1987.
- [86] K. Koizumi, Y. Tsutsumi, Y. Yoshioka, M. Watanabe, T. Okamoto, Y. Mukai, S. Nakagawa, T. Mayumi. Anti-angiogenic effects of dimethyl sulfoxide on endothelial cells. *Biol Pharm Bull*, 26(9):1295–1298. Sep 2003.
- [87] J. B. Gibbs. Ras C-terminal processing enzymes—new drug targets? *Cell*, 65(1):1–4. Apr 1991.
- [88] T. B. Brunner, S. M. Hahn, A. K. Gupta, R. J. Muschel, W. G. McKenna, E. J. Bernhard. Farnesyltransferase inhibitors: an overview of the results of preclinical and clinical investigations. *Cancer Res*, 63(18):5656–5668. Sep 2003.
- [89] J. E. Karp, J. E. Lancet, S. H. Kaufmann, D. W. End, J. J. Wright, K. Bol, I. Horak, M. L. Tidwell, J. Liesveld, T. J. Kottke, D. Ange, L. Buddhharaju, I. Gojo, W. E. Highsmith, R. T. Belly, R. J. Hohl, M. E. Rybak, A. Thibault, J. Rosenblatt. Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor

- R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias: a phase 1 clinical-laboratory correlative trial. *Blood*, 97(11):3361–3369. Jun 2001.
- [90] D. J. Haeussler, D. R. Pimentel, X. Hou, J. R. Burgoyne, R. A. Cohen, M. M. Bachschmid. Endomembrane H-Ras controls vascular endothelial growth factor-induced nitric-oxide synthase-mediated endothelial cell migration. *J Biol Chem*, 288(21):15380–15389. May 2013.
- [91] J.-L. Harousseau, G. Martinelli, W. W. Jedrzejczak, J. M. Brandwein, D. Bordessoule, T. Masszi, G. J. Ossenkoppele, J. A. Alexeeva, G. Beutel, J. Maertens, M.-B. Vidriales, H. Dombret, X. Thomas, A. K. Burnett, T. Robak, N. K. Khuageva, A. K. Golenkov, E. Tothova, L. Mollgard, Y. C. Park, A. Bessems, P. De Porre, A. J. Howes, F. I. G. H. T.-A. M. L.-. I. . A randomized phase 3 study of tipifarnib compared with best supportive care, including hydroxyurea, in the treatment of newly diagnosed acute myeloid leukemia in patients 70 years or older. *Blood*, 114(6):1166–1173. Aug 2009.
- [92] J. E. Lancet, I. Gojo, J. Gotlib, E. J. Feldman, J. Greer, J. L. Liesveld, L. M. Bruzek, L. Morris, Y. Park, A. A. Adjei, S. H. Kaufmann, E. Garrett-Mayer, P. L. Greenberg, J. J. Wright, J. E. Karp. A phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in poor-risk and elderly patients with previously untreated acute myelogenous leukemia. *Blood*, 109(4):1387–1394. Feb 2007.
- [93] A. D. Cox, C. J. Der. The dark side of Ras: regulation of apoptosis. *Oncogene*, 22(56):8999–9006. Dec 2003.
- [94] K. N. Meadows, P. Bryant, P. A. Vincent, K. M. Pumiglia. Activated Ras induces a proangiogenic phenotype in primary endothelial cells. *Oncogene*, 23(1):192–200. Jan 2004.
- [95] cybertory. Overview of signal transduction pathways involved in apoptosis. Online publiziert: https://en.wikipedia.org/wiki/Ras_subfamily#/media/File:Signal_transduction_pathways.svg, <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/> (Stand 21.07.2017, Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported license (CC BY-SA 3.0)).

- [96] G. Köhler, C. Milstein. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517):495–497. Aug 1975.
- [97] J. M. Reichert. Antibodies to watch in 2016. *MAbs*, 8(2):197–204. 2016.
- [98] R. A. Morgan. Risky business: target choice in adoptive cell therapy. *Blood*, 122(20):3392–3394. Nov 2013.
- [99] D. M. Cardozo, S. R. Lieber, S. B. D. Marques, F. J. Aranha, A. C. Vigorito, C. A. d. Souza, J. E. L. Visentainer. Association between human leukocyte antigens and graft-versus-host disease occurrence after allogenic hematopoietic stem cell transplantation. *Sao Paulo Med J*, 130(4):219–224. 2012.
- [100] B. van der Zouwen, A. B. Kruisselbrink, J. H. F. Falkenburg, I. Jedema. Collateral damage of nonhematopoietic tissue by hematopoiesis-specific T cells results in graft-versus-host disease during an ongoing profound graft-versus-leukemia reaction. *Biol Blood Marrow Transplant*, 20(6):760–769. Jun 2014.
- [101] T. Bakacs, J. N. Mehrishi, R. W. Moss. Ipilimumab (Yervoy) and the TGN1412 catastrophe. *Immunobiology*, 217(6):583–589. Jun 2012.
- [102] S. K. Batra, M. Jain, U. A. Wittel, S. C. Chauhan, D. Colcher. Pharmacokinetics and biodistribution of genetically engineered antibodies. *Curr Opin Biotechnol*, 13(6):603–608. Dec 2002.
- [103] M. Ahmad, R. C. Rees, S. A. Ali. Escape from immunotherapy: possible mechanisms that influence tumor regression/progression. *Cancer Immunol Immunother*, 53(10):844–854. Oct 2004.
- [104] T. A. Ahmed, J. Hayslip, M. Leggas. Simvastatin interacts synergistically with tipifarnib to induce apoptosis in leukemia cells through the disruption of RAS membrane localization and ERK pathway inhibition. *Leuk Res*, 38(11):1350–1357. Nov 2014.

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|---|----|
| 1.1 | Altersspezifische Inzidenzen von Leukämien | 2 |
| 1.2 | Einteilungsschema der Leukämien und malignen Lymphome | 3 |
| 1.3 | Schema zur Herstellung der BioVaSc und SIS | 10 |
| 1.4 | Chemische Struktur von Tipifarnib | 12 |
| 1.5 | Aufbau und Funktionsweise der bimolekularen T-Zell-rekrutierenden Antikörperkonstrukte | 14 |
| 2.1 | Wandschichten des Verdauungskanals | 18 |
| 2.2 | Ausschnitt des Zählfeldes einer Neubauer Zählkammer | 35 |
| 2.3 | Aufbau der 2D Modelle | 36 |
| 2.4 | Einspannen der Matrix in die Zellkronen | 38 |
| 2.5 | Handhabung der SIS-Ser bei Bezug des Innenrings der Zellkrone | 39 |
| 2.6 | Aufbau der 3D Modelle | 41 |
| 2.7 | Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie | 43 |
| 2.8 | Darstellung der Messergebnisse mittels Histogramm oder Dotplot | 47 |
| 2.9 | Funktionsprinzip der Vitalfärbung mit Calcein AM | 49 |
| 2.10 | Darstellung immunhistochemischer Färbemethoden | 55 |
| 3.1 | Vermessung der THP-1 Zellen bezüglich ihres Immunphänotyps | 60 |
| 3.2 | Konfokalmikroskopisch zeigt Calcein Red nativ markierte Endothel- zellen | 62 |
| 3.3 | H.E.- und Fluoreszenzfärbung von Paraffinschnitten markieren Endo- thel aus der Versuchsreihe mit Tipifarnib | 65 |
| 3.4 | Mehrfachimmunfluoreszenzfärbung mit kombiniertem TUNEL Assay zeigt hohe Hintergrundfärbung | 66 |

| | | |
|------|---|----|
| 3.5 | Kontrollen zur Mehrfachimmunfluoreszenzmarkierung mit TUNEL Assay zeigen auch eine unspezifische Hintergrundfärbung | 67 |
| 3.6 | Anti-CD13/DAB-Färbung von Paraffinschnitten aus der Versuchsreihe mit Tipifarnib fällt negativ aus | 68 |
| 3.7 | Anti-CD13/DAB-Färbung von Paraffinschnitten aus der Versuchsreihe mit Antikörperkonstrukten fällt negativ aus | 69 |
| 3.8 | Analyse der THP-1 Zellen nach Applikation von Tipifarnib zeigt Effekte | 70 |
| 3.9 | TUNEL Assay nach Applikation von Tipifarnib zeigt eine Endothelschädigung | 72 |
| 3.10 | Anti-Annexin V/DAB-Färbung nach Applikation von Tipifarnib zeigt Apoptose in Endothelzellen | 74 |
| 3.11 | Analyse der THP-1 Zellen nach Applikation von beiden Antikörperkonstrukten zeigt Effekte | 75 |
| 3.12 | TUNEL Assay nach Applikation von Antikörperkonstrukten zeigt keine Endothelschädigung | 77 |
| 3.13 | Anti-Annexin V/DAB-Färbung nach Applikation von Antikörperkonstrukten zeigt keine Apoptose in Endothelzellen | 78 |
| 4.1 | Apoptosedetektion durch <i>in situ</i> Assays im Zusammenhang mit morphologischen Veränderungen | 85 |
| 4.2 | Sensitivität und Spezifität der TUNEL Methode | 86 |
| 4.3 | Signalwege, welche sich auf die pro- und antiapoptotischen Funktionen von RAS auswirken | 91 |

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen meinen Dank aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuerst gebührt mein Dank Frau Professor Dr. Heike Walles für die Bereitstellung des spannenden Themas, die Möglichkeit, meine Dissertation an ihrem Lehrstuhl anzufertigen und ihre uneingeschränkte Unterstützung nicht nur in fachlicher Hinsicht. Bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Gernot Stuhler und seiner Arbeitsgruppe möchte ich mich für die kooperative Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Antikörper und Zellen bedanken. Ferner danke ich Herrn Professor Dr. Stefan Knop für seine Bereitschaft das Zweitgutachten zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Gudrun Dandekar und Dr. Sarah Nietzer für die jederzeit hervorragende Betreuung mit hilfreichen Anregungen und konstruktiver Kritik und die geduldige Korrektur meiner Arbeit. Für die freundliche und hilfsbereite Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Versuchsdaten bin ich Herrn Dipl.-Math. Johannes Hain sehr dankbar.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern/innen des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin für die freundliche Aufnahme, die tolle Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft bedanken. Spezieller Dank geht an Florentin Baur, der mir oft bei den experimentellen Methoden ausgeholfen hat und immer ein offenes Ohr für mich hatte, und an Sabine Wilhelm für die großartige und kompetente Unterstützung in der Durchflusszytometrie. Weiterhin an Anna Strattmann für die Hilfestellung bei Fragen zum TUNEL Assay sowie an Holger Kirch und David Fecher für die Versorgung mit primären Endothelzellen und jegliche Unterstützung im Labor. Bei Carolin Tripp bedanke ich mich für die Einführung in die Zellkultur und bei Christa Amrehn für die Bereitstellung ihres Wissens in der Histologie. Für die Aufmunterungen und guten Ratschläge bin ich Dr. Maria Steinke

Danksagung

und Dr. Joachim Nickel sehr dankbar. Ferner möchte ich mich bei Moni und Andrea für die interessanten Gespräche bedanken und dass sie mit ihrer Art auch schon um 6 Uhr morgens für eine gute Stimmung im Labor gesorgt haben.

Bei meinen Freunden möchte ich mich insbesondere bei Sandra und Daniel für die gemeinsame Zeit im Studium und unsere langjährige Freundschaft bedanken. Auch Thomas danke ich dafür, dass er mir immer wieder in speziellen Fragestellungen bei der Programmierung weitergeholfen hat. Bei Julian möchte ich mich besonders für die Einführung in LaTeX, die anhaltende Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit und die kritischen Diskussionen bedanken. Mein herzlicher Dank geht darüber hinaus an Patrick für die großartige und professionelle Hilfe mit den Bildern und LaTeX sowie das fleißige und aufmerksame Korrekturlesen meiner komplizierten Schachtelsätze.

Mein innigster Dank gilt abschließend meinen Eltern, die mich bedingungslos in jeglicher Hinsicht unterstützt und wesentlich zum erfolgreichen Abschluss meines Studiums und dieser Arbeit beigetragen haben, sowie meiner Oma, Gerd, Anni, Josef, Gertrude und Ermil, die jahrelang, in guten wie in schlechten Zeiten, an meiner Seite standen. Auch meinen verstorbenen Großeltern und Ludwig danke ich zuletzt dafür, dass sie mich auf einem Abschnitt meines Lebensweges treu begleitet haben.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen entfernt.