

**Aus der Klinik und Poliklinik für Thorax-, Herz- und Thorakale
Gefäßchirurgie**

der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. Rainer G. Leyh

**Dosis-Wirkungs-Beziehungen von Gefitinib
in einem humanen Lungentumormodell**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Elena Johanna Dorothee Weigl

aus München

Würzburg, im Mai 2019

Referent: Prof. Dr. med. Thorsten Walles

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Theo Pelzer

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Mai 2020

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen Eltern.

Life isn't flat.

(K. Smalley)

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Das Lungenkarzinom	1
1.2.	Die EGFR-Signalkaskade.....	2
1.3.	Gefitinib.....	5
1.4.	Resistenzmechanismen.....	7
1.5.	<i>Tissue Engineering</i>	9
1.6.	Fragestellung.....	12
2.	Material und Methoden	13
2.1.	Material.....	13
2.1.1.	Geräte.....	13
2.1.2.	Labormaterialien	15
2.1.3.	Verbrauchsmaterial.....	16
2.1.4.	Chemikalien	17
2.1.5.	Medien, Puffer und Lösungen.....	18
2.1.6.	<i>Kits</i>	21
2.1.7.	Antikörper für Immunhistochemie und <i>Western Blot</i>	22
2.1.8.	Zelllinien.....	24
2.1.9.	<i>Software</i>	24
2.2.	Methoden	25
2.2.1.	Zellkultur	25
2.2.2.	2D Zellkultur	28
2.2.3.	Aufbau des humanen 3D Lungentumormodells.....	28
2.2.4.	Vitalitätsbestimmungen.....	35
2.2.5.	Bestimmung der Apoptoserate.....	39
2.2.6.	Histologie und Immunhistologie.....	40
2.2.7.	Proteinanalyse.....	44
3.	Ergebnisse	53
3.1.	Etablierung der Vitalitätsassays im statischen 3D Lungentumormodell	53
3.1.1.	Anpassung des CellTiter-Glo [®] 3D Zellvitalitätsassay	53
3.1.2.	Anpassung des RealTime-Glo [™] MT Zellvitalitätsassay	56

3.2.	Behandlung mit dem EGFR-TKI Gefitinib.....	59
3.2.1.	Dosis-Wirkungs-Beziehungen in der 2D Zellkultur	59
3.2.2.	Dosis-Wirkungs-Beziehungen im statischen 3D Lungentumormodell	60
3.3.	Charakterisierung von Gefitinib-sensitiven und Gefitinib- resistenten Zellen im dynamischen 3D Lungentumormodell	69
3.3.1.	Demonstration der Gefitinib-Resistenz	69
3.3.2.	Charakterisierung von Zellwachstum, Markerexpression und Signalwegsaktivierungen	70
3.4.	Generierung einer neuen, gegen Gefitinib resistenten Subpopulation (HCCres A5)	76
4.	Diskussion	77
4.1.	Etablierung der Vitalitätsassays	78
4.1.1.	Anpassung des CellTiter-Glo [®] 3D Zellvitalitätsassay	78
4.1.2.	Anpassung des RealTime-Glo [™] MT Zellvitalitätsassay	80
4.2.	Dosis-Wirkungs-Beziehung von Gefitinib	82
4.2.1.	Konzentrationsabhängige Wirkung	82
4.2.2.	Zeitliche Wirkung	84
4.2.3.	Die EGFR-Signalkaskade.....	85
4.2.4.	Zellzyklusarrest oder Apoptose?.....	89
4.3.	Eignung des Lungentumormodells	94
4.3.1.	Wachstumseigenschaften	94
4.3.2.	Proliferation	96
4.3.3.	Zelldifferenzierung und Markerexpression	97
4.4.	Entwicklung von Resistenzen	99
4.4.1.	Generierung resistenter Zellen	99
4.4.2.	Veränderung des EGFR	100
4.4.3.	Aktivierung alternativer Signalkaskaden	102
4.4.4.	EMT und SCLC-Transformation	103
4.5.	Ausblick	105
5.	Zusammenfassung.....	107
6.	Literaturverzeichnis	108

7.	Anhang.....	123
7.1.	Zusatzabbildungen.....	123
7.2.	Abkürzungsverzeichnis	125
7.3.	Abbildungsverzeichnis	128
7.4.	Tabellenverzeichnis	130

1. Einleitung

1.1. Das Lungenkarzinom

Maligne Tumore stellen nach den kardiovaskulären Erkrankungen die häufigste Todesursache in Industrienationen dar [1]. Das Lungenkarzinom ist dabei weltweit das bei Männern am zweithäufigsten und bei Frauen am dritthäufigsten diagnostizierte Karzinom [2]. Aufgrund der hohen Mortalität handelt es sich beim Lungenkarzinom um die häufigste krebsbedingte Todesursache [2-4]. Die schlechte Prognose liegt in dem spätem Auftreten von Symptomen, der frühzeitigen Metastasierung und der raschen Entwicklung von Chemotherapie-Resistenzen begründet [3, 4].

Das Lungenkarzinom lässt sich histologisch in das kleinzellige Lungenkarzinom (*Small Cell Lung Cancer*, SCLC) und die nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome (*Non-Small Cell Lung Cancer*, NSCLC) einteilen [5, 6]. Die NSCLC stellen mit ca. 85 % aller Lungenkarzinome die größere Gruppe dar [6]. Sie werden in Adenokarzinome (50 %), Plattenepithelkarzinome (30 %), großzellige Lungenkarzinome sowie Mischtypen unterteilt [6, 7]. Diese Einteilung kann aufgrund von schlechter Differenzierung der Tumorzellen und heterogener histologischer Zusammensetzungen erschwert sein, sodass eine Unterscheidung zunehmend anhand zugrundeliegender molekularbiologischer und genetischer Veränderungen getroffen wird [8].

Im Genom aller Tumorzellen können somatische Mutationen nachgewiesen werden, die besonders häufig in onkogenen Signalwegen auftreten und entscheidend für die Entstehung von Neoplasien sind [9, 10]. Als Hauptrisikofaktor für Mutationen im Lungenkarzinom gilt das Rauchen, welches am häufigsten bei Patienten mit SCLC ursächlich ist, wohingegen bei Nichtrauchern häufiger das Adenokarzinom auftritt [7, 11]. Mit einer sinkenden Zahl an Rauchern in der westlichen Welt wird in Zukunft mit einer relativen Zunahme an Adenokarzinom-Fällen unter den Lungenkarzinomen gerechnet [7, 12].

In Adenokarzinomen liegen die häufigsten zugrundeliegenden Mutationen im *Kirsten Ratten Sarkom Homolog (KRAS)*-Gen und im *Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)*-Gen [8, 13, 14]. Weitere mögliche Mutationen können im *Rapid-Akzeleriertes-Fibrosarkom Homolog B1 (BRAF)*-Gen oder im *Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)*-Gen auftreten. Auch eine Amplifikation des Hepatozyten Wachstumsfaktorrezeptors (HGFR) oder strukturelle Veränderungen in der Anaplastischen Lymphom Kinase (ALK) sind bekannt [11].

Eine aktivierende Mutation im *EGFR*-Gen liegt in 10-40 % aller Adenokarzinome vor, wobei die Prävalenz bei Frauen, Nichtrauchern und Patienten asiatischer Herkunft höher ist [11, 15, 16]. Zugrunde liegen in 85 % der *EGFR*-Mutationen eine Deletion (del) in Exon 19 der intrazellulären Tyrosin-Kinase-Domäne des EGFR (delE746-A750) oder eine Punktmutation in Exon 21 (L858R) [11, 17-19].

1.2. Die EGFR-Signalkaskade

Für die Entdeckung des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) und dessen proliferativer Wirkung auf Epithelzellen in den 50er Jahren erhielt Stanley Cohen den Nobelpreis für Medizin [20]. Diese und die anschließende Entdeckung des EGFR stellten einen Wendepunkt in dem Verständnis der Embryogenese und der Zellphysiologie im erwachsenen Menschen dar [21-23]. Die Entwicklung von epithelialen Strukturen von Haut, Lunge, Pankreas, Gastrointestinaltrakt, Auge und zentralem Nervensystem wird über den EGFR gesteuert [19, 24]. Dabei reguliert die EGFR-Signalkaskade Überleben, Wachstum, Proliferation, Angiogenese, Invasion und die Differenzierung von Zellen und spielt eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Tumoren [11, 19, 25, 26].

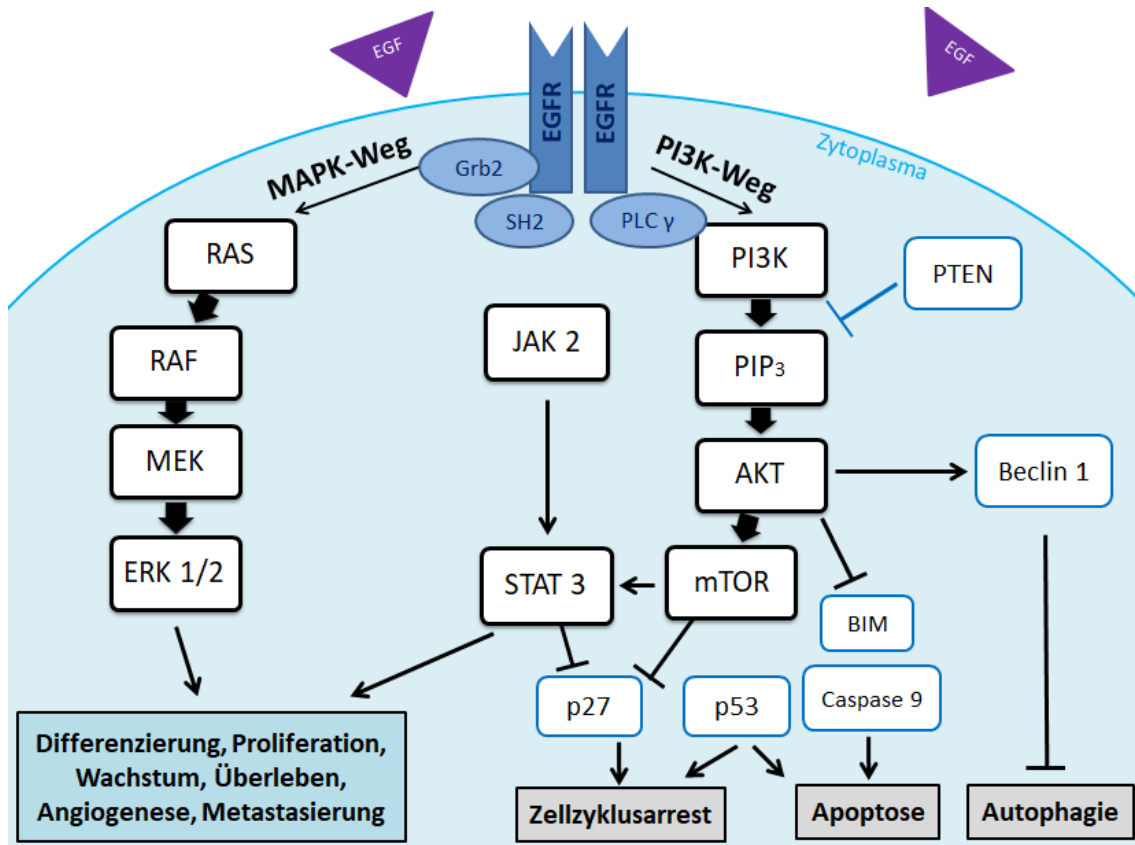
Beim EGFR handelt es sich um eine transmembranöse Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK), bestehend aus einer extrazellulären Domäne, an die passende Liganden binden können, einer transmembranösen und einer intrazellulären, zytoplasmatischen Domäne mit katalytischer Kapazität [26-28].

Die Familie der humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (HER) beinhaltet neben dem EGFR (HER-1) noch drei weitere Rezeptoren: HER-2, HER-3 und HER-4 [27]. Der EGFR und der HER-2 spielen als Onkogene und als Angriffspunkte für zielgerichtete Therapien eine große Rolle [26]. Bindet einer von elf verschiedenen Liganden aus der EGF-Familie an den EGFR, führt dies zu einer Homodimerisierung oder zu einer Heterodimerisierung der Rezeptoren. Es kommt zu einer Autophosphorylierung der zytoplasmatischen Tyrosin-Kinase, wodurch vielschichtig vernetzte intrazelluläre Signale und Interaktionen in Gang gesetzt werden [19, 26-28].

Die Autophosphorylierung der dimerisierten Rezeptoren führt zunächst zu einer Bindung von Adapter-Proteinen [19, 24], welches verschiedene Signalwege in Gang setzt. Die entscheidenden Signalkaskaden sind dabei der Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinase (MAPK)-Weg, der für die Stimulation von Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Zellüberleben zuständig ist, und der PI3K-Weg, über den insbesondere die Inhibition der Apoptose aber auch die Regulation des Metabolismus, der Proliferation und des Glukosehaushalts gesteuert werden (siehe Abbildung 1) [19, 24, 29-32].

Über verschiedene Aktivatoren, wie beispielsweise die Janus-Kinase 2 (JAK 2), oder über das mechanische Zielmolekül von Rapamycin (mTOR) laufen einige der Wege in den Signaltransduktoren und Transkriptionsaktivatoren (STAT) zusammen [33]. Die STAT besitzen eine Doppelrolle als zytoplasmatische Botenstoffe und als Transkriptionsfaktoren im Zellkern. Im Verlauf werden schließlich unterschiedliche Transkriptionsfaktoren, wie das zyklische Adenosinmonophosphat *response element* bindende Protein (*cAMP response element-binding protein*, CREB) oder *c(cellular)*-Jun, über die Signalkaskaden aktiviert und greifen in die Transkription von Genen ein (in Abbildung 1 nicht dargestellt) [24, 30, 34]. Eine Vielzahl an Interaktionen und Rückkoppelungs-Schleifen zwischen den Signalmolekülen sind bekannt und Gegenstand weiterer Forschungen [24].

Die Signalkaskade wird unter anderem durch Endozytose und den lysosomalen Abbau des EGFR nach Binden der Liganden beendet [26].



AKT	Protein Kinase B	p27	Protein 27/CDK-Inhibitor 1B
BIM	Bcl-2 interagierender Zelltodmediator	p53	Protein 53
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor	PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor	PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
ERK 1/2	Extrazellulär-Signal regulierte Kinase 1/2	PLC γ	Phospholipase Cy
Grb2	Wachstumsfaktorgebundes Protein 2	PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
JAK 2	Janus Kinase 2	RAF	Rapid-Akzeleriertes Fibrosarkom
MAPK	Mitogen-Aktivierte Protein Kinase	RAS	Ratten Sarkom
MEK	Mitogen-Aktivierte Protein Kinase Kinase	SH2	SRC Homolog 2 Domäne
mTOR	mechanisches Zielmolekül von Rapamycin	STAT 3	Signaltransduktor und Transkriptionsaktivator 3

Abbildung 1: Übersicht über die EGFR-Signalkaskade. Es werden der MAPK-Weg und der PI3K-Weg unterschieden. Onkogene und wachstumsfördernde Prozesse sind in dem blau hinterlegten Kasten aufgelistet, während die das Wachstum kontrollierenden Prozesse in den grau hinterlegten Kästen dargestellt sind. Bildquelle: modifiziert nach [19, 35] (19: mit freundlicher Genehmigung von Elsevier; 35: *Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License*).

In Tumoren kann es aufgrund von aktivierenden Mutationen, Überexpression des EGFR sowie autokriner oder parakriner Synthese der Liganden zu einer überschießenden Aktivität der durch den EGFR aktivierten Signalwege kommen [27]. Die zuvor beschriebene aktivierende *EGFR*-Mutation in Exon 19 führt zu einer Liganden-unabhängigen Autophosphorylierung des Rezeptors und einer dauerhaften Aktivität der Signalwege. Die Induktion von Proliferation, Wachstum, Angiogenese und Invasivität der Zellen sowie die Inhibition der Apoptose führen zur Entstehung von Zellen mit onkogenem Potential [10, 11]. Es entwickelt sich eine Abhängigkeit der Zellen gegenüber den dauerhaft aktivierten Signalwegen (*oncogene addiction*) [36], wodurch die Signalmoleküle dieser Kaskaden ideale Angriffspunkte für das gezielte Eingreifen in überlebenswichtige Prozesse der Krebszellen darstellen [8, 36]. Diese zielgerichteten Therapien (*targeted therapies*) führen meist zu ausgeprägten antiproliferativen Ergebnissen und weisen eine bessere Verträglichkeit auf als klassische Chemotherapeutika [36-39]. Die EGFR-Familie ist beispielsweise der Angriffspunkt von monoklonalen Antikörpern, wie dem Anti-HER-2-Antikörper (Trastuzumab), der die Rezeptordimerisierung verhindert. Auch RTK-Inhibitoren wie Gefitinib, das mit Adenosintriphosphat (ATP) um die ATP-Bindungsstelle konkurriert und die zytoplasmatische Rezeptor-Aktivität inhibiert, kommen zum Einsatz [26, 27, 31].

1.3. Gefitinib

Gefitinib (Iressa[®], AstraZeneca) ist neben Erlotinib (Tarceva[®], Roche) ein reversibler, oraler EGFR-Tyrosin-Kinase-Inhibitor (EGFR-TKI) der ersten Generation, der in der Behandlung von Adenokarzinomen mit einer aktivierenden *EGFR*-Mutation eingesetzt wird.

Vor der Einführung von Gefitinib wurden trotz bekannter histologischer und morphologischer Unterschiede alle fortgeschrittenen Tumorerkrankungen aus der heterogenen Gruppe der NSCLC mit einer Platin-haltigen Kombinations-Chemotherapie behandelt [40, 41]. Darunter verlängerte sich das progressionsfreie Überleben um nur vier bis sechs Monate und das durchschnittliche Gesamtüberleben lag bei zehn bis zwölf Monaten [42].

NSCLC mit einer aktivierenden *EGFR*-Mutation zählten zu den NSCLC mit der schlechtesten Prognose [43].

Gefitinib erhielt als erste zielgerichtete Therapie des NSCLC 2003 von der US-amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) eine beschleunigte Zulassung aufgrund der Überlebensverbesserung in ansonsten palliativen Situationen [44-46]. Allerdings konnte in einer randomisiert-kontrollierten Studie kein Effekt auf das Gesamtüberleben gezeigt werden, sodass eine Restriktion der Zulassung erfolgte [8, 47]. Auffällig war, dass am meisten Frauen, Nichtraucher und Patienten asiatischer Herkunft von einer Therapie mit Gefitinib profitierten [18, 48, 49]. Erst die Assoziation des Therapieerfolges in nur 10-20 % der Behandelten mit dem Vorliegen einer *EGFR*-Mutation führte zu der gezielten Selektion von Patienten und dem verbreitetem Einsatz von Gefitinib [8, 17, 45, 50, 51].

Gefitinib ist eine Anilinoquinazolin-Verbindung, die reversibel an die ATP-Bindungstasche des EGFR bindet und diesen kompetitiv inhibiert. Dabei zeigt Gefitinib eine höhere Affinität für die mutierte Variante des EGFR als für den Wildtyp-EGFR [17, 52, 53]. Dies führt zu einer selektiven Inhibition der mutierten Rezeptoren, einem gezielten Ansprechen der mutierten Tumorzellen und einem reduzierten Nebenwirkungsprofil [54]. Zu den unerwünschten Wirkungen gehören Hautausschläge oder Diarrhoe, was mit der erhöhten EGFR-Expression in Epithelien zusammenhängt [48, 50, 51]. Unter der Therapie mit Gefitinib kam es im Vergleich zur Standard-Chemotherapie zu einem signifikant häufigeren Therapieansprechen, einer signifikant verzögerten Progredienz und einem verlängerten Gesamtüberleben von insgesamt 27-30 Monaten [55-57].

In klassischen zytotoxischen Chemotherapie-Regimen wird meist die beste Wirksamkeit durch Medikament-Konzentrationen erzielt, die mit starken Nebenwirkungen einhergehen. Die Dosierung muss nach maximal tolerierbaren Nebenwirkungen gewählt werden und wird dadurch limitiert. In den zielgerichteten Therapien hingegen ist das Nebenwirkungsprofil oftmals weniger ausgeprägt und es steht im Vordergrund, die optimale Konzentration für eine möglichst effektive, antiproliferative Behandlung zu finden [58-60].

1.4. Resistenzmechanismen

In der Entwicklung von Resistenzen wird zwischen primären Resistenzen (*ab initio*) und sekundären, erworbenen Resistenzen (*de novo*) unterschieden. Ein primäres Nichtansprechen auf die Therapie mit Gefitinib weisen unter anderem Tumore mit Mutationen in *KRAS*-, *BRAF*-, (*Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinase*) *MEK*- und dem *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat 3-Kinase, katalytische Untereinheit Alpha (PIK3CA)*-Gen auf [61].

In der Behandlung von EGFR-TKI-sensitiven NSCLC ist die Entstehung von *de novo* Resistenzen innerhalb weniger Monate nach Behandlungsbeginn ein großes Problem [32, 61]. Ursächlich für ein Therapieversagen von Gefitinib nach initialem Ansprechen kann zum einen die Selektion von primär resistenten Zellen in heterogenen Lungentumoren oder zum anderen die Entwicklung von neuen Resistenzen durch die Therapie sein. Es haben sich keine Unterschiede in der Resistenzbildung in Hinblick auf die zugrundeliegende *EGFR*-Mutation (L858R- oder delE746-A750- Mutation) gezeigt [62]. Das gleichzeitige Vorliegen verschiedener Resistenzmechanismen ist keine Seltenheit und kann unterschiedliche Therapieansätze verlangen [62]. Die durchschnittliche Zeit bis zum Therapieversagen von Gefitinib beträgt 9-13 Monate [55-57].

In mehr als der Hälfte aller erworbener Resistenzen kommt es zu einer T790M-Mutation in Exon 20 des *EGFR*-Gens, die durch den Austausch der Aminosäure Threonin mit Methionin in Position 790 charakterisiert ist [62-66]. Diese Mutation führt zu einer erhöhten ATP-Affinität des mutierten EGFR in den Tumorzellen [67]. Es kommt zu einer stärkeren Konkurrenz von ATP um die Bindung an den EGFR und folglich zu einer verminderten Inhibition durch Gefitinib [67]. Ein weiterer beschriebener Mechanismus für die Resistenzbildung aufgrund der T790M Mutation ist die Blockade des B-Zelllymphom 2 (Bcl2)-interagierenden-Zelltodmediator (BIM) [68]. BIM ist ein pro-apoptotisches Protein, das durch die Proteinkinase B (AKT) gehemmt wird und durch den Einsatz von EGFR-TKIs den programmierten Zelltod initiiert [68]. In T790M mutierten Zellen kommt es demnach zusätzlich zu einem Abfall der Apoptoserate. Weitere Mutationen wie T854A, D761Y oder L747S, die den EGFR beeinflussen, finden sich seltener [68-70].

In etwa 15-20 % entwickelt sich eine Gefitinib-Resistenz aufgrund einer Amplifikation des *Mesenchymale-Epitheliale-Transition(MET)*-Gens, das für den HGFR kodiert und über diesen den PI3K/AKT-Weg aktiviert [71, 72]. Eine Amplifikation führt - unabhängig vom inhibierten EGFR - über intrazelluläre Signalwege zu Proliferation, Wachstum, Angiogenese und Inhibition der Apoptose in den Tumorzellen [71, 72].

Ein weiterer Mechanismus der Resistenzbildung ist die Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT), die den Übergang von Epithelzellen zu Zellen mit mesenchymalen Charakteristika beschreibt. Diese Transition ist in der Embryogenese, aber auch für die Invasion und die Metastasierung von Tumorzellen relevant [73-75]. Es zeigt sich ein Verlust der Zell-Zell-Kontakte über eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die eine Ausbildung von Adhäsionsmolekülen wie E-Cadherin herabregulieren [76-79]. Durch die abnehmende Adhäsionsfähigkeit wird eine Veränderung der Zellmorphologie und ein vermehrtes Migrationspotential der Zellen möglich [73, 80].

In der Entwicklung von Resistenzen ist außerdem eine histopathologische Konversion der NSCLC-Zellen zu spindelförmigen SCLC-Zellen beschrieben [65, 81]. Dieser Übergang ist häufig mit anderen Mechanismen der Resistenzbildung assoziiert und nur nach einer Therapie mit EGFR-TKIs beschrieben. Ein kausaler Zusammenhang bleibt jedoch unklar [62]. Die phänotypisch veränderten Lungentumorzellen zeigen ein vermehrtes Ansprechen auf die klassische Radiochemotherapie des SCLC, sodass eine frühzeitige Identifizierung das Therapieregime beeinflusst [62]. Auch wurden Fälle beschrieben, in denen die entwickelten Resistenzen nach Beendigung der EGFR-TKI-Therapie reversibel waren und sich im weiteren Lauf eine erneute Sensibilität für Gefitinib zeigte [65].

1.5. *Tissue Engineering*

Nur etwa 8 % aller Medikamente, die für Phase I Studien zugelassen werden, werden später auch in der Regelbehandlung eingesetzt [82]. Grund dafür ist unter anderem die unzulängliche Vorhersage von Sicherheit und Wirksamkeit eines Medikaments in präklinischen Testreihen wie beispielsweise zweidimensionalen (2D) Zellkulturen oder Tiermodellen [82, 83]. Für eine effiziente und therapierelevante Erforschung von Tumoren und ihrer Therapien sind daher einfache und kosteneffiziente Modelle erforderlich, die sowohl die Gegebenheiten im menschlichen Organismus mit möglichen Zell-Zell-Interaktionen widerspiegeln, als auch eine zügige und verlässliche Testung von Medikamenten erlauben.

Die Untersuchung von Tumoren und deren Therapien erfolgt gegenwärtig anhand von frischem Tumorgewebe, Zelllinien und Tiermodellen [84].

Die Beschaffung von frischem Tumorgewebe kann eine technische und finanzielle Herausforderung darstellen. Es handelt sich dabei um sehr heterogene Gewebe aus diversen malignen und nicht-malignen Zellen unterschiedlicher Individuen, die eine vergleichende Untersuchung unter normalisierten Bedingungen nicht erlauben [84].

Versuche mit Tumorzelllinien haben gezeigt, dass diese in der 2D *in vitro* Kultivierung ihre Differenzierung beibehalten können und so eine Untersuchung ohne einflussnehmende Umgebungsfaktoren, wie beispielsweise Stroma- und Entzündungszellen ermöglichen [85, 86]. Dies lässt eine Isolierung von charakteristischen Mutationen sowie eine beinahe unendliche und schnelle Reproduktion der Zellen zu [87]. Von Vorteil sind dabei die einfache Handhabung, ein besseres Verständnis der Tumor-Molekularbiologie, eine weltweite Reproduzierbarkeit von Versuchsergebnissen und zügige Medikamententestungen [88]. Die Kultivierung von Zelllinien über einen längeren Zeitraum führt jedoch zu einem Verlust der ursprünglichen Tumoreigenschaften oder zu einer Selektion von irrelevanten Subpopulationen, sodass die Zellen nicht mehr als repräsentativ für den Tumor gelten [84, 87, 89]. Besonders aber das schnelle Zellwachstum spiegelt die *in vivo* Gegebenheiten nicht korrekt wider [90].

Die Umgebung eines Tumors spielt ebenfalls seine große Rolle für die lokale Ausbreitung, die Differenzierung, das Wachstum, die Angiogenese und die Invasivität von malignen Zellen [10, 87, 91-93]. Diese Interaktion der Tumorzellen mit dem Stroma, Immunzellen und dem Gefäßsystem ist durch eine Implantation von Tumorzellen in Nagetiere (Xenografts) imitierbar [94, 95]. Die Untersuchungen zu Sicherheit und Wirksamkeit von Medikamenten in Tierversuchen sind sehr verbreitet. In mehr als der Hälfte der Fälle sind die Erkenntnisse jedoch nicht auf den menschlichen Organismus übertragbar oder erlauben keine aussagekräftige Vorhersage über mögliche Reaktionen und Interaktionen [96, 97]. Dies liegt unter anderem an deutlichen Spezies-spezifischen Unterschieden und der schweren Durchführbarkeit von Echtzeitversuchen und Untersuchungen unter dem Mikroskop [96, 97]. Zudem ist für die Tierversuche ein großer zeitlicher und finanzieller Aufwand nötig. Unter ethischen und ideologischen Gesichtspunkten sowie nach Maßgabe der aktuell geltenden Tierschutzvorschriften mit Umsetzung des 3R-Prinzips – *replace* (Vermeiden), *reduce* (Verringern) und *refine* (Verbessern)- sollte eine weitere Reduktion von Tierversuchen angestrebt werden [98-100].

Das *Tissue Engineering* ist ein interdisziplinäres Forschungsgebiet von Zellbiologie, Materialtechnik und Biotechnologie, das sich dem Aufbau funktionaler Gewebe widmet und so eine Brücke zwischen 2D Zellkulturen und Tierversuchen bildet [90, 101-103]. Erste Versuche wurden bereits 1933 von Bisceglie unternommen [104] und seit 1980 widmen sich viele Forschergruppen der Konstruktion von Geweben [101, 102]. Die Herstellung von artifiziellen Geweben im Rahmen der regenerativen Medizin oder von Krankheitsmodellen für die Forschung wird dadurch möglich [105]. Dabei werden biologische oder synthetische Trägerstrukturen mit Zellen besiedelt und ein möglichst naturgetreues Gewebe *in vitro* hergestellt (Abbildung 2). Das spezielle biologische Mikromilieu im menschlichen Körper kann durch biologische Trägerstrukturen imitiert werden, die Interaktionen zwischen Extrazellulär-Matrix und Zellen ermöglichen.

Diese haben großen Einfluss auf die Zell-Morphologie, die Aktivierung von Signalwegen und Zellinteraktionen, welche in dreidimensionalen (3D) Modellen ohne Trägerstruktur nicht berücksichtigt werden [91, 106-108]. Denkbare und bereits eingesetzte Anwendungen reichen von Geweben zur Grundlagenforschung und pharmakologischen Testsystemen über den Ersatz von nicht regenerierbaren Organen und Geweben bis hin zur Etablierung von patientenspezifischen Tumormodellen [107, 109-112].

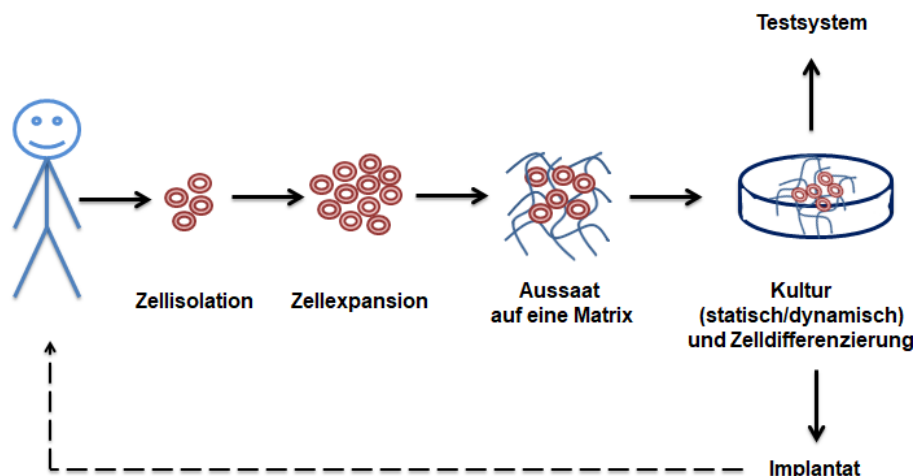


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Prinzipien des *Tissue Engineering*.

Aus dem Patienten/einem lebenden Organismus entnommene Zellen werden nach einer *in vitro* Isolation und Expansion auf eine biologische oder synthetische Trägerstruktur (Matrix oder *Scaffold*) ausgesät und unter verschiedenen Bedingungen kultiviert. Dadurch kommt es zu einer Differenzierung der Zellen. Diese können entweder in den Patienten rückimplantiert werden oder als Testsysteme zur Verwendung kommen. Bildquelle: modifiziert nach [113], *Creative Commons Attribution 4.0*; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

1.6. Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Dosis-Wirkungs-Beziehung von Gefitinib und die Entstehung von Gefitinib-Resistenzen in einem etablierten humanen Lungentumormodell zu untersuchen. Dabei steht insbesondere die Eignung des Lungentumormodells für Untersuchung der zeit- und konzentrationsabhängigen Wirkung von Gefitinib im Vordergrund.

Die Bestimmung der Gewebevitalität als Kriterium des Behandlungserfolges wurde durch eine Anpassung des CellTiter-Glo[®] 3D Zellvitalitätsassay und des RealTime-Glo[™] MT Zellvitalitätsassay von Promega an das statische 3D Lungentumormodell möglich. Es wurde die Vitalität in der 2D Zellkultur und im statischen 3D Lungentumormodell bestimmt und die Effekte von Gefitinib auf Proliferation, Apoptose, Wachstumsverhalten, Markerexpression und Signalwegsaktivierungen untersucht.

Anschließend erfolgte die Kultivierung von Gefitinib-sensitiven und –resistenten Zellen für die vergleichende Charakterisierung der beiden Subpopulationen. Für weiterführende Untersuchungen auf dem Gebiet der Resistenzentwicklung sollte eine resistente Subpopulation generiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller/Lieferant
Accu-jet Pipettierhilfe	Brand (Wertheim, D)
Analysenwaage	Kern (Balingen-Frommern, D)
Absaugsystem Vacusafe	NTEGRA Biosciences (Fernwald, D)
Abzug	Prutscher Laboratory Systems (Neudörfel, A)
Aufnahmestation FluorChem Q	Biozym Scientific (Oldendorf, D)
Autoklaven: DX-45 Tischautoklav Dampfsterilisierer "Varioklav" Technoclav	Systec (Wettenberg, D) HP Medizintechnik (Oberschleißheim, D) Biomedis (Giessen, D)
Blot-Kammer Biometra Fastblot B44	Biometra GmbH (D)
Bioreaktor Inkubator	Lehrstuhl für <i>Tissue Engineering</i> und Regenerative Medizin (TERM Würzburg, D)
Paraffineinbettstation EG1150H	Leica (Wetzlar, D)
Brutschrank (37°C, 5% CO ₂)	Heraeus (Hanau, D)
Dampfgarer „MultiGourmet“	Braun (Kronberg, D)
Digitalkamera	Canon (Krefeld, D)
Duales Gelsystem PerfectBLue Twin S	Preqlab Blotechnologie (Erlangen, D)
Einbettautomat (STP120 spin) und Aufblockstation	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, D)
Einfrierhilfe „Mr. Frosty“	VWR (Darmstadt, D)
Einhängethermostat für das Wasserbad	Lauda (Lauda-Königshofen, D)
Einkanalpipetten	Eppendorf (Hamburg, D)
Eismaschine AF-80	Scotsman (Mailand, I)
Flüssigstickstofftank MVE 815 P190 (-180°C)	German-cryo (Jüchen, D)
Gefrierschrank -20°C: Comfort -80°C: HFU586 Basic	Liebherr (Biberach a.d. Riss, D) Heraeus Med (Hanau, D)
Handzähler	neoLab (Heidelberg, D)
Heißluftsterilisator	Memmert Heraeus (Hanau, D)
Kassettenbeschriftungsgerät VCP 5001	Vogel Medizintechnik (Giessen, D)
Kühlraum 4 °C	Genheimer (Höchberg, D)
Kühlplatte EG1150 C	Leica (Wetzlar, D)

Kühlschrank „MedLine“	Liebherr (Biberach a.d. Riss, D)
Magnetrührer mit Heizung 720-HPS	VWR (Darmstadt, D)
Mikroplattenleser Tecan Infinite M200	Tecan (Crailsheim, D)
Mikroskope: Lichtmikroskop Fluoreszenzmikroskop BZ-9000	Zeiss (Göttingen, D) Keyence (Neu-Isenburg, D)
Multikanal Pipette plus	Eppendorf (Hamburg, D)
Multistep Pipette	Brand (Wertheim, D)
Neubauer Zählkammer	Hartenstein (Würzburg, D)
Objektträgerbeschriftungsgerät VSP 5001	Vogel Medizintechnik (Giessen, D)
Orbitalschüttler	neoLab (Heidelberg, D)
Peristaltische Pumpe	Ismatec (Wertheim-Mondfeld, D)
pH-Meter	Mettler Toledo (Giessen, D)
Pipettenstopfmaschine	Bellco Glass (Asbach, D)
Pumpschlauch-Kassette	Ismatec (Wertheim-Mondfeld, D)
Rollmixer	Hartenstein (Würzburg, D)
Schlittenmikrotom	Leica (Wetzlar, D)
Spülmaschine	Miele (Gütersloh, D)
Sterilwerkbank SAFE2020	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, D)
Stromversorgungseinheiten (EV202 und EV243)	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, D)
Thermostat	Eppendorf (Hamburg, D)
Trockenschrank	Memmert (Schwabach, D)
Vortex “Genie 2”	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Wärmeschrank	Medite (Burgdorf, D)
Wasseraufbereitungssystem	Millipore (Schwalbach, D)
Wasserbad	(Lauda-Königshofen, D)
Wasserbad für Paraffinschnitte	GFL (Burgwedel, D)
Wippschüttler	neoLab (Heidelberg, D)
Zentrifugen: Zentrifuge 5417R Multifuge X12 Multifuge X1R Pico 17 Rotilabo	Eppendorf (Hamburg, D) Thermo Fisher Scientific (Dreieich, D) Thermo Fisher Scientific (Dreieich, D) Thermo Fisher Scientific (Dreieich, D) Carl Roth (Karlsruhe, D)

2.1.2. Labormaterialien

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Labormaterialien

Labormaterial	Hersteller/Lieferant
Aufbewahrungsbox (Plastik)	neoLab (Heidelberg, D)
Bechergläser	Schott (Mainz, D)
Beschwerungsringe, C-Form (für das Wasserbad)	Hartenstein (Würzburg, D)
Bioreaktoren (Fluss-)	GT-Labortechnik (D), Design: Lehrstuhl für <i>Tissue Engineering</i> und Regenerative Medizin (Würzburg, D)
Deckgläser	Menzel-Gläser (Braunschweig, D) VWR (Darmstadt, D)
Edelstahlgussform	Labonord (Mönchengladbach, D)
Elektrodenhalter	Hartenstein (Würzburg, D)
Eppendorfpipetten: 0,5-10, 10-100, 10-200, 100-1000 µL	Eppendorf (Hamburg, D)
Feuchtkammer	Werkstatt der Uniklinik (Würzburg, D)
Glaspasteurpipetten	Brand (Wertheim, D)
Glaspipetten: 5, 10, 25 mL	Brand (Wertheim, D)
Kälteschutzhandschuhe	VWR (Darmstadt, D)
Laborglasflasche: 50, 100, 250, 1000 mL	Schott (Mainz, D)
Laborglasflasche (Schott, D) mit Glasschlauchanschluss ('Oliven')	Weckert (Kitzingen, D)
Löffelspatel	Hartenstein (Würzburg, D)
Lösungsmittelfesterstift Dako Pen	Dako (Hamburg, D)
Luer-Gewinde (weiblich)	Mednet (Münster, D)
Luer Sicherungsring (weiblich)	Mednet (Münster, D)
Luer T-Ansatz (weiblich)	Mednet (Münster, D)
Luer-Ventil (nadelfrei, swabable)	Mednet (Münster, D)
Magnetrührstäbchen	Hartenstein (Würzburg, D)
Magnetstabentferner	Hartenstein (Würzburg, D)
Messzylinder	Brand (Wertheim, D)
Objektträgerboxen	neoLab (Heidelberg, D)
Objektträgerständer (Glas, Edelstahl)	Mercateo (München, D)
Pinzetten	Assistant (Sondheim, D)
Pipettencontainer	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Reaktionsgefäßständer	neoLab (Heidelberg, D)
Schlauchkupplung	Mednet (Münster, D)
Schutzbrille Gunmetal	VWR (Darmstadt, D)
Skalpellhalter	Bayha (Tuttlingen, D)
Sprühflasche	Hartenstein (Würzburg, D)
Ständer für Zentrifugenröhrchen	neoLab (Heidelberg, D)
Tischständer für Vernichtungsbeutel	Hartenstein (Würzburg, D)
Trichter	Hartenstein (Würzburg, D)
Wägeschälchen (Plastik)	VWR (Darmstadt, D)

Zellkronen (A4, PEEK)	GT-Labortechnik (D), Design: Lehrstuhl für <i>Tissue Engineering</i> und Regenerative Medizin (Würzburg, D)
-----------------------	---

2.1.3. Verbrauchsmaterial

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Dichtungsring MVQ 70 rot 27*2,5 mm, MVQ 10 rot 37*3 mm	Arcus Dichtelemente (Seevetal, D))
Einbettfilterpapier	Labonord (Mönchengladbach, D)
Einbettkassetten	Klinipath (Duiven, NL)
Einmalpipetten: 5, 10, 25, 50 mL	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D) Nerbe Plus (Winsen, D)
Handschuhe (Nitril)	Medline (Kleve, D)
Klarsichtfolie	Cofresco Frischhalteprodukte (Minden, D)
Kryoröhrchen: 1,8 mL	Nunc (Wiesbaden, D)
Luer-Lock Spritze 5mL, 10 mL	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Microtomklingen, Typ S35	pfm medical (Köln, D)
Nitrozellulosemembran: Protan	Whatman (Maidstone, UK)
Objektträger: unbeschichtet Polylysine TM	Menzel (Braunschweig, D) Langenbrinck (Emmendingen, D)
Papierhandtücher	IGEFA (Ahrensfelde, D)
Parafilm [®] , M	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Petrischalen: 145 x 20 mm	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Pipettenspitzen: 0,5-10, 10-100, 100-1000 µL	Eppendorf (Hamburg, D)
Pumpschlauch	Ismatec (Wertheim-Mondfeld, D)
Reaktionsgefäße: 0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL	Sarstedt (Nürnberg, D)
Skalpellklingen (rund)	Bayha (Tuttlingen, D)
Silikonschlauch	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Steriler Luftfilter, Porengröße 0,2 µm	Sartorius Stedium Biotech (Göttingen, D)
Vernichtungsbeutel	Hartenstein (Würzburg, D)
Whatman Filterpapier	Hartenstein (Würzburg, D)
Zellkulturflaschen: 75, 150 cm ²	TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, D)
Zellkultur-Multiwellplatten: 12-, 96-Well	TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, D)
Zellkultur-Multiwellplatte: 96-Well, weiß und schwarz	Greiner Bio-One (D)
Zellschaber	Sarstedt (Nürnberg, D)
Zentrifugenröhrchen: 15 mL, 50 mL	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D) Nerbe Plus (Winsen, D)

2.1.4. Chemikalien

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid (MTT)	Serva (Heidelberg, D)
Aceton	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Acrylamid (30 %)	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Albumin fraction V (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Ammoniumpersulfat (40 %, APS)	Carl Roth (karlsruhe, D)
Antikörperverdünnungslösung	DCS Innovative Diagnostik-Systeme (Hamburg, D)
Beta-Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Bromphenolblau (1 %)	Carl Roth (Karlsruhe, D)
BSA-Proteinstandard	Sigma-Aldrich (München, D)
Chloroform	Sigma-Aldrich (München, D)
Citronensäure	VWR (Darmstadt, D)
DAPI Fluoromount-GTM	SouthernBiotech (Birmingham, USA)
Demineralisiertes Wasser	Uniklinik Würzburg (Würzburg, D)
Descosept	Seidel medipool (Reichertshofen, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (München, D)
DNase	Roche (Penzberg, D)
Entellan	Merck (Darmstadt, D)
Eosin	Sigma-Aldrich, München (GER)
Eselserum	Life technologies (Darmstadt, D)
Ethanol (denaturiert, 96 %)	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Ethylen-diamin-tetra-acetat (EDTA)	Sigma-Aldrich (München, D)
Fetales Kälberserum	Bio&SELL (Feucht, D)
Gefitinib	Absource Diagnostics GmbH (München, D)
Glycerin (86 %)	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Haematoxylin sauer nach Mayer	Morphisto (Frankfurt am Main, D)
Incidin plus	Ecolab (Monheim am Rhein, D)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Methanol	Sigma-Aldrich (München, D)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Mowiol 4-88	Sigma-Aldrich (München, D)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Natriumdesoxycholat	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Natriumdodezylsulfat (10 %, SDS)	BioRad (München, D)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Natriumhydroxid (NaOH), Tabletten	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich (Sleeze, D)
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich (München, D)
N-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Paraffin	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Paraformaldehyd (PFA)	AppliChem (Darmstadt, D)

Penicillin/Streptomycin (100-fach)	PAA (Cölbe, D)
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS ⁻ ohne Mg und Ca)	Sigma-Aldrich (München, D)
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS ⁺ mit Mg und Ca)	Sigma-Aldrich (München, D)
Pierce ECL <i>Western Blotting</i> Substrat	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, D)
ProSieveR QuadColor™ Protein Marker	Lonza (Köln, D)
Proteaseinhibitor-Cocktail, Tablette	Roche (Penzberg, D)
Reinstwasser	Millipore (Schwalbach, D)
Roticlear-Histofix 4 %	Carl Roth (Karlsruhe, D)
RPMI-1640 medium	Life technologies (Darmstadt, D))
Tris	Sigma-Aldrich (München, D)
Trypanblau, (0,4 %)	Sigma Aldrich (München, D)
Trypsin/EDTA (0,5 %, 10x EDTA, 4 Na)	Invitrogen (Darmstadt, D)
Tween-20	Sigma-Aldrich (München, D)
Xylol	Carl Roth (Karlsruhe, D)

2.1.5. Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Übersicht über die Medien, Puffer und Lösungen für die Zellkultur

Medium/Lösung	Zusammensetzung	
0,05 % Trypsin/EDTA	10 mL 90 mL	Trypsin/EDTA Stammlösung (10-fach konzentriert) PBS ⁻ Lagerung bei 4 °C
Einfriermedium	40 % (v/v) 10 % (v/v)	FCS DMSO (als Gefrierschutzmittel) In RPMI
Gefitinib Stammlösung (0,1 M)	10 mg 2,238 mL	Gefitinib DMSO Steril filtriert und aliquotiert Lagerung bei -20 °C
Gefitinib 1 mM	1 µL 99 µL	Stammlösung zellspezifisches Medium Vorbereitung direkt vor Anwendung
HCC827 Zellkulturmedium	20 % (v/v)	FCS (nicht hitzeinaktiviert) In RPMI-1640 Lagerung bei 4 °C
MTT Reagenz	3 mg/mL	MTT in Reinstwasser (pH 7,2) Steril filtriert und aliquotiert Lagerung bei -20 °C
MTT Lösung	25 % (v/v)	MTT Reagenz in zellspezifisches Medium Vorbereitung direkt vor Anwendung
PBS ⁻ Lösung	5 g 500 mL	PBS Reinstwasser (pH 7,2) Autoklaviert, Lagerung bei 4 °C

PBS ⁻ /EDTA Lösung	5 L 1 g	PBS ⁻ Lösung EDTA-Na ₂ *2H ₂ O (pH 7,2) Autoklaviert, Lagerung bei 4 °C
PBS ⁺ Lösung	5 L 0,5 g	PBS ⁻ Lösung MgCl ₂ *6 H ₂ O, 0,5 g CaCl ₂ (pH 7,2) Steril filtriert, Lagerung bei 4 °C
Waschpuffer	2 mM	EDTA in PBS ⁻ Lagerung bei 4 °C

Tabelle 6: Übersicht über die Lösungen und Puffer für Histologie und Immunhistochemie

Lösung/Puffer	Zusammensetzung	
Antikörper-Verdünnungslösung	5 % (w/v)	BSA in PBS ⁻ Lösung, Lagerung bei 4 °C
Blockierungslösung	5 % (v/v)	Eselserum in AK-Verdünnungslösung
Citratpuffer (Arbeitslösung)	10 % (v/v)	Citratpuffer Stammlösung in VE-Wasser, Lagerung bei RT
Citratpuffer (Stammlösung 10 –fach)	42 g/L 17,6 g/L	Citratmonohydrat Natriumhydroxid-Granulat In VE-Wasser (pH 6,0) Lagerung bei RT
Eosin 1 %	1 g 100 mL	Eosin VE-Wasser
Ethanol 90 %	900 mL 100 mL	96 % Ethanol VE-Wasser
Ethanol 70 %	700 mL 300 mL	96 % Ethanol VE-Wasser
Ethanol 50 %	500 mL 500 mL	96 % Ethanol VE-Wasser
Lyse-Puffer RLT	1 mL 10 µL	RLT Puffer β-Mercaptoethanol
Mowiol/DAPI	0,1 %	DAPI in Mowiol, Lagerung bei -20 °C
PFA 4 %	40 g 1 L	Paraformaldehyd PBS ⁻ (pH 7,4) Lagerung bei RT
<i>Stripping</i> puffer (mild)	1,5 % (v/v) 0,1 % (w/v) 1 % (v/v)	Glycin SDS Tween 20 in VE-Wasser (pH 2,2)
Waschpuffer PBS-T (0,05 M)	10 % (v/v) 0,5 % (v/v)	PBS Stammlösung 0,5 M Tween 20 In VE-Wasser, Lagerung bei RT

Tabelle 7: Übersicht über Lösungen und Puffer für die Proteinchemie

Lösung/Chemikalie	Zusammensetzung	
Blockier-Lösung (Western Blot)	5 % (w/v)	Milchpulver in <i>tris-buffered saline with Tween</i> (TBS-T) Lagerung bei 4 °C
Lämmli Puffer	1,5 M 10 % (v/v) 5 % (v/v) 2 % (w/v) 0,01 % (w/v)	Tris-Base (pH 6,8) Glycerin β-Mercaptoethanol SDS Bromphenolblau Na-Salz Lagerung bei -20 °C
Elektrophoresepuffer	192 mM 25 mM 0,15 %	Glycin Tris-Base SDS in Reinstwasser, Lagerung bei RT
Trenngelpuffer (4-fach Konzentrat)	1,5 M 0,4 %	Tris Base (pH 8,8) SDS Lagerung bei RT
Lyse-Puffer: modifizierter RIPA Puffer	20 mM 137 mM 10 % (v/v) 1 % 2 mM 0,5 % (v/v) 0,1 % (w/v) 50 mM 1 mM 4 % (v/v)	Tris Base (pH 8,0) NaCl Glycerin NP-40 EDTA Natrium-Desoxycholylsäure SDS NaF in Reinstwasser, Lagerung bei 4 °C Zugabe direkt vor der Anwendung: Natrium-Orthovanadat 25-fach Proteinase Inhibitor Cocktail
Sammelgel (5 %)	1,25 mL 0,5 mL 12 µL 12 µL 3,2 mL	<i>Upper</i> Tris Acrylamid APS 40 % TEMED Reinstwasser Vorbereitung direkt vor der Anwendung
<i>Stripping</i> -Puffer (mild)	1,5 % (v/v) 0,1 % (w/v) 1 % (v/v)	Glycin SDS Tween 20 pH 2,2
PBS-T-Wasch-Puffer 0,05 M	100 mL 5 mL 900 mL	PBS Stock 0,5 M Tween-20 (0,5 %) VE-Wasser Lagerung bei RT
Transfer-Puffer	25 mM 192 mM 20 % (v/v)	Tris Glycin Methanol

	0,03 % (w/v)	SDS in VE-Wasser, Lagerung bei RT
Trenngel (10 %)	2,5 mL 3,3 mL 2 mL 14 µL 14 µL 2,2 mL	Lower Tris Acrylamid Glycerin APS 40 % TEMED Reinstwasser Vorbereitung direkt vor der Anwendung
Sammelgelpuffer (4-fach konzentriert)	0,5 M 0,4 % (w/v)	Tris SDS (pH 6,8) Lagerung bei RT

2.1.6. Kits

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Kits

Kit	Hersteller
CellTiter-Glo [®] <i>Luminescent</i> Zellvitalitätsassay	Promega (Mannheim, D) Kat. Nr G7570
CellTiter-Glo [®] 3D Vitalitätsassay	Promega (Mannheim, D)
DC Protein Assay	BioRad (München, D) Kat. Nr. 500-0112
M30 CytoDeath [™] ELISA	Peviva (Bromma, SE) Prod. Nr. 10900
Pierce ECL <i>Western Blotting</i>	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, D) Art.Nr. 32106
Proteome Profiler [™] Humaner Phospho- Kinase Array	R&D Systems (Abingdon, UK) Kat. Nr. ARY003B
Proteome Profiler [™] Humaner Phospho- RTK Array	R&D Systems (Abingdon, UK) Kat. Nr. ARY001B
RealTime-Glo [™] MT Zellvitalitätsassay	Promega (Mannheim, D)
Venor [®] GeM Mycoplasmen Detektions Kit (PCR)	Minerva Biolabs GmbH (Berlin, D) Kat. Nr. 11-1025/-1050/-1100/1250

2.1.7. Antikörper für Immunhistochemie und *Western Blot*

Tabelle 9: Übersicht über die in der Immunhistochemie verwendeten Antikörper

Antikörper	Wirt	Klon	Verdünnung	Hersteller Kat. Nr.
Alexa Fluor 555 Anti- Kaninchen	Esel		1:400	Invitrogen A-31572
Alexa Fluor 647 Anti-Maus	Esel		1:400	Invitrogen A-31571
Beta-Catenin	Kaninchen	E246	1:100	Abcam Ab32572
E-Cadherin	Maus	36/ E-Cadherin	1:100	BD Biosciences 610181
Ki67	Kaninchen	SP6	1:100	Abcam Ab16667
Mucin-1	Maus	GP1.4	1:1000	Imgenex
Pan-Cytokeratin	Maus	C-11+PCK- 26 +CY-90+ KS-A3+M20 +A53-B/A2	1:100	Sigma-Aldrich C2562-2ML
Vimentin	Kaninchen		1:100	Abcam Ab92547

Tabelle 10: Übersicht über die für *Western Blot* verwendeten Antikörper

Antikörper	Wirt	Klon	Molekular- gewicht	Verdünnung/ Lösung	Hersteller Kat. Nr.
AKT	Kaninchen	C67E7	60 kDa	1:2000 5 % BSA in TBS 0,1 % Tween	Cell Signaling #4691
pAKT	Kaninchen	Ser473	60kDa	1:1000 5 % BSA in TBS 0,1 % Tween	Cell Signaling
α -Tubulin Lade- kontrolle	Maus		52 kDa	1:2000 5 % BSA in TBS 0,1 % Tween	Cell Signaling #2125
β -Aktin Lade- kontrolle	Maus		45 kDa	1:1000 5 % Milchpulver in TBS 0,1 % Tween	Cell Signaling #3700
EGFR	Kaninchen	D38B1	175 kDa	1:1000 5 % BSA in TBS 0,1 % Tween	Cell Signaling #4267

pEGFR	Kaninchen	Tyr106 Y68	135 kDa	1:10000 5 % BSA in TBS 0,1 % Tween	Abcam #32430
ERK 1/2	Kaninchen	p44/ p42 137F5	42 kDa/ 44 kDa	1:1000 5 % BSA in TBS 0,1 % Tween	Cell Signaling #4695
pERK 1/2	Kaninchen	Thr202 Tyr204 D13.14 .4E	42 kDa/ 44 kDa	1:2000 5 % BSA in TBS 0,1 % Tween	Cell Signaling #4370
HGFR	Kaninchen	D1C2	140 kDa/ 170 kDa	1:1000 5 % Milchpulver in TBS 0,1 % Tween	Cell Signaling #8298
pHGFR	Kaninchen	Tyr123 4/1235 D26	145 kDa	1:1000 5 % BSA in TBS 0,1 % Tween	Cell Signaling #3077
Sekundäre Anti-Maus AK konjugiert an HRP	Ziege		160 kDa	1:10000 5 % BSA in TBS 0,1 % Tween	Jackson Immuno Research #1110350 45
Sekundäre Anti- Kaninchen AK konjugiert an HRP	Ziege		160 kDa	1:10000 5 % BSA in TBS 0,1 % Tween	Jackson Immuno Research #1150351 46

2.1.8. Zelllinien

Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Lieferant/ Hersteller
HCC827	Humane NSCLC-Zelllinie	DMSZ Kat.Nr. ACC566
HCCres A2	Gefitinib-resistente HCC827-Subpopulation	Claudia Göttlich TERM (Universität Würzburg, D)
HCCres A5	neu generierte, gegen Gefitinib resistente HCC827-Subpopulation	Subpopulation der HCC827

Die in dieser Arbeit verwendete humane Krebszelllinie HCC827 entstammt dem pulmonalen Adenokarzinom einer 39-jährigen Patientin mit NSCLC. Dabei handelt es sich um große adhärenente Epithelzellen, die als Monolayer wachsen und eine aktivierende Mutation in der Tyrosin-Kinase-Region des *EGFR*-Gens aufweisen (Exon 19, del E746-750).

Bei den HCCres A2 und HCCres A5 handelt es sich um aus der HCC827-Zelllinie hervorgegangene, gegen Gefitinib resistente Subpopulationen. Die Generierung erfolgte durch kontinuierliche Zugabe von 1 μ M Gefitinib.

2.1.9. Software

Tabelle 12: Übersicht über die verwendete Software

Software	Hersteller
AlphaView 3.2.2. für FluorChem Q	Alpha Innotec (Kasenburg, D)
BZ <i>Observer and Analyzer</i> für das Keyence-Mikroskop	Keyence Corporation (Neu-Isenburg, D)
ImageJ	Wayne Rasband (NIH, USA)
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Origin Pro 8.6	OriginLab (Northampton, USA)

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen fand unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) in einem Brutschrank in T75 oder T150 Flaschen statt. Alle Zellen wurden bis zur Passage 20 verwendet. Als Nährmedium diente das Zellkulturmedium *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640), versetzt mit 20 % fetalem Kälberserum (FCS). Ein Nährmedienwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Eine Überprüfung der Zellen hinsichtlich ihrer Morphologie, der Konfluenz oder bakterieller Kontaminationen wurde in regelmäßigen Abständen durchgeführt. Die Arbeit mit den Zellkulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen an Sicherheitswerkbänken der Klasse II mit laminarem Luftstrom. Alle mehrfach verwendbaren Labormaterialien mussten vor dem Gebrauch autoklaviert oder heißluftsterilisiert und alle unsterilen Lösungen sterilfiltriert werden. Alle Medien und Lösungen wurden vor der Verwendung auf 37 °C erwärmt.

2.2.1.1. Passagieren von Zellen

Die adhärent wachsenden Zellen wurden in T75 bzw. T150 Flaschen bis zu einer Konfluenz von 70-90 % kultiviert und dann passagiert. Um die Zellen von der Flasche zu lösen, wurde zunächst das Nährmedium aspiriert und überbleibende Medienreste mit Phosphat-gepufferter Saline ohne Magnesium und Calcium und Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat (PBS⁻/EDTA; T75: 10 mL, T150: 15 mL) abgespült. Dabei wurden Calcium-Ionen entfernt und Zell-Zell-Kontakte getrennt. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch dreiminütige Inkubation mit 0,05 % Trypsin/EDTA (T75: 5 mL, T150: 9 mL) bei 37 °C. Nach einer lichtmikroskopischen Kontrolle des Ablösevorgangs (Abkugeln der Zellen) wurde die Enzymreaktion durch FCS (T75: 1 mL, T150: 2 mL) gestoppt. Die Zellsuspension wurde in 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und bei 270 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands und dem Resuspendieren des Zellpellets in Nährmedium erfolgten die Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität (siehe 2.2.1.2) und schließlich die Aussaat in der gewünschten Zelldichte in eine neue Zellkulturflasche.

2.2.1.2. Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität

Zellzahl und Zellvitalität wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dafür wurden 10 µL der Zellsuspension mit 0,4 % Trypanblau in einem Mischverhältnis von 1:2 angefärbt und in die Zählkammer überführt. Trypanblau färbt tote Zellen dunkelblau, während sich lebende Zellen nicht anfärben lassen und unter dem Lichtmikroskop durchsichtig erscheinen. Bei einer zehnfachen Vergrößerung lässt sich so die Anzahl der lebenden und der toten Zellen in allen vier Großquadranten der Zählkammer erfassen und nach folgenden Formeln die Lebendzellzahl/mL (Formel 1) und die Zellvitalität in Prozent (Formel 2) bestimmen.

Formel 1:

$$\text{Zellzahl}/_{\text{mL}} = \frac{\text{Zahl der lebenden Zellen}}{4} \times \text{Volumen(Zählkammer)} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Formel 2:

$$\text{Zellvitalität [\%]} = \frac{\text{Zahl der lebenden Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100$$

2.2.1.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um die Zellen in niedrigen Passagen zu konservieren, wurden $1-2 \times 10^6$ Zellen nach den wie in 2.2.1.1 beschriebenen Passagierschritten in 1 mL Einfriermedium in Kryoröhrchen (Nunc, Deutschland) eingefroren. Das Einfriermedium besteht aus Kulturmedium, versetzt mit 40 % Volumen/Volumen (v/v) FCS und 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO). Zellen wurden nur bis Passage 10 zur Konservierung verwendet. Nach dem Hinzufügen von DMSO wurden die Zellen unverzüglich in einem Mr. Frosty™ Einfrierbehälter (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) eingefroren, um die Toxizität des Gefrierschutzmittels bei Raumtemperatur (RT) zu vermeiden. Mr Frosty™ erlaubt durch den langsamen, stetigen Temperaturabfall von 1 °C/min das sichere Einfrieren der Zellen ohne Eiskristallbildung. Für die Kurzzeitkonservierung wurden die Röhrchen bei -80 °C aufbewahrt und für die Langzeitkonservierung in Flüssigstickstofftanks überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen mit den Zellen dem Stickstofftank entnommen und bei 37 °C in einem Wasserbad leicht geschwenkt, bis nur noch ein kleiner Eiskristall zu erkennen war. Die Röhrchen mussten anschließend von außen gründlich desinfiziert werden, bevor die Zellsuspension in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen mit 9 mL zellspezifischem Kulturmedium überführt werden konnte. Nach fünfminütigem Zentrifugieren bei 270 x g erfolgte das Absaugen des DMSO-haltigen zelltoxischen Überstandes. Die Zellen wurden in frischem Nährmedium resuspendiert und in einer Zellkulturflasche ausgesät. Ein Medienwechsel erfolgte am nächsten Tag.

2.2.1.4. Etablierung einer Gefitinib-resistenten Subpopulation

Für die Generierung neuer, gegen Gefitinib resistenter Zellen (HCCres A5) wurden die HCC827-Zellen bis zu einer 70 %igen Konfluenz ohne Zugabe von Gefitinib kultiviert. Es folgte anschließend die dauerhafte Zugabe von 1 µM Gefitinib in das Nährmedium und eine regelmäßige lichtmikroskopische Kontrolle von Zellzahl und Konfluenz. Bei einer Konfluenz von 70-90 % wurden die Zellen passagiert. Nach 40-tägiger Kultivierung unter Dauerbehandlung mit 1 µmol/L (µM) Gefitinib wurde die Gefitinib-Resistenz der neu generierten HCCres A5-Zellen getestet.

2.2.1.5. Mykoplasmandetektion

Um eine Kontamination mit Mykoplasmen auszuschließen, wurde alle vier bis sechs Wochen 1 mL des Nährmediums aus 90-100 % konfluenten Zellkulturflaschen entnommen und bei 270 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µL des Überstandes bei 95 °C inkubiert, wodurch die Mykoplasmen lysiert und die Desoxyribonukleasen (DNasen) inaktiviert werden konnten. Nach einer kurzen Inkubation auf Eis erfolgte die Aufbewahrung des Lysats bei -20 °C, bis es mit Hilfe des Venor[®]GeM Mykoplasmen Detektions Kit (Minerva Biolabs, Deutschland) nach Angaben des Herstellers analysiert werden konnte.

2.2.2. 2D Zellkultur

Es wurde die Abhängigkeit der Zellvitalität von der Gefitinib-Konzentration in einer 2D Kultur der Zelllinien dargestellt. Dafür wurden 3000 Zellen der Zelllinie HCC827 pro *Well* in einer weißen 96-*Well* Platte ausgesät und mit je 200 μL Medium für fünf Tage kultiviert. Ein Medienwechsel mit Zugabe von Gefitinib in den Konzentrationen 0,01 μM ; 0,05 μM ; 0,1 μM ; 0,5 μM ; 1 μM und 5 μM erfolgte am zweiten und vierten Tag. Am fünften Tag wurde der CellTiterGlo[®] *luminescent* Zellvitalitätsassay (Promega) durchgeführt (siehe 2.2.4.1).

2.2.3. Aufbau des humanen 3D Lungentumormodells

2.2.3.1. Herstellung der Matrix SISmuc

Als Trägermatrix für das 3D Lungentumormodell wurde die luminale Seite (Mukosa) eines azellularisierten Dünndarmsegments aus dem deutschen Landrasseschwein verwendet [35, 114-117]. Dafür wurden die Schweine (8-11 Wochen alt, 16-18 kg) am Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin (ZEMM) narkotisiert, heparinisiert und anschließend eingeschläfert. Die Tiere wurden nach den Tierschutzrichtlinien des *National Institute of Health* gehalten (NIH, Veröffentlichung 85-23, revidiert 1996) [118]. Die Organentnahmen wurden nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes (§4 Absatz 3) durchgeführt und es erfolgten regelmäßige Kontrollen durch den Tierschutzbeauftragten des Instituts und der zuständigen Behörden.

Nach der Entnahme des Dünndarms wurde dieser an den Lehrstuhl für *Tissue Engineering* und Regenerative Medizin (TERM) transportiert, wo die Dezellularisierung der Darmschlingen nach standardisiertem Protokoll (siehe Tabelle 13) stattfand [119, 120]. Die azelluläre, sterile Dünndarm Submukosa mit Mukosa (*Small Intestinal Submucosa with mucosa*, SISmuc) wurde bei 4 °C in PBS gelagert. Zur Qualitätskontrolle wurden Proben für Gallsäuretest und Histologie entnommen.

Tabelle 13: Herstellung der SISmuc aus porcinem Dünndarm

Tag	Schritt	Lösung (je SISmuc)	Dauer/Bedingung
1	Explantation von Dünndarm und Mesenterialgefäßen		
	Herstellung der Dezellularisierungs-lösung (DOC)	10-15 L DOC	125,5 g Natriumdesoxycholat je 5 L Millipore-Wasser
	Säubern des Lumens	PBS ⁻	Wiederholtes Füllen des Lumens und Ausstreichen, bis keine Fäkalreste mehr ausgespült werden
	Säubern des Gefäßsystems	500 mL PBS ⁻ 1 %Pen/Strep	Anschluss arterieller Zugang an Schlauchsystem mit Pumpe und konstantes Spülen mit 80 mmHg, 40 rpm
	Inkubation mit PBS ⁻	PBS ⁻ 1 %Pen/Strep	Befüllen des Lumens und beidseitiger Verschluss, Inkubation über Nacht bei 4 °C auf dem Wippschüttler
2	Spülen von SISmuc/Gefäßsystem (Entfernen der Antibiotika)	PBS ⁻	Lumen: Wiederholtes Füllen und Ausstreichen Gefäßsystem: Spülen über arteriellen Zugang bei 80 mmHg, 40 rpm
	Dezellularisierung	DOC	Lumen: Füllen und beidseitiger Verschluss, Gefäßsystem: Spülen bei 80 mmHg, 40 rpm (je 3-mal DOC-Wechsel)
	Entfernung von Zellresten	PBS ⁻	Lumen: Füllen und beidseitiger Verschluss Gefäßsystem: Spülen bei 80 mmHg, 40 rpm (je 3-mal PBS ⁻ -Wechsel)
	Inkubation mit DOC	DOC	Befüllen des Lumens und beidseitiger Verschluss, in 5 L Becher über Nacht bei 4 °C auf dem Wippschüttler
3	Spülung von Darm und Gefäßsystem	PBS ⁻	Lumen: Füllen und beidseitiger Verschluss, Gefäßsystem: Spülen bei 80 mmHg, 40 rpm (je 5-mal PBS ⁻ -Wechsel)
	Entfernen des Gefäßsystems und der Serosa, Zuschneiden	-	Aufbewahrung der 10 cm langen Stücke in zwei 500 mL Becher

	Entfernen von Serosaüberständen	2,1 L PBS ⁻ 1 %Pen/Strep	Je 350 mL pro 500 mL Bechern, 3-mal 30 min, Wippschüttler
	Inkubation mit DNase	100 mg DNase in 300 mL PBS ⁺ 1 %Pen/Strep	Je 150 mL pro 500 mL Becher, 2 h bei 37 °C auf dem Wippschüttler
	Probenentnahme Gallsäuretest	-	1 mL pro Becher, Einfrieren bei - 20 °C
	Spülen	PBS ⁻	3-mal 30 min
	Probenentnahme Histologie	-	
	Inkubation mit PBS-	Steriles PBS ⁻	Über Nacht bei 4 °C auf dem Wippschüttler
4	Spülen/Umfüllen	Steriles PBS ⁻	In frische 200 mL Becher
	Gammasterilisation	-	25 kGray (BBF Sterilisationsservice GmbH, Rommelshausen)
	Lagerung	PBS ⁻	sterile Bedingungen bei 4 C

2.2.3.2. Statisches 3D Lungentumormodell

Für das statische 3D Lungentumormodell erfolgte das Aufspannen der sterilen SISmuc in autoklavierte Zellkronen. Dabei handelt es sich um zwei ineinander passende Ringe aus Polyetheretherketon (PEEK) oder Metall, hergestellt für das Einspannen der Trägerstruktur und die Kultivierung von 3D Modellen in 12-Well Platten [117]. Es wurde ein 6-8 cm langes Stück SISmuc (Abbildung 3A) in einer Petrischale ausgebreitet und auf einer Seite ein 2 mm breiter Streifen mit dem Skalpell abgetrennt (Abbildung 3B), sodass der Darm aufgeklappt werden konnte. Die SISmuc wurde mit der luminalen Seite (Mukosa) nach oben ausgebreitet (Abbildung 3C), in kleine Stücke geschnitten (Abbildung 3D) und mit Hilfe zweier Pinzetten über den inneren Ring der Zellkrone gestülpt (Abbildung 3E, F). Die luminalen Seite der als 3D Trägerstruktur dienenden SISmuc wies dabei nach unten und zeigte in das Innere der Zellkrone. Nach dem Fixieren der Matrix mit dem äußeren Ring der Zellkrone (Abbildung 3G, H) wurde diese umgedreht und in eine 12-Well Platte überführt (Abbildung 3 I). Die Füßchen an der Zellkrone verhinderten ein Aufliegen der SISmuc auf dem Boden des Wells und ermöglichten eine Umspülung der gesamten Matrix mit 2,5 mL Medium.

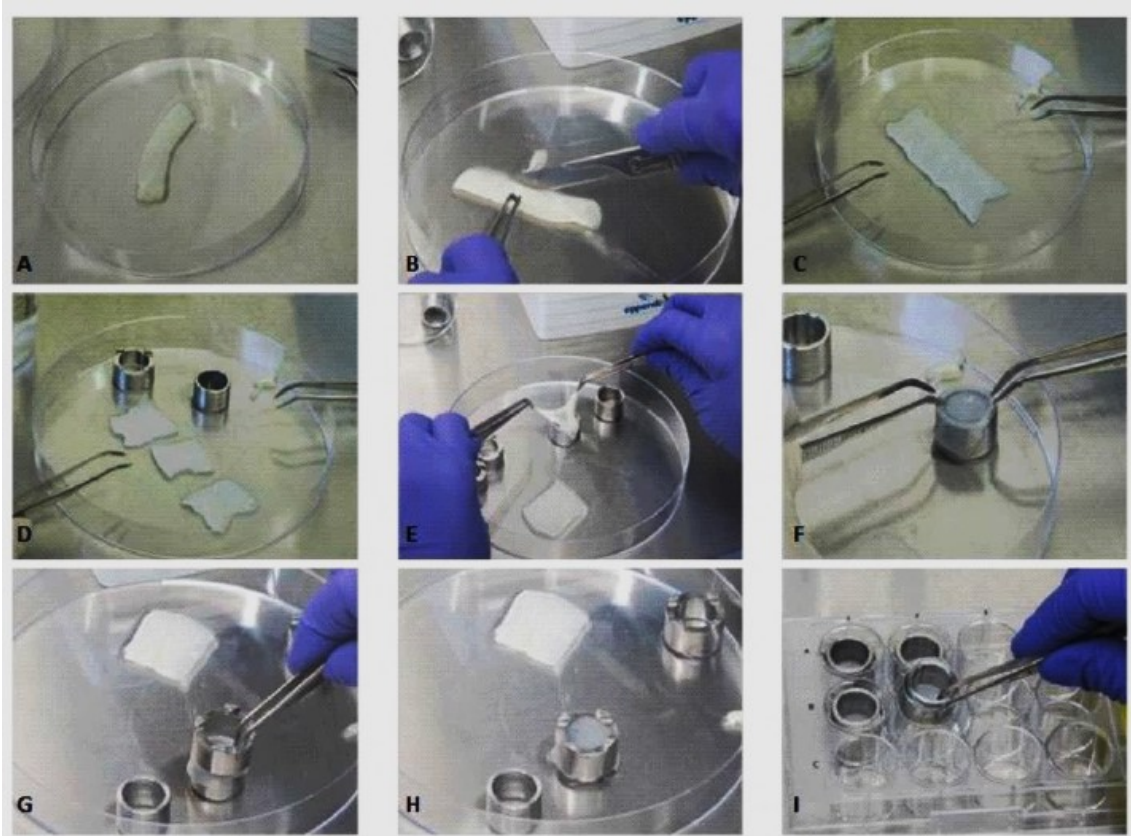


Abbildung 3: Einspannen der SISmuc in die Zellkrone. **A)** Ausbreiten der SISmuc. **B)** Entfernen eines dünnen Streifens auf einer Seite. **C)** Öffnen der SISmuc, sodass das Lumen nach oben zeigt. **D)** Zugeschnittene SISmuc Stücke. **E-F)** Überziehen des inneren Zellkronen-Rings mit der SISmuc. **G-H)** Fixierung der SISmuc durch Überstreifen des äußeren Rings der Zellkrone. **I)** Überführen der Zellkrone in eine 12-Well Platte. Bildquelle: Mit freundlicher Genehmigung von Corinna Rosenbaum [121].

Vor der Aussaat der Zellen wurden die bespannten Zellkronen für zwei Stunden oder über Nacht (37 °C, 5 % CO₂) in zellspezifischem Medium inkubiert. Es erfolgte eine Aussaat von 100.000 Zellen pro Well. Dabei wurden die in 500 µL Medium resuspendierten Zellen in das Innere der Zellkrone gegeben und für zwei Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Medium diffundierte durch die SISmuc in das leere äußere Zellkronenkompartiment und gewährleistete ein Anheften der Zellen an die Mukosa. Anschließend wurden die Wells zusätzlich mit insgesamt 2 mL Nährmedium aufgefüllt, sodass sich im Inneren der Zellkrone 1 mL und außerhalb 1,5 mL befanden. Die Kultivierung der statischen 3D Lungentumormodelle erfolgte für 14 Tage mit regelmäßigen Nährmedienwechseln alle zwei bis drei Tage. Die Behandlung der Modelle erfolgte wie in Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben.

2.2.3.3. Behandlung des statischen 3D Lungentumormodells mit Gefitinib

Die Behandlung des statischen 3D Lungentumormodells mit Gefitinib erfolgte über die letzten drei Tage der 14-tägigen Kultivierung.

In den ersten Versuchsreihen erfolgte eine Gefitinib-Gabe in den Konzentrationen 0,01 μM ; 0,05 μM ; 0,1 μM ; 0,5 μM ; 1 μM und 5 μM . Das Nährmedium und Gefitinib wurden zwei Tage nach Behandlungsbeginn gewechselt. Proben aus dem Überstand für die Analyse der Apoptoserate wurden direkt vor der Gefitinib-Zugabe, nach sechs Stunden und dann alle 24 Stunden entnommen und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert (Abbildung 4A). Am 14. Tag der Kultivierung der Zellen wurde entweder ihre Vitalität mit Hilfe des an die 3D Bedingungen angepassten CellTiter-Glo[®] 3D Zellvitalitätsassay von Promega bestimmt (siehe 2.2.4.2) oder die Matrix mit den Zellen für histologische und immunhistochemische Analysen sowie die Proliferationsbestimmung fixiert (siehe 2.2.6).

In einem weiteren Versuch wurde die Vitalität der Zellen auf der Matrix über drei Tage hinweg (Tag 12-14 einer 14-tägigen Kultivierungsdauer) mit Hilfe des RealTime-Glo MT Zellvitalitätsassay bestimmt. Dabei erfolgte nach zwölf-tägiger Kultivierung der statischen 3D Lungentumormodelle ein Medienwechsel mit einer einmaligen Gabe von Gefitinib. Das Gefitinib wurde in den Konzentrationen 0,05 μM und 1 μM eingesetzt. Anschließend wurde die Vitalität der Zellen in den ersten zwölf Stunden stündlich, in den folgenden zwölf Stunden zweistündlich und nach 30, 36, 48 sowie 72 Stunden bestimmt (Abbildung 4B).

Außerdem wurden Ansätze des statischen 3D Lungentumormodells nach 9- und 72-stündiger Behandlung mit Gefitinib in den Konzentrationen 0,05 μM und 1 μM für Untersuchungen der Signalwegaktivierungen mit dem humanen Phospho-RTK-Array (pRTK-Array), dem humanen Phospho-Kinase Array (pK-Array) (siehe 2.2.7.4) und mit *Western Blot* (siehe 2.2.7.5) lysiert (Abbildung 4C).

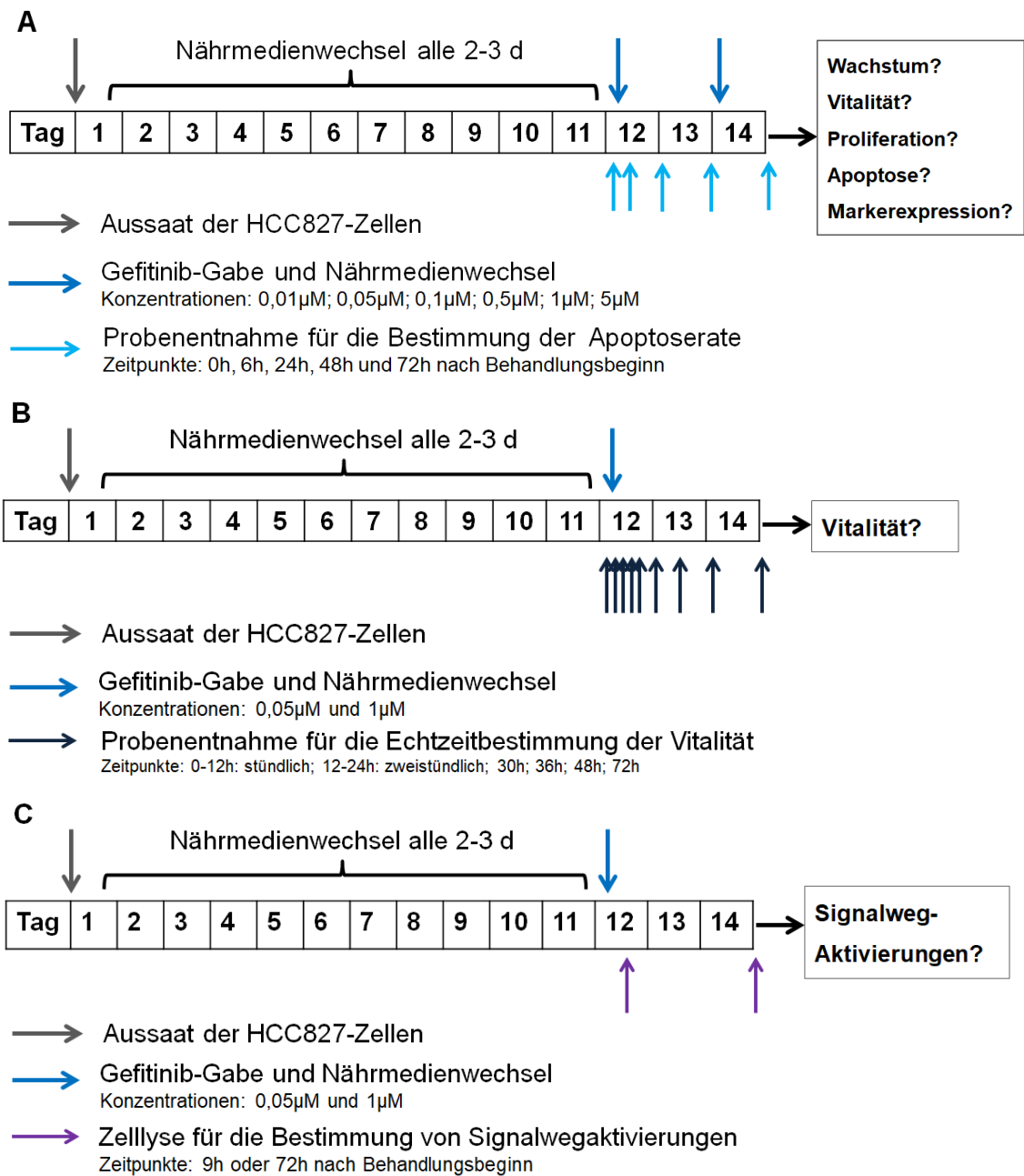


Abbildung 4: Behandlungsschemata und Untersuchungen des statischen 3D Lungentumormodells. Wenn nicht durch einen bunten Pfeil anders dargestellt, erfolgte die jeweilige Untersuchung nach 14-tägiger Kultivierung. Ab Tag 12 wurde Gefitinib dem Nährmedium beigefügt. **A)** Behandlungsschema für die Untersuchung der konzentrationsabhängigen Vitalität, der Proliferation, der Apoptose, des Wachstums und der Markerexpression. Es erfolgte ein Wechsel von Gefitinib und Nährmedium nach 48 h. **B)** Behandlungsschema für die Echtzeitbestimmung der Vitalität. Es erfolgte kein Wechsel von Gefitinib oder Nährmedium nach 48 h. **C)** Behandlungsschema für die Untersuchung der Signalwegaktivierungen. Eine Lyse der 3D Tumormodelle erfolgte nach 9-stündiger bzw. 72-stündiger Behandlung mit 0,05 μ M und 1 μ M Gefitinib. Es erfolgte kein Wechsel von Gefitinib oder Nährmedium nach 48 h.

2.2.3.4. Dynamisches 3D Lungentumormodell

Eine Kultivierung unter dynamischen Bedingungen in einem Bioreaktor führt in Epithelzellen zu einem vermehrten Wachstum der Tumorzellen und einer größeren Tumormasse [116, 122], weshalb nach dreitägiger statischer Kultivierung der Zellen (siehe 2.2.3.2) die besiedelten Matrices unter sterilen Bedingungen aus den Zellkronen ausgespannt und zwischen die Hälften eines autoklavierten Bioreaktors eingespannt wurden. Durch die primäre statische Aussaat wurde eine Adhärenz der hier verwendeten HCC827-Zellen an der Trägermatrix gewährleistet und das Loslösen der Zellen durch den kontinuierlichen Medienfluss im Bioreaktor vermieden. Nach Einspannen der besiedelten Trägerstruktur im Bioreaktor wurde dieser über ein Silikonschlauch-System in einem in sich geschlossenen sterilen Kreislauf mit dem Nährmedium-Reservoir verbunden (Abbildung 5). Im Reservoir befanden sich 45 mL Nährmedium, versetzt mit 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep). Über eine peristaltische Pumpe wurde im Silikonschlauch-System ein kontinuierlicher Medienfluss von 3 rpm (3,1 mL/min) erzeugt, sodass das 3D Lungentumormodell kontinuierlich von beiden Seiten mit Medium umspült wurde. Die dynamische Kultivierung der 3D Tumormodelle erfolgte über 14 Tage bei Standardbedingungen im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂), mit einem Medienwechsel an Tag Sieben.

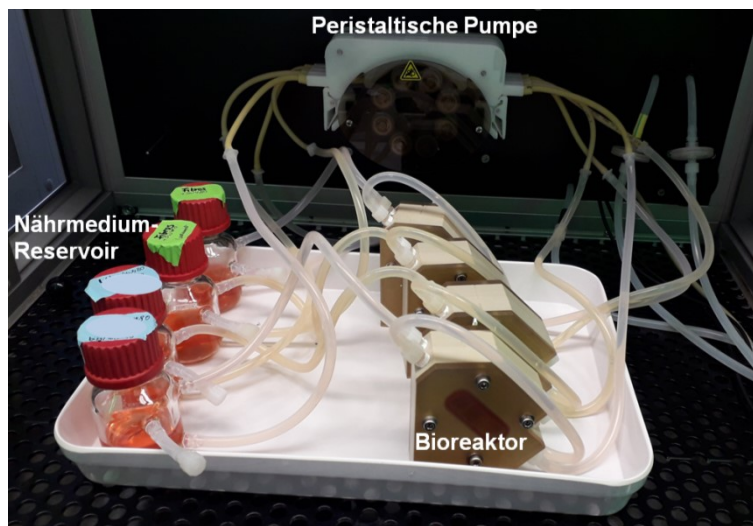


Abbildung 5: Aufbau des Flussbioreaktors für das dynamische 3D Tumormodell. Bioreaktor, der über ein Silikonschlauchsystem mit dem Nährmedium-Reservoir und einer peristaltischen Pumpe verbunden ist.

2.2.3.5. Behandlung des dynamischen 3D Tumormodells mit Gefitinib

In den letzten drei Tagen (Tag 12-14) der Kultivierung erfolgte eine Behandlung mit 1 μ M Gefitinib. Medienproben für die Analyse der Apoptoserate wurden kurz vor der Gefitinib-Zugabe und dann alle 24 Stunden bis zum Ende der Kultivierung über ein in das Schlauchsystem des Bioreaktors integriertes Probenentnahmesystem (steriles Septum) entnommen und bei -80 °C gelagert. Nach der Kultivierung wurden die besiedelten Matrices aus den Bioreaktoren ausgespannt und für histologische Färbungen (siehe 2.2.6), den humanen pRTK-Array und den humanen pK-Array (siehe 2.2.7.4) verwendet.

2.2.4. Vitalitätsbestimmungen

2.2.4.1. CellTiterGlo[®] *luminescent* Zellvitalitätsassay

Mit Hilfe des CellTiterGlo[®] *luminescent* Zellvitalitätsassay von Promega lässt sich die Vitalität von Zellen in der 2D Zellkultur quantifizieren. Durch die Ultra-Glo[™] rekombinante Luciferase wird Luciferin mit ATP und Sauerstoff in Anwesenheit von Magnesium-Ionen zu Oxyluciferin umgewandelt. Dabei entsteht ein messbares Lichtsignal. Da ATP von metabolisch aktiven Zellen gebildet wird und im CellTiterGlo[®] im Verhältnis 1:1 mit Luciferin zu Oxyluciferin umgewandelt wird, ist die gemessene Lichtintensität direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen in einer 2D Zellkultur (Abbildung 6). Für die Freisetzung des ATP ist die Lyse der Zellen erforderlich, sodass eine weitere Verwendung der Zellen nach Durchführung des Zellvitalitätsassay nicht möglich war.

Am fünften Tag der Kultivierung (siehe 2.2.2) wurden die Zellen mit je 200 μ L PBS⁺ gewaschen und 100 μ L frisches Nährmedium zugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 μ L des auf Raumtemperatur erwärmten CellTiterGlo[®] Reagenz (lyophilisiertes CellTiterGlo[®] Substrat gelöst in CellTiterGlo[®] Puffer). Dabei wurde eine Lichtexposition möglichst vermieden. Die verwendete 96-Well Platte wurde in das Tecan Infinite M200 Plattenlesegerät überführt, für zwei Minuten mit einer Amplitude von 3,5 mm geschüttelt und für zehn Minuten inkubiert. Danach erfolgte die Messung des Lumineszenz-Signals mit einer Integrationszeit von 1000 ms.

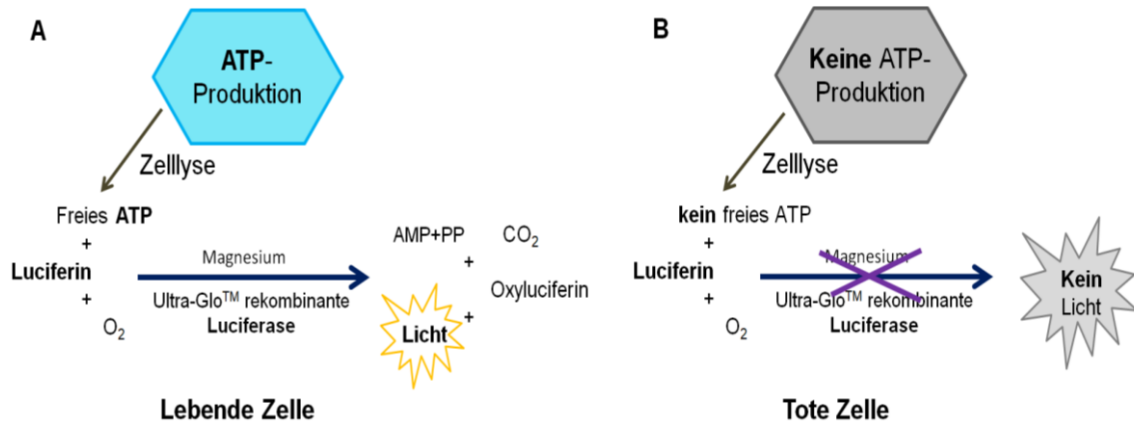


Abbildung 6: Funktionsprinzip des CellTiterGlo[®] luminescent Zellvitalitätsassay. **A)** Die Lyse lebender Zellen führt zur Freisetzung von ATP, welches für die Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin und einem Lichtsignal mittels der Ultra-Glo[™] rekombinanten Luciferase benötigt wird. **B)** In toten Zellen kommt es zu keiner ATP-Produktion und somit auch zu keinem Lichtsignal nach Lyse der Zellen und Reagenzien Zugabe. Bildquelle: modifiziert nach [123] (Mit freundlicher Genehmigung der Promega Corp.).

Die Kultivierung der Zellen für den CellTiterGlo[®] luminescent Zellvitalitätsassay erfolgte in einer weißen 96-Well Platte, um eine Überlagerung der Lumineszenzen der einzelnen Wells zu vermeiden. Als Leerwert wurde das Lumineszenz-Signal von Nährmedium und CellTiterGlo[®] Reagenz in nicht besiedelten Wells gemessen. Alle Messungen erfolgten in Triplikaten.

Aus den gemessenen Lumineszenz-Signalen der Triplikate wurde der Mittelwert errechnet und der Leerwert abgezogen. Anschließend wurden die Werte auf die unbehandelte Probe (0 µM Gefitinib) bezogen und so die Vitalität in Prozent errechnet.

2.2.4.2. CellTiter-Glo[®] 3D Zellvitalitätsassay

Die Vitalitätsbestimmung von Zellen im Tumormodell ist ein wichtiges Instrument zur Beurteilung des Ansprechens der Zellen auf ein Medikament. Der CellTiter-Glo[®] 3D Zellvitalitätsassay von Promega dient normalerweise zur Bestimmung der Zellvitalität von 3D Sphäroidkulturen in 96- oder 384-Well Platten analog zum CellTiterGlo[®] luminescent Zellvitalitätsassay (siehe 2.2.4.1). Der CellTiter-Glo[®] 3D Zellvitalitätsassay musste daher erst für die 3D Lungentumormodelle in 12-Well Platten etabliert werden. Es erfolgte die

Anpassung des Herstellerprotokolls durch Variation der Messplatten, der Inkubationszeiten, der Lysebedingungen und des Verhältnisses von CellTiter-Glo® 3D Reagenz und Medium (Tabelle 14). Es wurden die Lumineszenz-Signale der unterschiedlichen Ansätze miteinander verglichen. Die Kontrolle der vollständigen Lyse erfolgte durch eine anschließende HE-Färbung (siehe 2.2.6.4) der Matrices. Während aller Schritte wurde die Lichtexposition der Proben möglichst gering gehalten.

Tabelle 14: Protokoll des CellTiter-Glo® 3D Zellvitalitätsassay laut Herstellerangaben und mit variierten Parametern

Schritt/Parameter	Herstellerangaben	Anpassung an das 3D Tumormodell
Auftauen des CellTiter-Glo® 3D Reagenz	Über Nacht bei 4 °C	
Platte	Undurchsichtige 96- oder 384-Well Platte	Durchsichtige 12-Well Platte
Hinzufügen des CellTiter-Glo® 3D Reagenz	Medium und Reagenz im Verhältnis 1:2	Medium und Reagenz im Verhältnis 1:2, 1:3 oder 1:4 200 µL, 300 µL oder 400 µL Reagenz
Inkubation	30 min bei RT	
Verbesserung der Zellyse	Schütteln 5 min	Ausspannen, Abschaben, Einfrieren und/oder Vortexen der Matrices
Inkubation zur Stabilisierung des Lumineszenz-Signals	25 min bei RT	Verlängerung auf 45 oder 60 min auf dem Wippschüttler bei RT
Überführen	-	Je 150 µL in schwarze oder weiße 96-Well Platte
Messung des Lumineszenz-Signals	Tecan Infinite M200 Plattenlesegerät Integrationszeit von 0,3 s	

2.2.4.3. RealTime-Glo™ MT Zellvitalitätsassay

Mit Hilfe des RealTime-Glo™ MT Zellvitalitätsassay von Promega lässt sich durch Biolumineszenz die Zellvitalität in Echtzeit bestimmen. Dafür macht man sich das Reduktionspotential lebender Zellen zu Nutze. Eine Lyse der Zellen ist nicht notwendig. Das in das Medium gegebene MT Zellvitalität Prosubstrat wird von lebenden Zellen aufgenommen, reduziert und wieder in das Medium abgegeben. Dort fungiert es dann als NanoLuc® Substrat, welches von der hinzugefügten NanoLuc® Luciferase unter Entstehung von Licht umgewandelt wird (Abbildung 7).

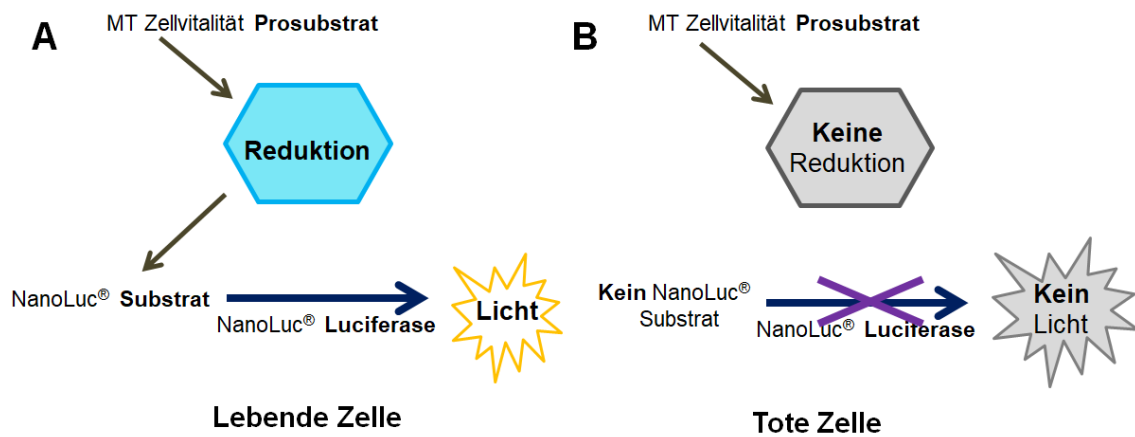


Abbildung 7: Wirkprinzip des RealTime-Glo™ MT Zellvitalitätsassay. A) Das MT Zellvitalität-Substrat wird in lebenden Zellen zum NanoLuc® Substrat reduziert, welches dann von der NanoLuc® Luciferase unter Entstehung von Licht umgewandelt wird. **B)** In toten Zellen kommt es zu keiner Reduktion und somit auch nicht zu einem Lichtsignal. Bildquelle: modifiziert nach [124] (Mit freundlicher Genehmigung der Promega Corp.).

Gemäß Herstellerangaben wurden für den RealTime-Glo™ MT Zellvitalitätsassay in 96-, 384- und 1536-Well Platten MT Zellvitalität Prosubstrat und NanoLuc® Luciferase jeweils in einer Konzentration von 1 µM zur Probe gegeben. Aufgrund der Kultur der 3D Lungentumormodelle in 12-Well Platten und nicht in 96-Well Platten, war die Anpassung des RealTime-Glo™ MT Zellvitalitätsassays an dieses Zellformat erforderlich. Für die Echtzeitversuche wurden Zellkronen aus PEEK verwendet, sodass eine eventuelle Messstörung durch Reflektion des Lumineszenz-Signals an der metallenen Zellkronen-Oberfläche vermieden werden konnte.

Um die Menge an notwendigem MT Zellvitalität Prosubstrat und der NanoLuc® Luciferase möglichst gering zu halten, erfolgte die Zugabe der Reagenzien in einer Konzentration von 1 µM nur in das innere Kompartiment der Zellkrone und vergleichend in sowohl das innere als auch das äußere Kompartiment der Zellkrone.

Zum Ausschluss einer möglichen Verfälschung der Ergebnisse durch unterschiedlich dichte Zell-Besiedelung der 3D Lungentumormodelle wurden die HE-Färbungen beider Ansätze verglichen. Es erfolgte außerdem der Vergleich von 3D Lungentumormodellen vor und nach der Durchführung des RealTime-Glo™ MT Zellvitalitätsassay, um toxische Effekte des RealTime-

Glo™-Reagenz auf das Wachstum der Zellen im 3D Tumormodell auszuschließen. Zusätzlich wurde die Stabilität der gemessenen Lumineszenz-Signale über 72 Stunden beobachtet.

In Tabelle 15 ist das Protokoll des RealTime-Glo™ MT Zellvitalitätsassay laut Herstellerangaben sowie mit den an das 12-Well Platten-System angepassten Parametern dargestellt. Während aller Schritte wurde die Lichtexposition der Proben möglichst gering gehalten.

Tabelle 15: Protokoll des RealTime-Glo™ MT Zellvitalitätsassay laut Herstellerangaben und mit variierten Parametern

Schritt/Parameter	Herstellerangaben	Anpassung an 3D Tumormodelle
Erwärmen von MT Zellvitalität Substrat und NanoLuc® Luciferase	37 °C im Wasserbad	
Platte	Undurchsichtige 96-, 384- oder 1536-Well Platte	Durchsichtige 12-Well Platte
Hinzufügen von MT Zellvitalität Substrat und NanoLuc® Luciferase	2 µL MT Zellvitalität Substrat und 2 µL NanoLuc® Luciferase auf 1 mL Medium	<u>Ansatz 1:</u> Reagenzien in den 2,5 mL die ZK umspülend <u>Ansatz 2:</u> Reagenzien nur in 1 mL im Inneren der ZK
Inkubation	1h bei 37 °C , 5 % CO ₂	
Stündliche Messung des Lumineszenz-Signals	Tecan Infinite M200 Plattenlesegerät Integrationszeit von 0,3 s	

2.2.5. Bestimmung der Apoptoserate

Die Apoptoserate in den statisch und dynamisch kultivierten 3D Lungentumormodellen wurde mit Hilfe des M30 CytoDeath™ *Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit* (Previva, Schweden) bestimmt. Der murine monoklonale Antikörper M30 bindet an das spezifische Neo-Epitop K18Asp396, das in der frühen Apoptosephase bei der Spaltung von Cytokeratin 18 entsteht und für Epithelzellen spezifisch ist. Beim folgenden Zellabbau wird das durch Caspasen gespaltene Cytokeratin 18 (cck18) in das Nährmedium freigesetzt und ermöglicht eine Bestimmung der Apoptoserate aus den entnommenen Proben. Die im *Kit* enthaltene 96-Well Platte ist mit einem Antikörper gegen Cytokeratin 18 beschichtet, der das in den Proben enthaltenen Cytokeratin 18 bindet.

Je 25 μL der verdünnten Proben sowie der im Kit enthaltenen Standard-Lösungen wurden jeweils in Duplikaten aufgetragen. Anschließend folgte eine vierstündige Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler mit je 75 μL an Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiertem Sekundärantikörper, der gegen das M30-Epitop gerichtet ist. Danach wurden die *Wells* fünfmal mit je 200 μL Waschpuffer gespült, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Es folgte eine 20 minütige Inkubation im Dunkeln mit 3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidin (TMB), welches durch die an den M30-Antikörper konjugierte HRP zu einem blauen Farbstoff oxidiert wird. Dieser Schritt wird durch das Hinzufügen von 50 μL Stopp-Lösung beendet. Die in der Stopp-Lösung enthaltene Schwefelsäure führt über einen pH-Abfall zu einer Farbänderung des oxidierten TMBs von blau zu gelb und die Absorption kann nach 30 sekundigem Schütteln und fünfminütiger Inkubation bei 450 nm in einem Tecan M200 Plattenlesegerät gemessen werden.

Die Auswertung der Daten erfolgt mit Hilfe einer sigmoidalen Kurve, die mit OriginPro 8.6 aus den Standards erstellt wurde. Die Konzentration an M30/L ließ sich aus der Kurve und dem Verdünnungsfaktor der Probe errechnen. Der Verdünnungsfaktor war von der spezifischen Verdünnung jeder Probe abhängig. Es wurde der Mittelwert der so errechneten M30-Konzentrationen aus beiden Duplikaten gebildet.

Anschließend wurden die M30-Konzentrationen der Behandlung (nach 6, 24, 48 und 72 Stunden) auf die M30-Konzentration zum Zeitpunkt T0 (kurz vor der Behandlung) normalisiert und dieser Wert anschließend auf die unbehandelte Kontrolle bezogen.

2.2.6. Histologie und Immunhistologie

2.2.6.1. Fixieren der 3D Lungentumormodelle für Färbungen

Die statischen 3D Lungentumormodelle wurden nach einem Waschschrift mit PBS⁺ für zwei Stunden mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Matrices aus den Zellkronen ausgespannt und das zellfreie Rand-Gewebe abgetrennt.

Die dynamisch kultivierten Matrices wurden zuerst aus den Bioreaktoren ausgespannt und das zellfreie SISmuc-Gewebe mit Hilfe eines Skalpells entfernt, bevor ein Waschschrift mit PBS⁺ und eine anschließende Fixierung für zwei Stunden in 4 % PFA erfolgte.

Im Anschluss wurden die Matrices beider Kultivierungsmethoden zwischen Filterpapierstreifen platziert, in Einbettkassetten gelegt und bis zum Paraffinieren in vollentsalztem (VE)-Wasser aufbewahrt.

2.2.6.2. Paraffineinbettung und Anfertigung von Paraffinschnitten

Die Einbettkassetten wurden aus dem VE-Wasser in den Wasserbehälter der automatisierten Paraffineinbettungsmaschine (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) überführt. Das Einbetten in Paraffin erfolgte über 13 Stunden nach unten stehendem Protokoll (Tabelle 16).

Tabelle 16: Protokoll der automatisierten Paraffineinbettungsmaschine

Schritt	Lösung	Dauer [h]
Auswaschen der Fixierlösung	VE-Wasser	1
Entwässerung	Ethanol 50 %	1
	Ethanol 70 %	1
	Ethanol 80 %	1
	Ethanol 96 %	1
	Isopropanol I	1
	Isopropanol II	1
Entfernung des Alkohols	Isopropanol/Xylol 1:2	1
	Xylol I	1
	Xylol II	1
Paraffinieren	Paraffin I	1,5
	Paraffin II	1,5

Nach dem Einbetten wurden die Präparate mit einem Skalpell in drei Streifen geteilt und in zunächst flüssigem Paraffin in Metallformen aufgeblockt. Die Schnittkante der Präparate zeigte dabei nach unten, sodass die Färbungen der Modelle aus den besiedelten Bereichen der Matrix stammten. Es wurden Schnitte mit einem Mikrotom (Leica, Deutschland) in 3 µm Dicke angefertigt und auf Objektträgern bei 37 °C über Nacht getrocknet. Für die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung wurden unbeschichtete Objektträger verwendet, für die Immunfärbungen Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger.

2.2.6.3. Entparaffinieren und Rehydrieren der Schnitte

Für die Vorbereitung der Schnitte wurden die Objektträger in einen Wärmeschrank (60 °C) gestellt, bis das Paraffin vollständig geschmolzen war. Danach wurden die Schnitte direkt in Xylol überführt und die in Tabelle 18 dargestellten Schritte zum Entparaffinieren und Rehydrieren der Schnitte durchgeführt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass die Schnitte nicht mehr trocken fielen.

Tabelle 17: Protokoll zum Entparaffinieren und Rehydrieren

Schritt	Lösung	Dauer [min]
Entparaffinieren	Xylol I	10
	Xylol II	10
Rehydrieren	Ethanol 96 %	3-mal eintauchen
	Ethanol 96 %	3-mal eintauchen
	Ethanol 70 %	3-mal eintauchen
	Ethanol 50 %	3-mal eintauchen
	VE-Wasser	Schwenken bis keine Turbulenzen mehr

2.2.6.4. Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die Schnitte wurden nach dem Entparaffinieren und Rehydrieren (siehe 2.2.6.3) nach dem Protokoll in Tabelle 18 mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und anschließend wieder dehydriert.

Tabelle 18: Protokoll der HE-Färbung

Schritt	Lösung	Dauer [min]
Anfärben der Zellkerne	Hämatoxylin sauer nach Mayer (Morphisto)	6
Spülen	VE-Wasser (schwach fließend)	bis keine Farbe mehr auswäscht
Bläuen	Leitungswasser (fließend)	5
Anfärben Zellplasma und EZM	Eosin	6
Spülen	VE-Wasser (schwach fließend)	bis keine Farbe mehr auswäscht
Entwässern und Entfernen des Alkohols	Ethanol 70 %	2-mal eintauchen
	Ethanol 96 %	2
	Isopropanol I	5
	Isopropanol II	5
	Xylol I	5
	Xylol II	5

Die Objektträger wurden anschließend mit der Pinzette aus dem Xylof entnommen und mit Entellan und einem Deckgläschen luftblasenfrei eingedeckt. Über Nacht wurden sie unter dem Abzug zum Trocknen aufbewahrt.

Hämatoxylin färbt anionische Strukturen blau und Eosin färbt kationische Strukturen rot, sodass sich in der HE-Färbung die Zellkerne blau anfärben während sich das Zellplasma und die Extrazellulärmatrix (EZM) rot darstellen.

2.2.6.5. Immunfluoreszenz-Färbung

Nach dem Entparaffinieren und Rehydrieren der Schnitte (siehe 2.2.6.3) erfolgte die hitzeinduzierte Epitop-Demaskierung mit Citratpuffer (pH 6) für 20 Minuten bei 100 °C im Dampfgerät. Im Anschluss wurden die Objektträger in VE-Wasser überführt, mit Fettstift (Dako pen) umrandet und in Waschpuffer (PBS⁺ 0,5 % Tween 20) gestellt. Die immunhistologische Färbung mit Antikörpern erfolgte nach dem Protokoll in Tabelle 19.

Tabelle 19: Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung

Schritt	Lösung	Dauer/Bedingung
Blocken	5 % Normalserum (aus derselben Spezies wie der Sekundärantikörper) in AK-Verdünnungslösung	20 min bei RT
Primärantikörper	Verdünnung in AK-Verdünnungslösung entsprechend Tabelle 9	Über Nacht bei 4 °C
Waschen	Waschpuffer	3-mal je 5 min
Sekundärantikörper	Sekundärantikörper mit Fluorochrom in AK-Verdünnungslösung (donkey anti-mouse-Cy5/donkey anti-rabbit-Cy2)	60 min bei RT, lichtgeschützt
Waschen	Waschpuffer	3-mal je 5 min

Das Eindecken der Objektträger erfolgte mit Moviol, das mit 0,1 % 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) zur Gegenfärbung der Zellkerne versetzt war. Für jede Färbung wurde eine Negativ-Kontrollfärbung durchgeführt, um unspezifische Bindungen der Sekundärantikörper auszuschließen. Dafür wurde der primäre Antikörper weggelassen und nur reine Antikörperverdünnungslösung eingesetzt.

Um die lichtsensiblen Fluorochrome nicht zu schädigen, wurden die Inkubation der Sekundärantikörper und alle darauf folgenden Schritte im Dunkeln durchgeführt. Bei der Doppelfärbung sind zwei Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies (Maus und Kaninchen) verwendet worden. Die entsprechenden Sekundärantikörper waren an Fluorochrome mit unterschiedlichen Emissionsspektren gekoppelt, sodass eine Unterscheidung im Fluoreszenzmikroskop möglich war.

2.2.6.6. Bestimmung des Proliferationsindex

Der Proliferationsindex der Zellen im 3D Lungentumormodell wurde mit Hilfe der Ki67-Immunfluoreszenz-Färbung (siehe 2.2.6.5) bestimmt. Ki67 ist ein Protein des Zellkerns, welches sich bei Auflösen des Zellkerns in der Mitose an die Chromosomen anlagert und dann immunhistologisch nachweisbar ist. Es wurden jeweils zehn Bilder pro Bedingung von sich nicht überlappenden Bereichen der Probe in 20-facher Vergrößerung mit einem digitalen Mikroskop (BZ-9000, Keyence) aufgenommen. Es erfolgte das Auszählen von Ki67/DAPI-positiven und ausschließlich DAPI-positiven Zellen und die Berechnung des Proliferationsindexes nach Formel 3.

Formel 3:

$$\text{Proliferationsindex [\%]} = \frac{\text{Anzahl Ki67-positiver Zellen}}{\text{Anzahl DAPI-positiver Zellen}} \times \frac{1}{10} \times 100$$

2.2.7. Proteinanalyse

2.2.7.1. Zellyse

Die HCC827-Zellen im 3D Lungentumormodell wurden zunächst zweimal in der Zellkrone mit kaltem PBS⁺ gespült und je 500 µL Lysepuffer pro *Well* einer 12-*Well* Plate vorgelegt. Danach wurde die besiedelte Matrix aus der Zellkrone ausgespannt, zellfreie Reste mit dem Skalpell entfernt und die besiedelte SISmuc in den Lysepuffer überführt. Anschließend erfolgte die Inkubation für 30 Minuten bei 4 °C auf einem Wippschüttler. Danach wurden die Zellreste mit einem Zellschaber von der Matrix entfernt, das Lysat in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C für zehn Minuten mit 14000 x g zentrifugiert.

Der von Zelldebris freie Überstand, der die aus den Zellen isolierten Proteine enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und bei -80 °C gelagert. Alle Schritte der Zellyse erfolgten (soweit möglich) auf Eis, um die Aktivität von Phosphatasen und Proteinase zu minimieren.

2.2.7.2. Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Für die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration aus den Zelllysaten wurde der DC Protein Assay Kit (BioRad, Deutschland) verwendet. In Tabelle 20 sind die für die Quantifizierung verwendeten bovine Serum Albumin (BSA)-Konzentrationen dargestellt.

Tabelle 20: BSA Verdünnungsreihe

Standard	BSA-Konzentration [µg/mL]
1	1000
2	800
3	600
4	400
5	200
6	100
7	50
8	0 (Reinstwasser)

Je 5 µL der Standardverdünnungen und der verdünnten Proben wurden nach dem Auftauen auf Eis in Duplikaten in eine 96-Well Platte pipettiert. Es folgte die Zugabe von 25 µL/Well frisch angesetzter alkalischer Kupferlösung bestehend aus Reagenz S und Reagenz A des DC Protein Assays im Verhältnis 1:50. Nach der Zugabe von 200 µL Folinlösung (Reagenz B) wurde die Platte für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Das Kupfer bindet an das in den Proben enthaltene Protein und färbt sich nach einer Reduktion durch das Folin blau. Die optische Dichte wurde bei 750 nm mit 9 nm Bandbreite und 25 Blitzen am Tecan Infinite M200 Plattenlesegerät gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe einer Kurve, die mit Excel aus der Standardverdünnungsreihe erstellt wurde. Die Proteinkonzentration ließ sich aus der Kurve und dem Verdünnungsfaktor errechnen. Es wurde der Mittelwert der Konzentrationen beider Duplikate gebildet. Anschließend wurde die Proteinkonzentration einer unbesiedelten SISmuc (Leermatrix) abgezogen.

2.2.7.3. Proteinfällung mit Chloroform und Methanol

Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung wurden für die Chloroform/Methanol-Fällung jeweils die gleichen Mengen an Protein wie in der Probe mit der geringsten Proteinkonzentration abgenommen und mit Wasser auf dasselbe Volumen gebracht (200 µL). Das Lysat wurde mit 800 µL Methanol vermischt und es wurden 200 µL Chloroform hinzu pipettiert. Nach einer Zugabe von 600 µL Wasser erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 14000 rpm, sodass sich die gefällten Proteine an der Phasengrenze zum organischen Chloroform absetzten. Nachdem der wässrige Überstand verworfen worden war, erfolgte die Zugabe von 1600 µL Methanol und eine erneute Zentrifugation. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Proteinpellet bei 37 °C im Inkubator getrocknet. Die Resuspension erfolgte in 15 µL Wasser und 5 µL fünffach Lämmli-Puffer je 30 µg Protein. Die Proteine wurden für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert, zentrifugiert und bis zur Untersuchung im *Western Blot* bei -20 °C gelagert.

2.2.7.4. Humane phospho-Arrays

2.2.7.4.1. pRTK-Array

Der humane pRTK-Array von R&D Systems erlaubt es, Unterschiede in der Phosphorylierung von RTKs bei unterschiedlichen Behandlungsbedingungen festzustellen. Dafür sind Kontrollantikörper und Antikörper gegen 49 verschiedene RTKs in Duplikaten auf der Nitrozellulosemembran des Kits *gespottet*. Während der Inkubation der Zelllysate mit den Membranen binden die einzelnen RTKs an die spezifischen Antikörper auf dieser Membran und können über die Bindung des sekundären HRP konjugierten anti-pan-Phospho-Tyrosin-AK mittels Chemilumineszenz detektiert werden.

Der Array wurde nach der Zellyse (siehe 2.2.7.1) und Proteinbestimmung (siehe 2.2.7.2) in einer im Kit enthaltenen Vierkammerplatte durchgeführt. Die einzelnen Versuchsschritte sind in Tabelle 21 beschrieben.

Tabelle 21: Protokoll des humanen pRTK-Arrays

Tag	Schritt	Lösung/Membran	Dauer/Bedingung
1	Äquilibrieren der Membranen	2 mL Array Buffer 1	1 h bei RT auf dem Wippschüttler
	Verdünnung der Zelllysate	Array Buffer 1	Proteinmenge von 100-300 µg auf 1,5 mL
	Inkubation: Proteinbindung an die Membranen	1,5 mL Zelllysat	Über Nacht 4 °C auf dem Wippschüttler
2	Waschen	3 mL Waschpuffer	3-mal 10 min, RT auf dem Wippschüttler
	Abtropfen auf fusselfreiem Tuch		
	Bindung der AK an die Proteine	2 mL Detection Antibody	2 h, RT auf dem Wippschüttler
	Waschen	3 mL Waschpuffer	3-mal 10 min, RT auf dem Wippschüttler
	Abtropfen auf fusselfreiem Tuch		
	Detektion der sekundären AK	1 mL Chemilumineszenz-Reagenz	1 min luftblasenfrei in Frischhaltefolie

Die Proben wurden über den Vorbereitungszeitraum hinweg auf Eis aufbewahrt, während die Lösungen alle auf Raumtemperatur gebracht wurden. Das Anfassen der Membranen erfolgte nur mit stumpfen Pinzetten und Handschuhen, um eine Beschädigung zu vermeiden. Chemi Reagenz 1 und 2 wurden drei Minuten vor Verwendung zum Chemilumineszenz-Reagenz vermischt und im Dunkeln aufbewahrt. Die Verdünnung der Lösungen erfolgte nach Tabelle 22.

Tabelle 22: Verdünnungsschema des humanen Phospho-RTK-Arrays (R&D Systems)

Lösung	Verdünnung	Gesamtvolumen [mL]	Pro Kammer [mL]
Waschpuffer	1:25 in Reinstwasser	50	3
Array Puffer 2	1:5 in Reinstwasser	8	2
Detektions-AK	1:5000 mit 1-fach Array Puffer 2	8	2

2.2.7.4.2. pK-Array

Der humane phospho-Kinase-Array (pK-Array) basiert auf dem gleichen Prinzip wie der zuvor beschriebene humane pRTK-Array (siehe 2.2.7.4.1) und erlaubt den Vergleich von Phosphorylierungen verschiedener Kinasen miteinander. Für die Detektion der gebundenen Kinasen wird ein biotinylierter Antikörper verwendet, der dann in einem weiteren Schritt an Streptavidin-HRP bindet und mit Hilfe des Chemilumineszenz-Reagenzes detektiert wird.

Der Array wird nach der Zelllyse (siehe 2.2.7.1) und Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 2.2.7.2) in einer Achtkammerplatte durchgeführt. Jeder Array besteht aus Membran A und B. Die einzelnen Versuchsschritte sind in Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 23: Protokoll des humanen pK-Array

Tag	Schritt	Lösung/Membran	Dauer/Bedingung
1	Äquilibrieren der Membranen	1 mL Array Puffer 1	1 h bei RT auf dem Wippschüttler
	Verdünnung des Zelllysats	Array Puffer 1	Proteinmenge von 200-600 µg auf 2 mL
	Inkubation: Proteinbindung an die Membranen	1 mL Zelllysats	Über Nacht bei 4 °C auf dem Wippschüttler
2	Waschen	3 mL Waschpuffer	3-mal 10 min, RT auf dem Wippschüttler
	Abtropfen auf fussselfreiem Tuch		
	Bindung der AK an die Proteine	1 mL biotinylierter Detektions-AK A oder B	2 h, RT auf dem Wippschüttler
	Waschen	3 mL Waschpuffer	3-mal 10 min, RT auf Wippschüttler
	Abtropfen auf fussselfreiem Tuch		
		1 L Streptavidin-HRP	30 min, RT auf Wippschüttler
	Waschen	3 mL Waschpuffer	3-mal 10 min, RT auf Wippschüttler
	Abtropfen auf fussselfreiem Tuch		
	Detektion der sekundären AK	1 mL Chemilumineszenz-Reagenz	1 min luftblasenfrie in Frischhaltefolie

Das maximale Volumen an einsetzbarem Zelllysat beträgt 334 µL. Die Proben wurden über den Vorbereitungszeitraum auf Eis aufbewahrt, während die Lösungen alle auf Raumtemperatur gebracht wurden. Das Anfassen der Membranen erfolgte nur mit stumpfen Pinzetten und Handschuhen, um eine Beschädigung zu vermeiden. Chemi Reagent 1 und 2 wurden drei Minuten vor Verwendung zum Chemilumineszenz-Reagenz vermischt und im Dunkeln aufbewahrt. Die Verdünnung der Lösungen ist in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24: Verdünnungsschema des humanen pK-Arrays

Lösung	Verdünnung	Gesamt- volumen [mL]	Pro Kammer [mL]
Waschpuffer	1:25 in Reinstwasser	50	3
Array Puffer 2/3 I + II	1:5 in Reinstwasser	10	1
Detektions-AK A	Zunächst in 100 µL Reinstwasser lösen, dann 1:50 mit 1-fach Array Puffer 2/3 I (frisch ansetzen)	4	1
Detektions-AK B	Zunächst in 100 µL Reinstwasser lösen, dann 1:50 mit 1-fach Array Puffer 2/3 I (frisch ansetzen)	4	1
Streptavidin-HRP	Entsprechend Label auf Vial, in Array Puffer 2/3 II (frisch ansetzen)	8	1

2.2.7.4.3. Semiquantitative Auswertung der Array Signale

Die Messung der Chemilumineszenz erfolgte am FluorChem Q-Bildaufnahmegerät (Biozym Scientific, Deutschland) mit Belichtungszeiten von 30 Sekunden, eine, drei, fünf und zehn Minuten. Für die Auswertung wurde die Intensität der Grauwerte der einzelnen Punkte mit dem Programm Alpha View bestimmt und die Mittelwerte aus den Duplikaten gebildet. Es wurde das durchschnittliche Hintergrundsignal der negativen Kontrollpunkte abgezogen. Die daraus resultierenden Signalwerte wurden auf die jeweiligen Kontrollpunkte bezogen und erlaubten so einen Vergleich der relativen Phosphorylierungsraten zwischen den verschiedenen Proben. Eine Darstellung der Membranen mit den Kontrollpunkten ist im Anhang zu finden (Abbildung 25 und Abbildung 26).

Eine Beurteilung der Phosphorylierung im pRTK-Array fand anhand der in Tabelle 25 festgelegten Grenzwerte statt.

Tabelle 25: Beurteilung der Phosphorylierung im pRTK-Array

Symbol	Prozent des Kontrollpunktes	Phosphorylierungsgrad
o	0-5 %	Nicht detektierbar
+	5-100 %	Niedrig
++	100-500 %	Mittel
+++	> 500 %	Hoch

Eine Beurteilung der Phosphorylierung im pK-Array fand anhand der in der Tabelle 26 festgelegten Grenzwerte statt.

Tabelle 26: Einteilung der prozentualen Phosphorylierungsgrade im pK-Array

Symbol	Prozent des Kontrollpunktes	Phosphorylierungsgrad
o	0-5 %	Nicht detektierbar
+	5-10 %	Niedrig
++	10-50 %	Mittel
+++	>50 %	hoch

2.2.7.5. Western Blot

Western Blotting wird verwendet um Proteine semiquantitativ nachzuweisen. Dafür wurden die gefällten Proteinproben (siehe 2.2.7.3) durch Elektrophorese in einem 10 % Natriumdodezylsulfat (SDS)-Gel bei 25 mA/Gel, 400 V und 50 W aufgetrennt und bei 1 mA/cm² bei 11 V für zwei Stunden auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Der Aufbau des Blots ist in Abbildung 8 dargestellt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine ERK 1/2 (42/44 kDa), AKT (60 kDa), HGFR (145 kDa) und EGFR (175 kDa) sowie die phosphorylierten Proteine pERK 1/2, pAKT, pHGFR und pEGFR nachgewiesen.



Abbildung 8: Aufbau des *Western Blots*. Je drei Lagen Filterpapier liegen zwischen Anode (+) und Kathode (-) und dem SDS-Gel, das luftblasenfrei auf einer Nitrozellulosemembran liegt.

Der Proteinnachweis erfolgte durch Antikörperfärbung und Entwicklung der Membranen mit dem WesternBright™ Quantum Chemilumineszenz Substrat. Die Bilder wurden mit dem Aufnahmegerät FluorChem Q (Biozym Scientific, Deutschland) aufgenommen (Blende 0,95; Fokus 0,6). Eine Anpassung der Belichtungszeit erfolgte automatisch auf die jeweils stärkste Bandenintensität. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper mit Hilfe eines milden *Stripping*-Puffers abgelöst und es erfolgte der Proteinnachweis von α -Tubulin und β -Aktin als Ladekontrollen (siehe Tabelle 27).

Die Aufnahmen wurden mittels des Alpha View Programms (Alpha Innotec, Deutschland) semiquantitativ ausgewertet. Dafür wurde die Intensität der Grauwerte der einzelnen Banden gemessen und die durchschnittliche Hintergrundintensität abgezogen. Die erhaltenen Werte wurden schließlich auf den jeweiligen Grauwert der α -Tubulin-/ β -Aktin-Bande bezogen. Um die relative Aktivierungsrate der untersuchten Proteine zu bestimmen, wurden die Intensitäten der Proteine auf die Intensitäten der dazugehörigen Gesamtproteine bezogen.

Tabelle 27: Protokoll des Proteinnachweises beim *Western Blot*

Tag	Schritt	Lösungen/Chemikalien	Dauer/Bedingung
1	Blocken	Blockierlösung (5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T)	1 h bei RT auf dem Wippschüttler
	Inkubation mit dem Primärantikörper	10 mL Primärantikörper	In 50 mL Zentrifugenröhrchen Über Nacht bei 4 °C Auf dem Rollschüttler
2	Waschen	TBS-T	3-mal 10 Min Auf dem Wippschüttler
	Inkubation mit Sekundärantikörper	10 mL Sekundärantikörper (an HRP-gekoppelt)	1 h bei RT Auf dem Rollschüttler
	Waschen	PBST	3-mal 10 min Auf dem Wippschüttler
	Inkubation mit der Entwicklungslösung	WesternBright™ Quantum Chemilumineszenz-Substrat	3 mL luftblasenfrei auf einer Frischhaltefolie für 1 min
	Aufnahmen mit FluorChem Q (Biozym Scientific, D)		
	<i>Strippen</i> der Membranen	Milder <i>Stripping</i> -Puffer PBS TBS-T	2-mal 10 min 2-mal 10 min 2-mal 5 min
	Blocken	Blockierlösung	1 h bei RT auf dem Wippschüttler
2-3	Wiederholung des Proteinnachweises mit der Ladekontrolle (β -Aktin)		

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung der Vitalitätsassays im statischen 3D Lungentumormodell

Ein wichtiges Instrument zur Beurteilung der Medikamentenwirksamkeit ist die Zellvitalitätsbestimmung. Die Zellvitalitätsassays von Promega dienen zur Bestimmung der Zellvitalität von 3D Sphäroidkulturen in 96-, 384- und 1536-*Well* Platten, sodass eine Anpassung an das Zellkronenformat der 3D Lungentumormodelle in 12-*Well* Platten erforderlich war.

3.1.1. Anpassung des CellTiter-Glo[®] 3D Zellvitalitätsassay

In den 96- und 384-*Well* Platten werden die Zellen 30 Minuten mit Medium und Reagenz im Verhältnis 1:2 bei Raumtemperatur inkubiert und für fünf Minuten geschüttelt, um die Zellyse zu verbessern. Darauf folgt eine weitere Inkubation über 25 Minuten zur Stabilisierung des Lumineszenz-Signals [125].

Zur Anpassung des CellTiter-Glo[®] 3D Zellvitalitätsassay an das 3D Tumormodell wurden zunächst verschiedene Reagenz-Medien-Verhältnisse sowie Gesamtvolumina ausgetestet und die Inkubationsbedingungen variiert (siehe Abschnitt 2.2.4.2). Dabei konnte bei einem höheren Anteil CellTiter-Glo[®] 3D Reagenz am Gesamtvolumen keine Erhöhung des Lumineszenz-Signals detektiert werden. Die Verlängerung der Inkubationszeit von 45 auf 60 Minuten führte ebenfalls zu keinem Anstieg des Lumineszenz-Signals. Im Gegensatz dazu stieg das Signal bei einem geringeren Gesamtvolumen um 3×10^6 relative Lichteinheiten (RLU) an (Abbildung 9A). Aufgrund dessen wurden für weitere Versuche ein Verhältnis von Medium zu Reagenz von 1:2, ein Gesamtvolumen von 200 μ L und eine Inkubationszeit von 45 Minuten gewählt.

In einem nächsten Schritt wurde der Einfluss der Messplatte untersucht. Dazu wurde die Lumineszenz zum einen direkt in der 12-*Well* Platte mit den Zellkronen gemessen. Zum anderen wurden 150 μ L Überstand aus dem Inneren der Zellkronen entnommen und für die Messung jeweils in eine weiße und schwarze Platte überführt. Hier konnten nach Überführen in eine weiße Platte die höchsten Lumineszenz-Intensitäten detektiert werden, sodass im

Folgenden alle Messungen in einer weißen 96-Well Platte durchgeführt wurden. (Abbildung 9B).

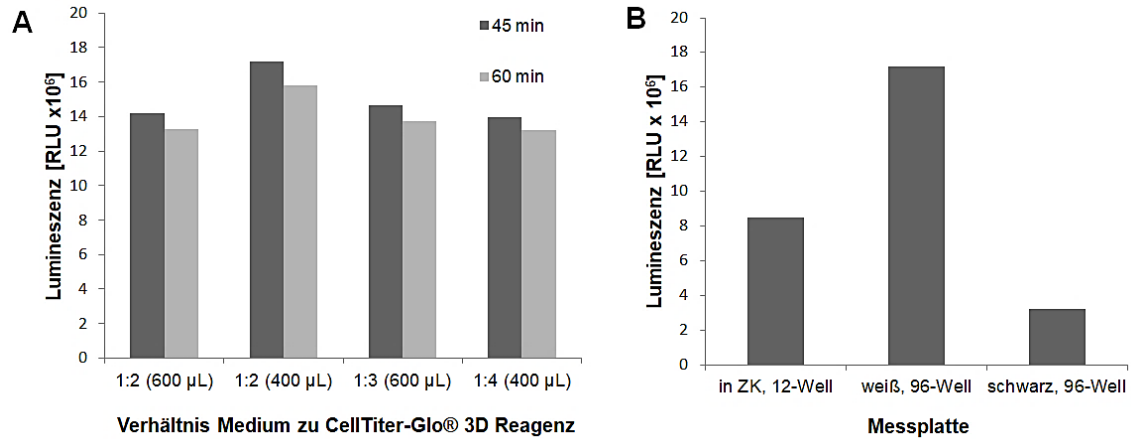


Abbildung 9: Lumineszenz-Signale des CellTiter-Glo® 3D Vitalitätsassays in 3D.

A) Abhängigkeit des Lumineszenz-Signals vom Verhältnis von Medium zu CellTiter-Glo® Reagenz und von der Inkubationszeit. Bei einem Verhältnis von Medium zu CellTiter-Glo®-Reagenz von 1:2 und einer Inkubationszeit von 45 min konnte das stärkste Lumineszenz-Signal detektiert werden. n=1, in Klammern sind die Gesamtvolumina angegeben. **B)** Abhängigkeit des Lumineszenz-Signals von der Messplatte. Das Überführen von 150 µL des Zelllysats in eine weiße 96-Well Platte ergab das stärkste Lumineszenz-Signal. n=1.

Beim CellTiter-Glo® 3D Zellvitalitätsassay handelt es sich um eine Endpunktmessung, bei der die Zellen lysiert werden. Die vollständige Lyse der Zellen ist Voraussetzung für eine korrekte Bestimmung der Vitalität. Es wurden verschiedene Lyse-Methoden im Ablauf des CellTiter-Glo® 3D Zellvitalitätsassay integriert und jeweils mit HE-Färbungen kontrolliert (Abbildung 10). Nach einer Inkubation mit dem CellTiter-Glo® 3D Reagenz auf dem Wippschüttler zeigte sich eine unvollständige Lyse mit noch intakten Tumorzellen (Abbildung 10B1). Das Ausspannen der Matrix aus der Zellkrone, ein zusätzliches Vortexen der Matrix oder Abschaben mit dem Zellschaber führten zu keinen höheren Lumineszenz-Signalen. Ein Einfrieren der ausgespannten Matrix für zehn Minuten bei -80 °C während der Inkubation mit dem CellTiter-Glo® 3D Reagenz führte zu einem Anstieg des Lumineszenz-Signals (Abbildung 10A).

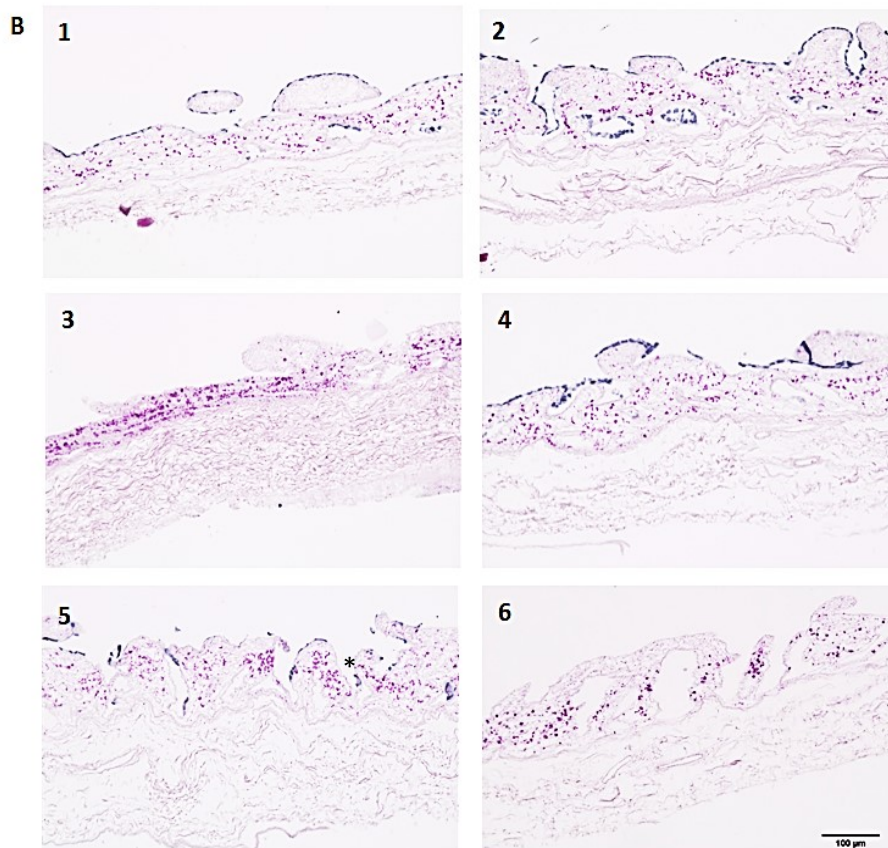
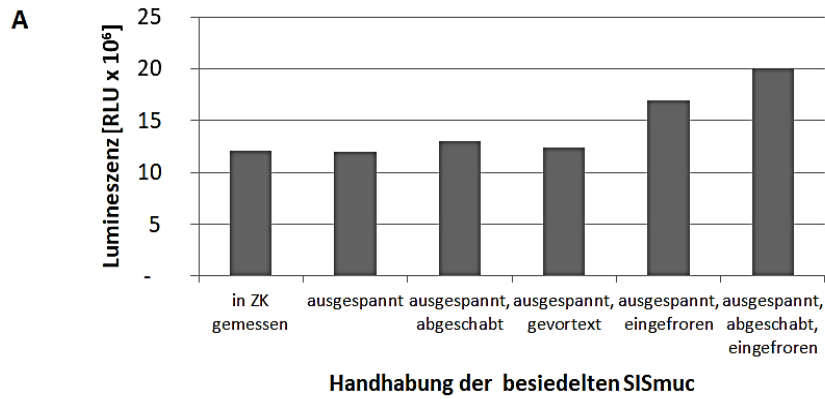


Abbildung 10: Optimierung der Zellyse im CellTiter-Glo® 3D Zellvitalitätsassay.

A) Abhängigkeit des Lumineszenz-Signals von der Handhabung der besiedelten SISmuc während Lyse und Inkubation. Das stärkste Lumineszenz-Signal wurde nach Ausspannen der SISmuc, Abschaben der Zellen und kurzzeitigem Einfrieren gemessen. n=1 **B)** HE-Färbung der 3D-Lungentumormodelle nach unterschiedlichen Lyseverfahren. Nach Abschaben der Zellen von der ausgespannten SISmuc waren keine Zellreste auf der Oberfläche mehr sichtbar. Das Sternchen (*) zeigt exemplarisch Zelldebris in der Matrix. **1)** Lyse in der Zellkrone. **2)** Lyse nach Ausspannen der SISmuc. **3)** Lyse nach Ausspannen der SISmuc und Abschaben der Zellen. **4)** Lyse nach Ausspannen und Vortexen der SISmuc. **5)** Lyse nach Ausspannen und kurzzeitigem Einfrieren der SISmuc. **6)** Lyse nach Ausspannen der SISmuc, Abschaben der Zellen und kurzzeitigem Einfrieren. Die Zellkerne sind blau, das Zellplasma und die Extrazellulärmatrix rot gefärbt. Die Balkenlänge entspricht 100 µm.

In der HE-Färbung der lysierten 3D Lungentumormodelle zeigte nur die Matrix, bei der die Zellen abgeschabt wurden, eine zellfreie Oberfläche, während alle anderen Ansätze deutlich Zellreste aufwiesen (Abbildung 10B). Wurden die Zellen von der Matrix abgeschabt und die Matrix und der Überstand mit den abgeschabten Zellen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren, so waren die höchsten Lumineszenz-Intensitäten detektierbar und es zeigte sich eine zellfreie SISmuc-Oberfläche in der HE-Färbung (Abbildung 10B6).

3.1.2. Anpassung des RealTime-Glo™ MT Zellvitalitätsassay

Es wurde ein erster Ansatz (Ansatz 1) mit MT Zellvitalität Prosubstrat und NanoLuc® Luciferase in einer Konzentration von $1\text{ }\mu\text{M}$ im gesamten Medium (inneres und äußeres Zellkronenkompartiment), mit einem zweiten Ansatz (Ansatz 2), bei dem die Reagenzien nur im inneren Kompartiment der Zellkrone vorlagen, verglichen. Im äußeren Kompartiment von Ansatz 2 befand sich Medium ohne Reagenzien.

Die absoluten Lumineszenz-Intensitäten der 3D Lungentumormodelle, die mit MT Zellvitalität Prosubstrat und NanoLuc® Luciferase im gesamten Medium (inneres und äußeres Zellkronenkompartiment) inkubiert worden waren (Ansatz 1), lagen über den Verlauf von 72 Stunden immer höher, als die Lumineszenz-Intensitäten des Ansatzes mit Medium, das nur im inneren Kompartiment der Zellkrone mit den entsprechenden Reagenzien versetzt worden war (Ansatz 2, Abbildung 11A).

Es erfolgte eine Normierung der gemessenen Lumineszenz-Signale durch Bezug auf den jeweiligen T0-Wert. Es zeigte sich in den ersten zwei Stunden ein simultaner Anstieg der normierten Lumineszenz-Signale beider Ansätze. Nach sechs Stunden stieg das Lumineszenz-Signal des nur im Inneren der Zellkrone mit Reagenzien befüllten Ansatzes (Ansatz 2) verhältnismäßig stärker an, als der Ansatz mit Prosubstrat und Luciferase im Medium beider Kompartimente (Ansatz 1, Abbildung 11B). Ein Abfall der Lumineszenz-Intensitäten war in beiden Ansätzen nach 18-24 Stunden zu verzeichnen. Nach 72 Stunden lagen die Lumineszenz-Signale unter dem T0-Wert (horizontale Linie in Abbildung 11B).

Da in einer unbehandelten Zellkrone von einer konstanten bis leicht steigenden Zellzahl ausgegangen werden kann und die RealTime-Glo Reagenzien laut Hersteller bei 37°C über 72 Stunden stabil sind, wurde ein vorzeitiger Verbrauch der Reagenzien in beiden Ansätzen vermutet. Für die Bestimmung des zeitlichen Wirkungseintritts von Gefitinib wurde für die folgenden Versuche deshalb ein Beobachtungszeitraum von 24 Stunden ausgewählt.

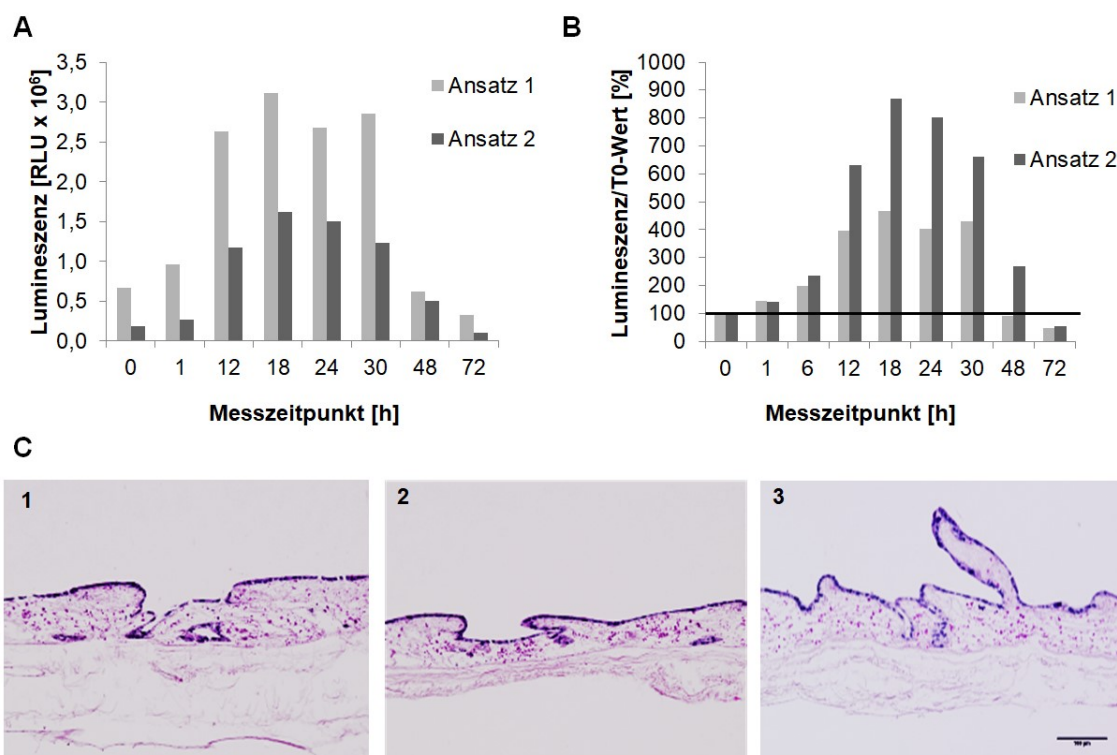


Abbildung 11: Anpassung der Menge an MT Zellvitalität Prosubstrat und NanoLuc® Luciferase an die 3D Lungentumormodelle. Es wurden ein erster Ansatz (1) mit MT Zellvitalität Prosubstrat und NanoLuc® Luciferase im gesamten Medium (inneres und äußeres Zellkronenkompartiment) und ein zweiter Ansatz (2) mit den Reagenzien nur im inneren Kompartiment der Zellkrone verglichen. Im Ansatz 2 befand sich Medium im äußeren Kompartiment. **A)** Abhängigkeit der absoluten Lumineszenz-Signale über 72 h. Die gemessenen Lumineszenz-Signale lagen im zweiten Ansatz höher. n=1. **B)** Vergleich der Lumineszenz-Signale aus A) nach Normierung auf den T0-Wert (horizontale Linie). Die normierten Lumineszenz-Signale stiegen im Ansatz 2 verhältnismäßig stärker an als im Ansatz 1, n=1. **C)** HE-Färbungen der statischen 3D Lungentumormodelle. **1)** nach Durchführung des RealTime-Glo™ MT Zellvitalitätsassay von Ansatz 1. **2)** von Ansatz 2 **3)** und ohne Durchführung des Zellvitalitätsassays. Es zeigen sich keine Unterschiede in der Besiedelung der SIS muc. Die Zellkerne sind blau, das Zellplasma und die Extrazellulärmatrix rot gefärbt. Die Balkenlänge entspricht 100 µm.

In den HE-Färbungen zeigten sich weder Unterschiede in der Besiedelung zwischen den beiden Ansätzen noch zwischen den Modellen vor und nach Durchführung des RealTime-Glo™ MT Zellvitalitätsassay (Abbildung 11C).

Es wurden die Lumineszenz-Signale zum Zeitpunkt T0 miteinander verglichen. Die Signalwerte unterschieden sich in den verschiedenen Versuchsreihen (Abbildung 12), die Varianz innerhalb einer Reihe betrug jedoch nur zwischen 0,04 und 0,23 (in Abbildung 12 nicht dargestellt).

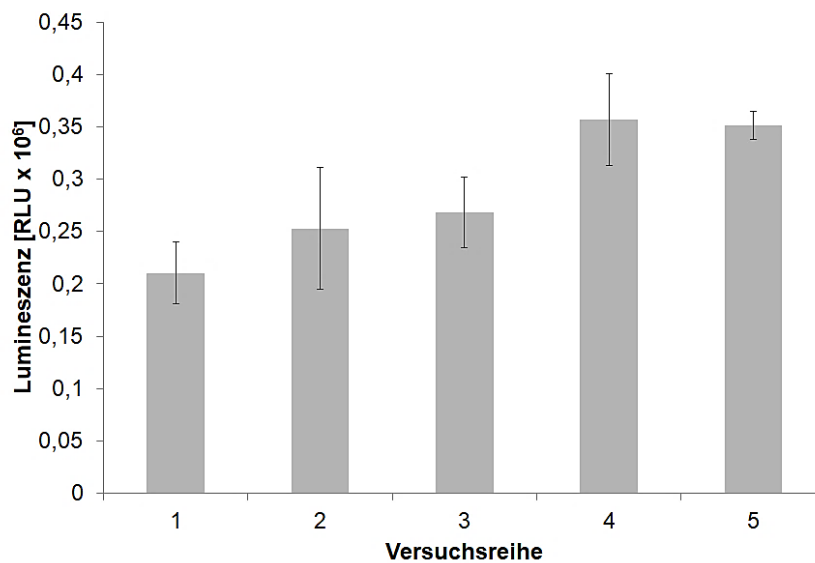


Abbildung 12: Mittelwert und Standardabweichung der Lumineszenz-Signale zum Zeitpunkt T0 in den fünf verschiedenen Versuchsreihen. Die Lumineszenz-Intensität schwankte zwischen den Versuchsreihen. Innerhalb derselben Versuchsreihe zeigte sich jedoch nur eine geringe Standardabweichung. Die Lumineszenz wurde mit Hilfe des angepassten RealTime-Glo™ MT Zellvitalitätsassay bestimmt. Mittelwert \pm Standardabweichung, n=3.

3.2. Behandlung mit dem EGFR-TKI Gefitinib

3.2.1. Dosis-Wirkungs-Beziehungen in der 2D Zellkultur

Mithilfe des CellTiter-Glo *luminescent* Zellvitalitätsassays wurde die Vitalität der Zellen in der 2D Zellkultur in Abhängigkeit von steigenden Gefitinib-Dosierungen bestimmt. Dies ermöglichte eine vergleichende Betrachtung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Gefitinib in einer reinen Zellkultur, mit der im humanen Lungentumormodell. Die Zellen wurden drei Tage mit jeweils 0,01 μM ; 0,05 μM ; 0,1 μM ; 0,5 μM ; 1 μM und 5 μM Gefitinib inkubiert. Bei einer Behandlung mit 0,01 μM Gefitinib sank die Vitalität auf 63 % der unbehandelten Kontrollprobe und war bei der nächsthöheren Gefitinib-Konzentration von 0,05 μM bei 43 % und somit unterhalb der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50} -Wert). Die Vitalität fiel bei der Gabe von höheren Gefitinib-Konzentrationen weiter ab und erreichte bei einer Behandlung mit 5 μM Gefitinib 4 % (Abbildung 13).

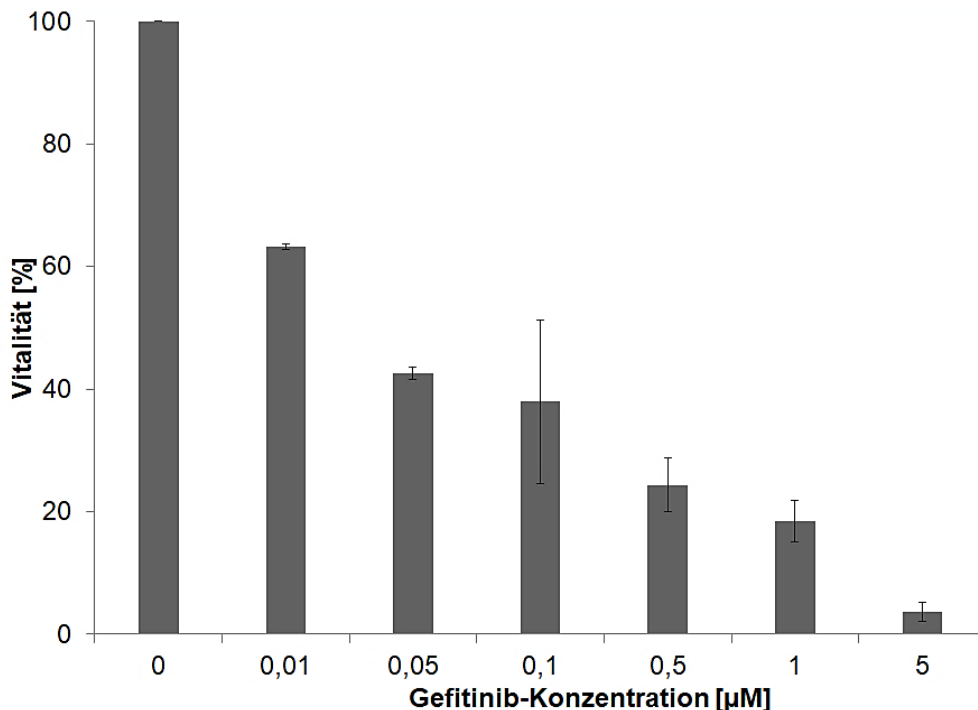


Abbildung 13: Vitalität der HCC827-Zellen in der 2D Kultur nach dreitägiger Behandlung mit unterschiedlichen Gefitinib-Konzentrationen. Die im CellTiter-Glo *luminescent* Zellvitalitätsassay bestimmten Werte wurden auf die unbehandelte Probe (0 μM Gefitinib) bezogen. Die HCC827-Zelllinie zeigt eine konzentrationsabhängige Verringerung der Vitalität nach Behandlung mit steigenden Gefitinib-Konzentrationen. Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=2$.

3.2.2. Dosis-Wirkungs-Beziehungen im statischen 3D Lungentumormodell

3.2.2.1. Einflüsse von Gefitinib auf das Tumorzellwachstum

In der HE-Färbung des unbehandelten 3D Lungentumormodells wuchsen die HCC827-Zellen als geschlossener Monolayer auf der Matrixoberfläche und besiedelten die Kryptenstrukturen. Mit höheren Gefitinib-Konzentrationen nahm die Dichte der Zellbesiedelung ab und der Monolayer wies zunehmend Lücken auf. Eine direkte Dosisabhängigkeit der Zelldichte über alle Konzentrationen war jedoch nicht zu beobachten (Abbildung 14)

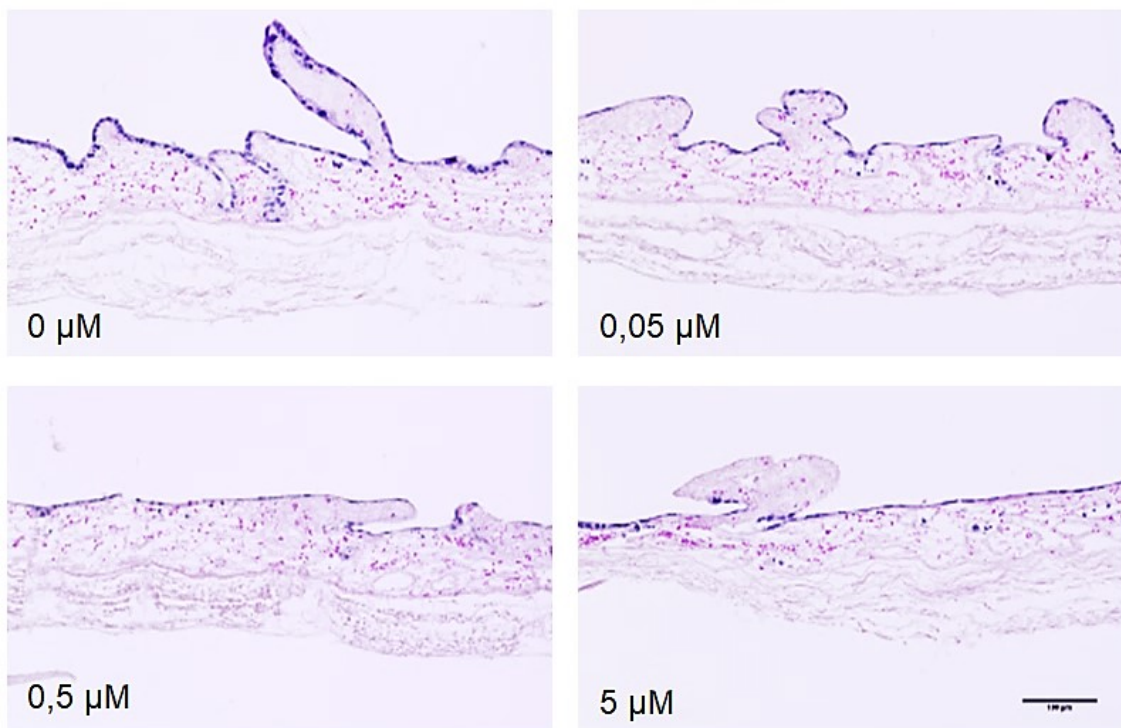


Abbildung 14: Wachstumsverhalten der HCC827-Zellen im statischen 3D Lungentumormodell nach dreitägiger Behandlung mit Gefitinib in unterschiedlichen Konzentrationen. HE-Färbung nach 14-tägiger Kultur der 3D Tumormodelle. Es zeigt sich eine Abnahme der Zelldichte mit zunehmender Gefitinib-Dosis. Die Zellkerne sind blau, das Zellplasma und die Extrazellulärmatrix rot gefärbt. Die Balkenlänge beträgt 100 µm.

Die Vitalität der Tumorzellen im 3D Tumormodell unter Behandlung mit Gefitinib erfolgte durch den angepassten CellTiter-Glo[®] 3D Zellvitalitätsassay (siehe 3.1.1). Bei der Behandlung mit 0,01 μM Gefitinib fiel die Vitalität auf 72 % und bei einer Behandlung mit 0,05 μM auf 51 % des unbehandelten Ansatzes. Höhere Gefitinib-Konzentrationen führten zu keinem weiteren Abfall der Zellvitalität (Abbildung 15A).

Um die Auswirkung von Gefitinib auf die Proliferation der HCC827-Zellen im statischen 3D Lungentumormodell zu untersuchen, wurde der Proliferationsindex mittels Ki67-Immunfluoreszenzfärbung bestimmt (siehe 2.2.6.6). In der unbehandelten Probe zeigte sich eine Proliferation von 30 % (Abbildung 15C). Diese verringerte sich durch die Behandlung mit Gefitinib konzentrationsabhängig und war in Zellen, die mit 0,1 μM Gefitinib behandelt wurden, mit 8 % minimal. Eine weitere Erhöhung der Gefitinib-Konzentration führte zu keiner zusätzlichen Abnahme der Proliferation.

Mit dem M30 CytoDeath ELISA wurde die Apoptoserate nach 6, 24, 48 und 72 Stunden Behandlung mit Gefitinib berechnet. Für die Durchführung des M30 CytoDeath ELISA siehe 2.2.5. Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Apoptoserate auf das Vierfache des Ausgangswertes bis 0,1 μM Gefitinib. Höhere Gefitinib-Konzentrationen führten zu keinem weiteren Anstieg. Der stärkste Anstieg war nach 24 Stunden zu verzeichnen (Abbildung 15B).

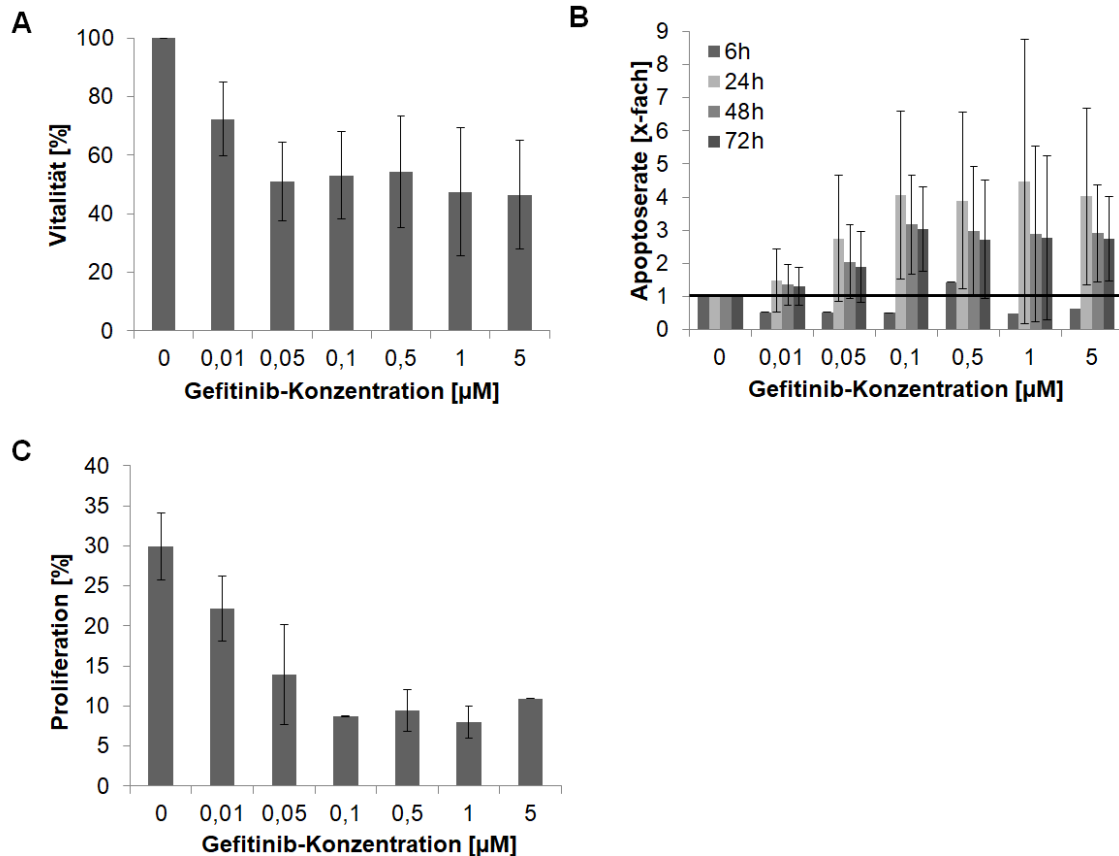


Abbildung 15: Vitalität, Apoptose und Proliferation der HCC827-Zellen im statischen 3D Lungentumormodell nach Behandlung mit Gefitinib in unterschiedlichen Konzentrationen. A) Vitalität. Gefitinib führt in den HCC827-Zellen zu einer Vitalitätsreduktion. Die Vitalität wurde nach dreitägiger Behandlung mit Gefitinib mit Hilfe des angepassten CellTiter-Glo® 3D Zellvitalitätsassay bestimmt. Die Lumineszenz-Signale wurden auf die unbehandelte Kontrolle bezogen. Es zeigt sich ein Abfall der Vitalität auf 50% bei einer Behandlung mit 0,05 μM Gefitinib. Eine weitere Erhöhung der Gefitinib-Konzentration führt zu keinem weiteren Vitalitätsabfall. Mittelwert ± Standardabweichung, n=2. **B) Apoptose-Induktion.** HCC827-Zellen zeigten eine verstärkte Antwort auf Gefitinib in der 3D Kultur, der Anstieg war nach 24 Stunden am stärksten. Der Anstieg der Apoptose wurde mit Hilfe des M30 CytoDeath™ ELISAs bestimmt. Dafür wurden Überstände der unbehandelten und behandelten Proben direkt vor (T0-Probe) sowie 6, 24, 48 und 72 h nach Behandlung gesammelt. Die Konzentrationen an M30 nach der Behandlung wurden auf die jeweiligen T0-Werte normiert und anschließend auf die unbehandelte Kontrolle (horizontale Linie) bezogen. 6h: n=1, 24-72h: n=3. **C) Proliferation.** Gefitinib führte in den HCC827-Zellen zur Proliferationsinhibierung. Bei 0,1 μM Gefitinib zeigte sich ein Abfall bis auf ein Drittel des Ausgangswertes. Die Proliferationsrate (proliferative Zellen/Gesamtzellzahl) wurde über eine Ki67-Immunfluoreszenzfärbung bestimmt. Dabei wurden die Ki67-positiven Zellen sowie die Gesamtzellzahl über DAPI in zehn Bildern je Probe quantifiziert und anschließend der Quotient gebildet.

Anhand der Ergebnisse aus dem CellTiter-Glo[®] 3D Zellvitalitätsassay in Abschnitt 3.2.2.1 erfolgte für die Bestimmung des Wirkeintritts von Gefitinib mittels RealTime-Glo[™] MT Zellvitalitätsassay sowie für die Untersuchungen der Signalwege eine Behandlung mit 0,05 μM (etwa IC_{50} -Wert) und 1 μM Gefitinib.

Die Wirkung von Gefitinib über den Zeitverlauf wurden mit Hilfe des angepassten RealTime-Glo[™] MT Zellvitalitätsassays (siehe 3.1.2) bestimmt. Die Vitalität der HCC827-Zellen zeigte über die Behandlungsdauer von 24 Stunden nur marginale Unterschiede zwischen einer Behandlung mit 0,05 μM und einer mit 1 μM Gefitinib (Abbildung 16). Ein erster Vitalitätsverlust zeigte sich vier Stunden nach Gefitinib-Zugabe. Nach neun Stunden sank die Vitalität auf 52 % (0,05 μM Gefitinib) bzw. 56 % (1 μM Gefitinib) der unbehandelten Probe. Ein weiterer Vitalitätsverlust in den folgenden Stunden war nicht zu verzeichnen. Die Etablierung des RealTime-Glo[™] MT Zellvitalitätsassays deckte eine Stabilität der Reagenzien bis 24 Stunden auf, sodass von einer Beobachtung der Vitalität über diesen Zeitraum hinaus abgesehen wurde.

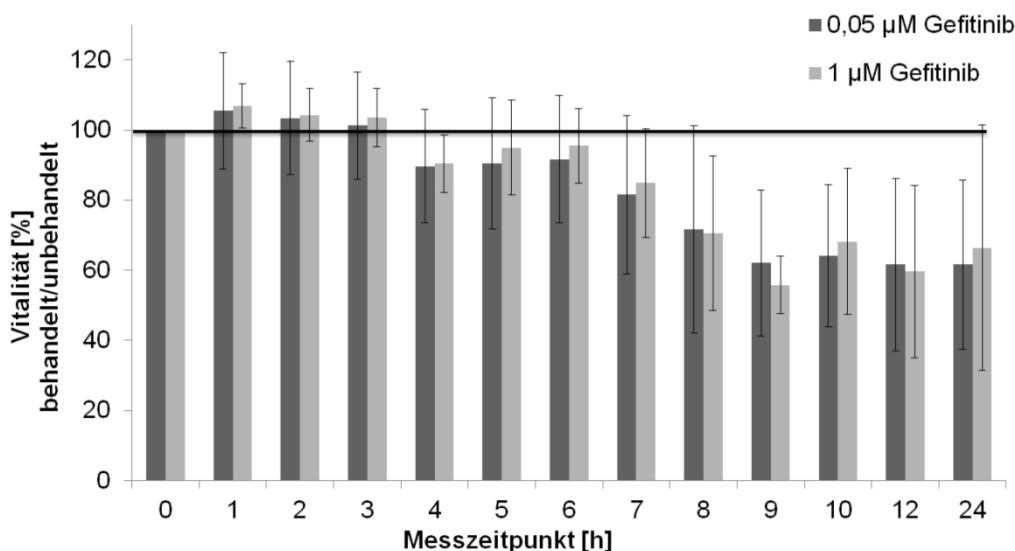


Abbildung 16: Vitalität der HCC827-Zellen über 24 h Behandlung mit Gefitinib. Eine erste Verringerung der Vitalität war nach 4 h zu sehen. Nach 9 h war die Vitalität minimal und blieb über den restlichen Untersuchungszeitraum konstant. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen einer Behandlung mit 0,05 μM und 1 μM Gefitinib. Die Echtzeitbestimmung der Vitalität wurde mit dem angepassten RealTime-Glo[™] MT Zellvitalitätsassay durchgeführt. Die Lumineszenz-Werte wurden auf die unbehandelte Probe sowie den T0-Wert bezogen. Mittelwert \pm Standardabweichung, n=5.

3.2.2.2. Einflüsse von Gefitinib auf die Proteinexpression und Signalwegsaktivierungen

Die konzentrationsabhängigen Einflüsse von Gefitinib auf die Polarisation und die epithelialen Eigenschaften der Zellen wurden untersucht. Dafür wurde die Expression des Polarisationsmarkers Mucin-1 und der EMT-Marker E-Cadherin, β -Catenin, pan-Cytokeratin und Vimentin in Immunfluoreszenzfärbungen der statischen 3D Lungentumormodelle verglichen.

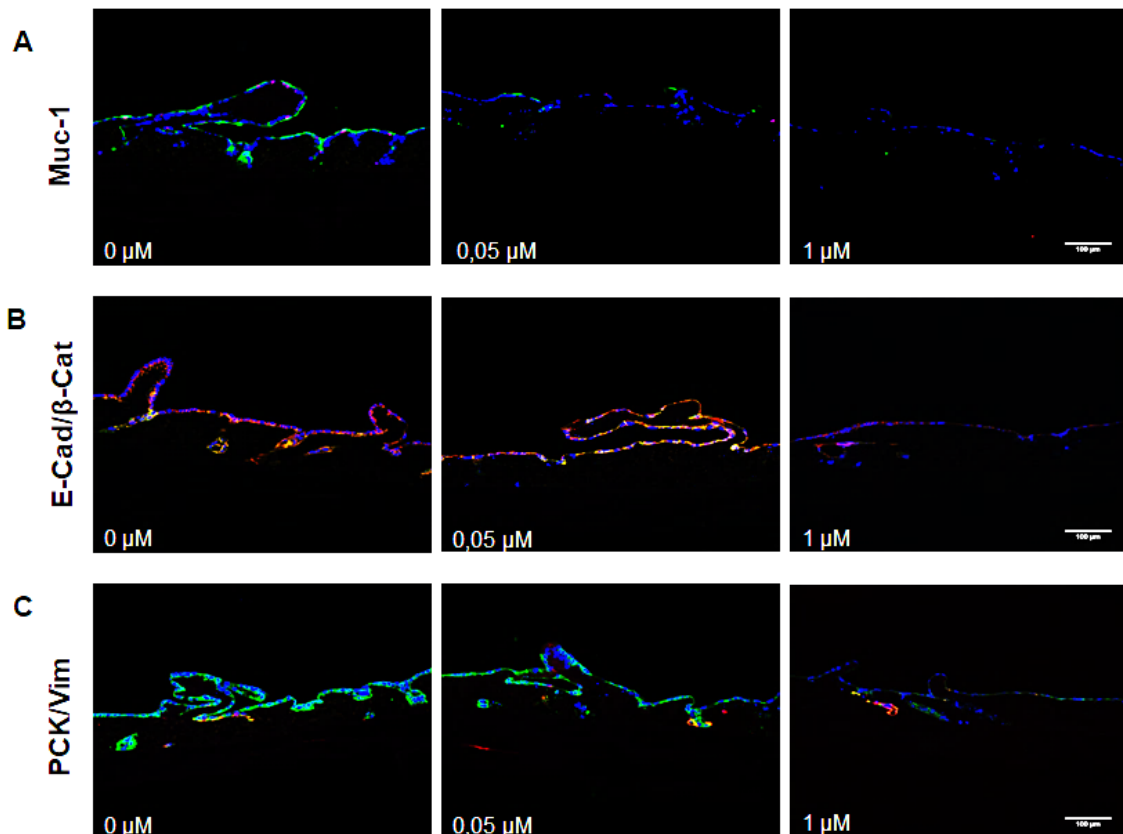


Abbildung 17: Markerexpression in unbehandelten HCC827-Zellen sowie nach dreitägiger Behandlung mit 0,05 μ M und 1 μ M Gefitinib. A) Expression von Mucin-1 (Muc-1, grün). Es zeigt sich eine Abnahme der Mucin-1 Expression nach Behandlung mit Gefitinib in zunehmenden Konzentrationen. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Die Balkenlänge entspricht 100 μ M. **B)** Expression von E-Cadherin (E-Cad, grün) und β -Catenin (β -Cat, rot). Es zeigt sich eine Abnahme der E-Cadherin und β -Catenin Expression nach Behandlung mit Gefitinib in zunehmenden Konzentrationen. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Die Balkenlänge entspricht 100 μ M. **C)** Expression von pan-Cytokeratin (PCK, grün) und Vimentin (Vim, rot). Es zeigt sich eine Abnahme der pan-Cytokeratin Expression und eine gleichbleibende Vimentin Expression nach Behandlung mit Gefitinib in zunehmenden Konzentrationen. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Die Balkenlänge entspricht 100 μ M.

In der Immunfluoreszenzfärbung zeigte sich Mucin-1 auf der apikalen Zellseite und vereinzelt im Zytoplasma von tiefer in der SISmuc liegenden Zellen. Mit zunehmender Gefitinib-Konzentration und geringerer Zellzahl, sank die Mucin-1 Expression (Abbildung 17A).

Die Expression von E-Cadherin und β -Catenin zeigte sich kolokalisiert entlang der Zellmembranen und im Zytoplasma. Die dreitägige Behandlung mit Gefitinib führte den Färbungsergebnissen nach zu einer geringeren Expression (Abbildung 17B).

Pan-Cytokeratin wurde im Zytoplasma der HCC827-Zellen und Vimentin nur vereinzelt im Zytoplasma von tiefer in den Krypten lokalisierten Zellen exprimiert. Eine abnehmende Pan-Cytokeratin- und eine gleichbleibende Vimentin-Expression waren unter Gefitinib-Behandlung zu beobachten (Abbildung 17C).

Die Untersuchung der intrazellulären Signalwege der HCC827-Zellen im statischen 3D Lungentumormodell erfolgte mit Hilfe des pRTK-Arrays und des pK-Arrays von R&D Systems (siehe 2.2.7.4). Die mithilfe des Fluor Chem Q-Bildaufnahmegeräts (Biozym Scientific, Deutschland) aufgenommenen Membranen sind im Anhang abgebildet (Abbildung 25 und Abbildung 26). Die Untersuchung erfolgte nach neun Stunden, dem Zeitpunkt des Wirkungseintritts sowie nach einer Behandlungsdauer von 72 Stunden.

Im pRTK-Array wiesen die unbehandelten Proben zu beiden Zeitpunkten eine hohe Phosphorylierung des EGFR auf. Die Behandlung mit 0,05 μ M Gefitinib zeigte nach 72 Stunden eine deutliche Verminderung der EGFR-Phosphorylierung, während die Behandlung mit 1 μ M bereits nach neun Stunden zu einem mittleren und nach 72 Stunden zu einem niedrigen Phosphorylierungsgrad führte (Tabelle 28).

HER-2, HER-3 und die MER Protoonkogen Tyrosin Kinase (MER) lagen in den unbehandelten Kontrollen jeweils niedriggradig phosphoryliert vor. Die neunstündige Behandlung mit 0,05 μ M Gefitinib zeigte keinen Effekt.

Nach neun Stunden Inkubation mit 1 μM Gefitinib war die Phosphorylierung von HER-2 und HER-3 geringer. Eine Inkubation über 72 Stunden zeigte, dass alle drei RTKs dephosphoryliert waren (Tabelle 28).

Der HGFR zeigte in den unbehandelten Ansätzen nach neun Stunden einen hohen Phosphorylierungsgrad, der nach Behandlung in beiden Konzentrationen reduziert war. Die Phosphorylierung (mittlere Intensität) in der Kontrollprobe nach 72 Stunden fiel unter Behandlung mit 1 μM Gefitinib auf einen niedrigen Phosphorylierungsgrad (Tabelle 28).

Tabelle 28: Vergleich von Signalmolekülen der HCC827-Zellen nach 9 und 72 h Behandlung mit Gefitinib mit Hilfe des pRTK-Arrays.¹

	9 h			72 h		
	0 μM	0,05 μM	1 μM	0 μM	0,05 μM	1 μM
pEGFR	+++	+++	++	+++	+	+
pHER-2	+	+	o	+	o	o
pHER-3	+	+	o	o	o	o
pMER	+	+	+	+	o	o
pHGFR	+++	++	++	++	++	+

¹ Grauwertintensitäten der Punkte auf der Membran: o = nicht detektierbar, +=niedrig, ++= mittel, +++= hoch. Die gemessenen Grauwerte wurden auf die Kontrollpunkte bezogen. Die Intensität der Punkte entspricht dem Phosphorylierungsgrad der entsprechenden Proteine.

Im pK-Array war der EGFR in den unbehandelten Kontrollansätze sowie nach neun Stunden Behandlung mit 0,05 μM Gefitinib leichtgradig phosphoryliert. Die Aktivität sank durch die Behandlung mit 1 μM Gefitinib. Nach 72 Stunden war unter keiner der Gefitinib-Konzentrationen eine Phosphorylierung detektierbar. Die Aktivität von CREB und der Serin/Threonin-Kinase ohne Lysin K 1 (WNK 1) verhielt sich wie die des EGFR (Tabelle 29). Phosphoryliertes ERK 1/2 war nur in der unbehandelten Probe nach neun Stunden schwach zu detektieren (Tabelle 29). Es wurde die Aktivität dreier Phosphorylierungsstellen von p53 bestimmt. Die Phosphorylierungsstelle S392 lag in allen Proben deutlicher phosphoryliert vor, als die Phosphorylierungsstelle S46. Die Aktivität von p53 an beiden Phosphorylierungsstellen (S392 und S46) blieb nach neun Stunden durch die Behandlung mit Gefitinib unbeeinflusst. Nach dreitägiger Behandlung zeigte sich ein niedrigerer Phosphorylierungsgrad in der unbehandelten Probe sowie dem mit 1 μM behandelten Ansatz, nicht jedoch in der 0,05 μM Probe.

Die Phosphorylierungsstelle S15 war in keinem der Ansätze zu detektieren (in Tabelle 29 nicht dargestellt). Die Phosphorylierung des Hitze Schock Protein 60 (HSP60) war zu allen Zeitpunkten in mittlerer Intensität nachweisbar, ein Einfluss durch Gefitinib war nicht zu beobachten. pAKT war in keinem der Ansätze detektierbar (Tabelle 29).

Tabelle 29: Vergleich von Signalmolekülen der HCC827-Zellen nach 9 und 72 h Behandlung mit Gefitinib mit Hilfe des pK-Arrays.²

pK-Array	9 h			72 h		
	0 μ M	0,05 μ M	1 μ M	0 μ M	0,05 μ M	1 μ M
pERK 1/2	+	o	o	o	o	o
p(p53) -S392	++	++	++	+	++	+
pEGFR	+	+	o	o	o	o
p(p53) -S46	+	+	+	o	+	o
pCREB	+	+	o	o	o	o
pWNK 1	+	+	o	o	o	o
pHSP60	++	++	++	++	++	++
pAKT	o	o	o	o	o	o

²Grauwertintensitäten der Punkte auf der Membran: o = nicht detektierbar, +=niedrig, ++= mittel, +++= hoch. Die gemessenen Grauwerte wurden auf die Kontrollpunkte bezogen. Die Intensität der Punkte entspricht dem Phosphorylierungsgrad der entsprechenden Proteine.

Aufgrund ihrer zentralen Rolle in der EGFR-Signalkaskade und der Ergebnisse in pRTK- und pK-Array wurde die Expression von EGFR, ERK 1/2, AKT und HGFR sowie ihrer aktiven, phosphorylierten Formen (pEGFR, pERK 1/2, pAKT und pHGFR) zusätzlich im *Western Blot* untersucht.

Die Expression von EGFR, ERK 1/2, AKT und HGFR zeigte keine Unterschiede zwischen den unbehandelten Proben zu beiden Zeitpunkten und den behandelten Ansätzen nach neun Stunden. Die behandelten Ansätze nach 72 Stunden wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt, da die Ladekontrolle eine unzureichende Beladung der Geltaschen nahelegt (Abbildung 18A).

Die Detektion der phosphorylierten Signalmoleküle pEGFR und pERK 1/2 war mit steigenden Konzentrationen sowohl nach neun als auch nach 72 Stunden Behandlung mit Gefitinib niedriger (Abbildung 18B).

Die Menge an pAKT und pHGFR nahm ebenfalls konzentrationsabhängig nach neun und 72 Stunden Behandlung mit Gefitinib ab. Dieser Abfall war jedoch weniger ausgeprägt als der von pEGFR und pERK 1/2.

Aufgrund der schwach sichtbaren Ladekontrollen der 72 Stunden Probe des 1 μM Ansatzes, wurden auch diese Banden nicht berücksichtigt (Abbildung 18B).

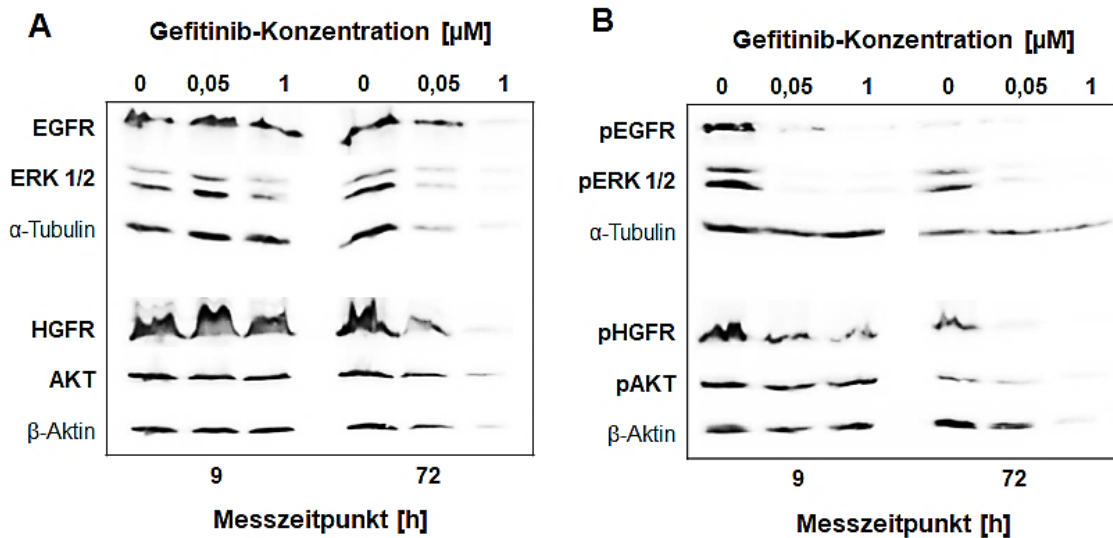


Abbildung 18: Expression von Signalproteinen und Menge der aktivierten Proteine in unbehandelten HCC827-Zellen sowie nach 9 h und 72 h Behandlung mit 0,05 μM und 1 μM Gefitinib im statischen 3D Tumormodell. A) Expression von EGFR, ERK 1/2, HGFR und AKT. Es zeigten sich keine Unterschiede in der Proteinexpression im *Western Blot*. Aufgrund der geringen Beladung wurden die behandelten Ansätze nach 72 h nicht berücksichtigt. Als Ladekontrollen dienten α -Tubulin (EGFR und ERK 1/2) und β -Aktin (HGFR und AKT), n=2. **B)** Phosphorylierung der Proteine EGFR, ERK 1/2, HGFR und AKT. Die Aktivierung von EGFR, ERK 1/2, HGFR und AKT nahm sowohl nach 9 h als auch nach 72 h mit steigender Gefitinib-Konzentration ab. Die Proteinexpression war nach 72 h geringer. Aufgrund der geringen Beladung wurden die pHGFR- und die pAKT-Banden des mit 1 μM Gefitinib behandelten Ansatzes nach 72 h nicht berücksichtigt. Als Ladekontrollen dienten α -Tubulin (pEGFR und pERK 1/2) und β -Aktin (pHGFR und pAKT), n=2.

3.3. Charakterisierung von Gefitinib-sensitiven und Gefitinib-resistenten Zellen im dynamischen 3D Lungentumormodell

Ein relevantes Problem in der Gefitinib-Therapie von *EGFR*-mutierten Adenokarzinomen ist die Entstehung von Resistenzen. Um diese Resistenzen zu untersuchen, wurde innerhalb der HCC827-Zelllinie eine resistente Subpopulation (HCCres A2) durch mehrmonatige Dauergabe von 1 μM Gefitinib in das Nährmedium generiert und im dynamischen 3D Lungentumormodell charakterisiert. Dabei sollten Unterschiede zu den Gefitinib-sensitiven HCC827-Zellen identifiziert werden. Die Kultivierung der resistenten Subpopulation erfolgte mit 1 μM Gefitinib im Medium. Es wurden Ansätze beider Zellpopulationen zunächst ohne Gefitinib kultiviert und nach dreitägiger Behandlung mit 1 μM Gefitinib und mit jeweils unbehandelten Ansätzen verglichen.

3.3.1. Demonstration der Gefitinib-Resistenz

Der Proliferationsindex der HCC827-Zellen und der HCCres A2-Zellen im dynamischen 3D Lungentumormodell wurde, wie in Abschnitt 2.2.6.6 beschrieben, über eine Ki67-Immunfluoreszenzfärbung ermittelt.

Die Behandlung von HCC827-Zellen mit Gefitinib verringerte die Proliferation von 26 % auf 3 %. Im Gegensatz dazu war die Proliferationsrate in der resistenten Subpopulation unverändert (Abbildung 19A).

Mithilfe des M30 CytoDeath ELISA wurde die Apoptoserate der HCC827-Zellen und der HCCres A2-Zellen nach dreitägiger Behandlung mit 1 μM Gefitinib im dynamischen 3D Lungentumormodell verglichen. Es wurden Proben nach 24, 48 und 72 Stunden entnommen. Für die Durchführung des M30 CytoDeath ELISA siehe 2.2.5.

Es zeigte sich eine minimale Zunahme der Apoptoserate in den HCC827-Zellen nach Behandlung mit Gefitinib (Abbildung 19B). Aufgrund der großen Schwankungen zwischen den Einzelwerten, sind jedoch keine eindeutigen Unterschiede nachweisbar.

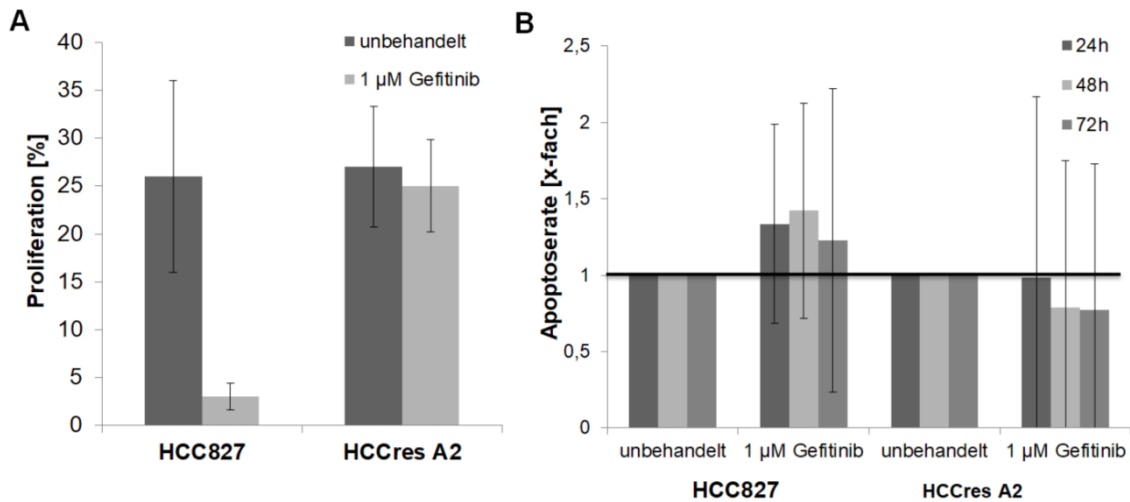


Abbildung 19: Proliferation und Apoptoserate in HCC827 und HCCres A2-Zellen nach dreitägiger Behandlung mit 1 µM Gefitinib. **A)** Proliferation. Die EGFR-mutierten HCC827-Zellen zeigten unter Gefitinib-Therapie eine Proliferationsinhibierung, während die Proliferation der HCCres A2-Zellen unter Therapie gleich blieb. Die Proliferationsrate (proliferative Zellen/Gesamtzellzahl) wurde über eine Ki67-Immunfluoreszenzfärbung bestimmt. Dabei wurden die Ki67-positiven Zellen sowie die Gesamtzellzahl anhand einer DAPI-Färbung in zehn Bildern je Probe quantifiziert und anschließend der Quotient gebildet (Siehe 2.2.6.6). **B)** Apoptose-Induktion. Es zeigten sich keine relevanten Veränderungen. Die Apoptoserate wurde mit Hilfe des M30 CytoDeath™ ELISAs bestimmt. Dafür wurden Überstände der sensiblen und resistenten Ansätze 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlung entnommen. Die Konzentrationen an M30 nach der Behandlung wurden auf die jeweiligen unbehandelten Kontrollen (horizontale Linie) bezogen. Mittelwert ± Standardabweichung, n=3.

3.3.2. Charakterisierung von Zellwachstum, Markerexpression und Signalwegsaktivierungen

In der HE-Färbung zeigte sich in den dynamisch kultivierten Modellen im Vergleich zu den statischen 3D Lungentumormodellen der HCC827-Zelllinie eine Erhöhung der Tumormasse, gekennzeichnet durch eine mehrschichtige Besiedelung sowohl der SISmuc-Oberfläche als auch der Krypten (Abbildung 20A). Nach dreitägiger Behandlung mit 1 µM Gefitinib waren eine Abnahme von Zelldichte und Zellmasse und nur noch eine spärliche Besiedelung der SISmuc zu beobachten. Die Zellen bildeten einen dünnen Monolayer und reichten vereinzelt bis in die Krypten der SISmuc (Abbildung 20B).

Die HCCres A2-Zellen wuchsen inhomogener als die HCC827-Zellen und der Monolayer wies Lücken auf. In den Krypten fanden sich mehr Zellen als an der SISmuc-Oberfläche, die Gesamtzellmasse war deutlich geringer als die der HCC827-Zellen. Eine Behandlung mit Gefitinib verringerte die Zellzahl nicht (Abbildung 20 C und D).

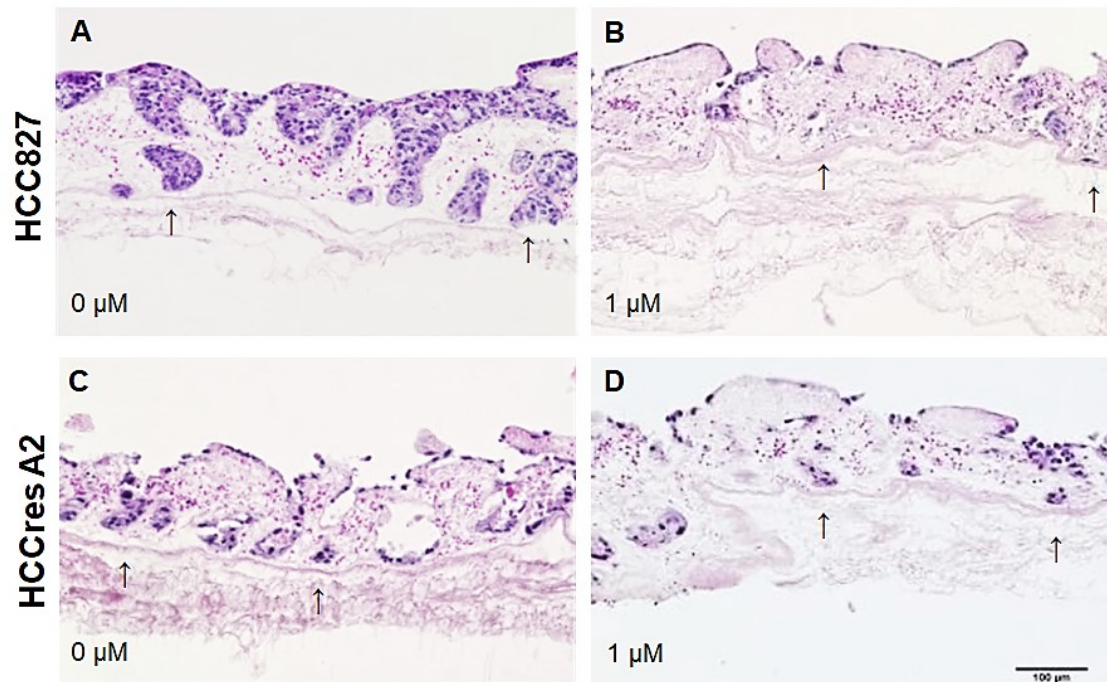


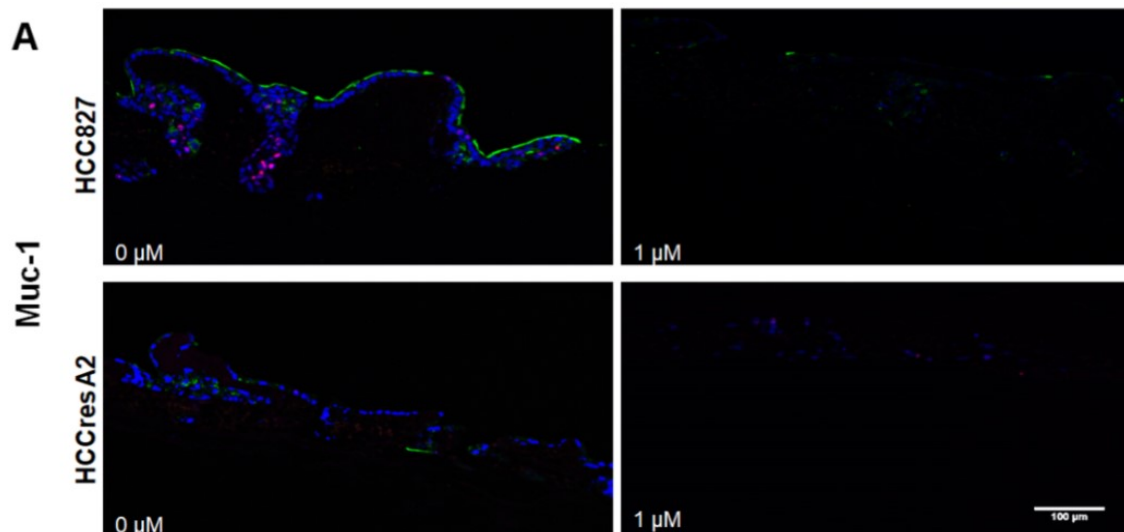
Abbildung 20: Wachstumsverhalten von HCC827- und HCCres A2-Zellen im dynamischen 3D Lungentumormodell. A) Vergleich von mit 1 µM Gefitinib behandelten Modellen mit unbehandelten Modellen. Die unbehandelten HCC827-Zellen wachsen mehrschichtig auf der SISmuc-Oberfläche und in den Krypten. **B)** Eine Gefitinib-Therapie führt in den HCC827-Zellen zu einer starken Reduktion der Zellzahl und nur noch vereinzelt Zellen in den Krypten. **C)** Die HCCres A2-Zellen wachsen als inhomogener, lückenhafter Monolayer und bis in die Krypten. **D)** Die Gefitinib-Behandlung hat in den HCCres A2-Zellen keine Auswirkung auf das Zellwachstum. HE-Färbung nach 14-tägiger Kultur im Bioreaktor. Die Zellkerne sind blau, das Zellplasma und die Extrazellulärmatrix rot gefärbt. Die Pfeile zeigen auf exemplarische Krypten. Die Balkenlänge entspricht 100 µm.

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung wurden – analog zu den statischen Modellen (Abbildung 16) - auch in den dynamischen Modellen der Polarisationsmarker Mucin-1, die epithelialen Marker E-Cadherin und pan-Cytokeratin, der Transkriptionsfaktor und Zytoskelettlinker β -Catenin sowie der mesenchymale Marker Vimentin immunhistochemisch gefärbt (Abbildung 21).

Mucin-1 wurde in der obersten Zellschicht der HCC827-Zellen apikal exprimiert und zytoplasmatisch in den tieferliegenden Zellen. Nach der dreitägigen Behandlung mit Gefitinib zeigte sich nur noch eine vereinzelte Mucin-1 Expression. Sowohl in den behandelten als auch in den unbehandelten HCCres A2-Zellen war vereinzelt eine zytoplasmatische Mucin-1 Expression zu beobachten (Abbildung 21 A).

E-Cadherin und β -Catenin zeigten in den HCC827-Zellen eine starke Expression und Kolokalisation an den Zellgrenzen. In den HCCres A2-Zellen waren sie schwächer exprimiert. Die Behandlung mit Gefitinib hatte keinen sichtbaren Einfluss auf die E-Cadherin und β -Catenin Lokalisation und Expression (Abbildung 21 B).

In der pan-Cytokeratin/Vimentin Immunfluoreszenzfärbung zeigte sich ein großer Unterschied in der Markerexpression zwischen den sensitiven und resistenten Zellen. In den HCC827-Zellen wurde pan-Cytokeratin besonders im Zytoplasma exprimiert und Vimentin nur vereinzelt und dann in den tiefer gelegenen Zellen des 3D Lungentumormodells. In den HCCres A –Zellen war eine stärkere, ubiquitäre Expression von Vimentin und nahezu keine pan-Cytokeratin Expression zu beobachten. Die Behandlung mit Gefitinib führte in keiner der Populationen zu einer Veränderung der Markerexpression (Abbildung 21 C).



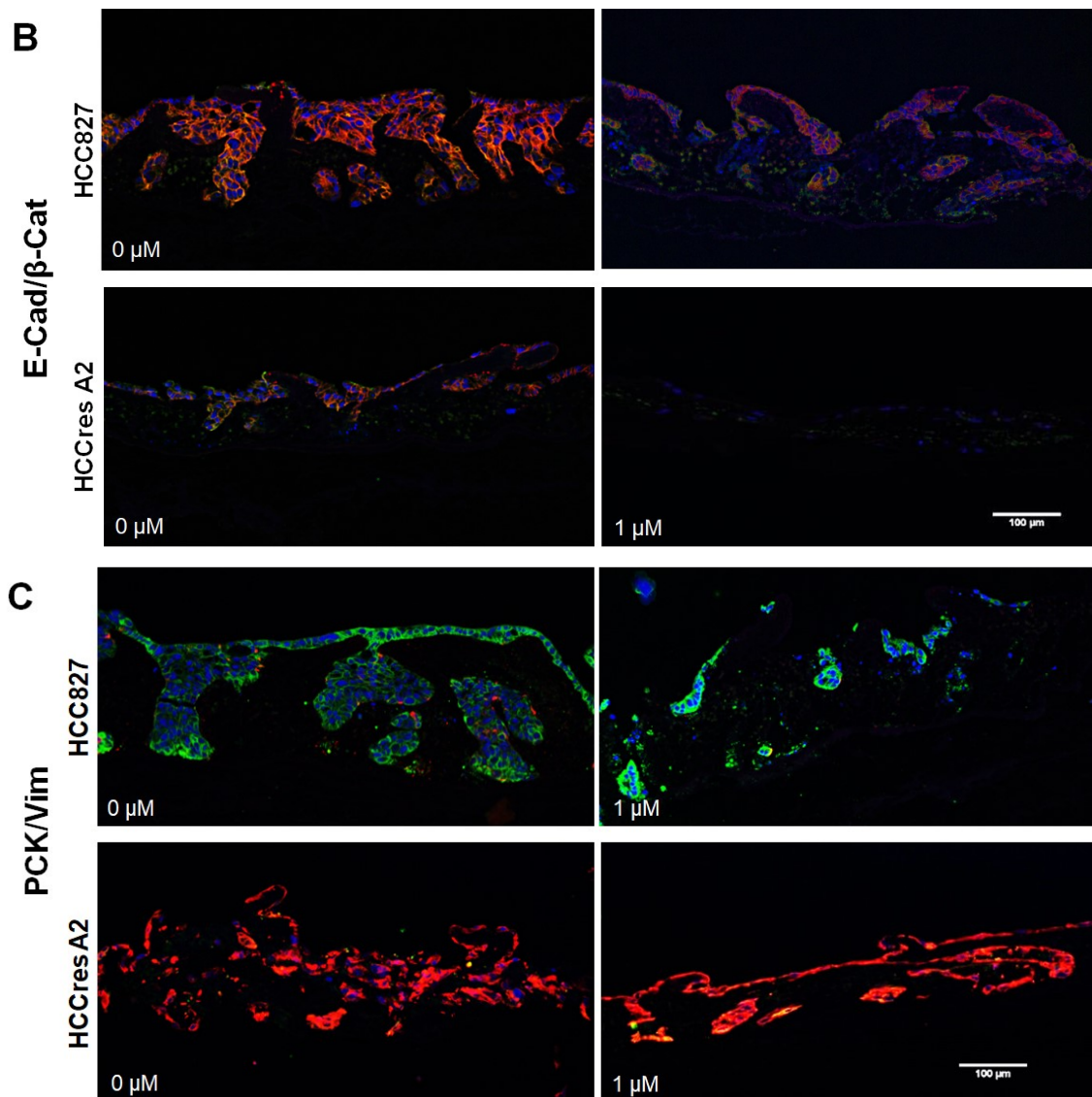


Abbildung 21: Charakterisierung un behandelter HCC827- und HCCres A2-Zellen sowie nach dreitägiger Behandlung mit 1 µM Gefitinib. **A)** Starke apikale und zytoplasmatische Expression von Mucin-1 (Muc-1, grün) in den un behandelten HCC827 und vereinzelte zytoplasmatische Expression in den HCCres A2-Zellen. Die Gefitinib-Behandlung führte zu einer verminderten Mucin-1 Expression. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Die Balkenlänge entspricht 100 µm. **B)** An den Zellgrenzen kolokalisierte Expression von E-Cadherin (E-Cad, grün) und β-Catenin (β-Cat, rot). In den HCC827-Zellen waren die Marker stark und in den HCCres A2 schwächer exprimiert. Die Behandlung mit Gefitinib hatte keinen Einfluss auf die Expression. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Die Balkenlänge entspricht 100 µm. **C)** Expression von pan-Cytokeratin (PCK, grün) und Vimentin (Vim, rot). Pan-Cytokeratin war in den HCC827-Zellen stark und Vimentin schwach exprimiert. In den HCCres A2 Zellen verhielt es sich gegensätzlich mit einer starken Vimentin und nur leichten pan-Cytokeratin Expression. Es war kein Einfluss von Gefitinib auf die Markerexpression zu beobachten. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Die Balkenlänge entspricht 100 µm.

Um mögliche Unterschiede in den Proteinaktivierungen von behandelten und unbehandelten HCC827-Zellen und HCCres A2-Zellen im dynamischen 3D Lungentumormodell zu erkennen, wurden phosphorylierte Kinasen mit Hilfe in des pRTK-Array und des pK-Array bestimmt.

Im pRTK-Array zeigte sich eine deutliche Phosphorylierung des EGFR sowohl in den HCC827 als auch in den Gefitinib-resistenten HCCres A2-Zellen, die nach Behandlung mit 1 μ M Gefitinib kaum mehr nachzuweisen war (Tabelle 30). Die Phosphorylierung von HER-2, HER-3 und MER war im unbehandelten Tumormodell der HCC827-Zellen nur schwach und nach Gefitinib-Behandlung nicht mehr detektierbar. In den HCCres A2-Zellen war keine Aktivierung von HER-2, HER-3 und MER nachzuweisen (Tabelle 30). Die Grauwert-Intensität des phosphorylierten HGFR war in der unbehandelten HCC827-Kontrollprobe mittelstark und nach einer Behandlung mit Gefitinib nicht mehr detektierbar. In den HCCres A2-Zellen zeigte sich keine Phosphorylierung von HGFR (Tabelle 30).

Tabelle 30: Vergleich von Signalmolekülen in HCC827-Zellen und HCCres A2. Zellen nach dreitägiger Behandlung mit Gefitinib mit Hilfe des pRTK-Arrays. ³

pRTK-Array	HCC827		HCCres A2	
	0 μ M	1 μ M	0 μ M	1 μ M
pEGFR	+++	+	+++	+
pHER-2	+	o	o	o
pHER-3	+	o	o	o
pMER	+	o	o	o
pHGFR	++	o	o	o

³Grauwertintensitäten der Punkte auf der Membran: o = nicht detektierbar, +=niedrig, ++= mittel, +++= hoch. Die gemessenen Grauwerte wurden auf die Kontrollpunkte bezogen. Die Intensität der Punkte entspricht dem Phosphorylierungsgrad der entsprechenden Proteine.

Im pK-Array waren nur vereinzelt Proteine nachweisbar. (Tabelle 31).

Eine Phosphorylierung des EGFR konnte in keiner Probe detektiert werden.

p53 war an zwei Phosphorylierungsstellen (S392 und S46) in den unbehandelten HCC827-Zellen nur wenig phosphoryliert, was sich in einer geringen Grauwertintensität der jeweiligen Punkte niederschlug. Die Phosphorylierungsstelle S15 war in keinem der Ansätze detektierbar (in Tabelle 31 nicht dargestellt). Nach Behandlung mit Gefitinib war eine Phosphorylierung von p53 in keinem der Ansätze nachweisbar. In der resistenten Subpopulation war ebenfalls keine Phosphorylierung nachzuweisen.

ERK 1/2, WNK1 und c-Jun wiesen nur in den behandelten HCC827-Zellen eine geringe Phosphorylierung auf.

HSP60 lag in beiden Zellpopulationen in einem niedrigen Phosphorylierungsgrad vor. Die dreitägige Behandlung mit Gefitinib führte zu keiner Veränderung.

Tabelle 31: Vergleich von Signalmolekülen in HCC827-Zellen und HCCres A2. Zellen nach dreitägiger Behandlung mit Gefitinib mit Hilfe des pK-Arrays. ⁴

pK-Array	HCC827		HCCres A2	
	0 μ M	1 μ M	0 μ M	1 μ M
pERK1/2	o	+	o	o
p(p53) -S392	+	o	o	o
pEGFR	o	o	o	o
p(p53) -S46	+	o	o	o
pCREB	+	o	o	o
p(c-Jun)	o	+	o	o
pWNK 1	o	+	o	o
pHSP60	++	++	++	++

⁴Grauwertintensitäten der Punkte auf der Membran: o = nicht detektierbar, +=niedrig, ++= mittel, +++= hoch. Die gemessenen Grauwerte wurden auf die Kontrollpunkte bezogen. Die Intensität der Punkte entspricht dem Phosphorylierungsgrad der entsprechenden Proteine.

3.4. Generierung einer neuen, gegen Gefitinib resistenten Subpopulation (HCCres A5)

In vorliegender Arbeit wurden durch 40-tägige Dauerbehandlung der Zelllinie HCC827 mit 1 μM Gefitinib resistente Tumorzellen (HCCres A5) selektiert. Morphologisch zeigten sich im Lichtmikroskop Veränderungen der HCCres A5-Zellen gegenüber den HCC827-Zellen. Die gegen Gefitinib resistenten Zellen wiesen ein sehr inhomogenes Bild mit vermehrt gruppierten spindelförmigen Zellen in unterschiedlichen Größen auf (Abbildung 22A). Mithilfe des CellTiter-Glo[®] *luminescent* Zellvitalitätsassays (siehe 2.2.4.1) wurde die Vitalität der neu generierten HCCres A5-Zellen nach Behandlung mit Gefitinib in 2D Zellkulturen bestimmt. Die HCCres A5-Zellen zeigten nach einer Behandlung mit 0,01-1 μM Gefitinib einen Abfall der Vitalität auf 61 % bis 84 % der unbehandelten Kontrollprobe. Nach einer Behandlung mit 5 μM Gefitinib fiel die Vitalität auf 10 % (Abbildung 22B). Es ist demnach nicht von einer vollständigen Gefitinib-Resistenz der HCCres A5 auszugehen. In den als Positivkontrolle dienenden, Gefitinib-sensitiven HCC827-Zellen zeigte sich ein starker Abfall der Vitalität.

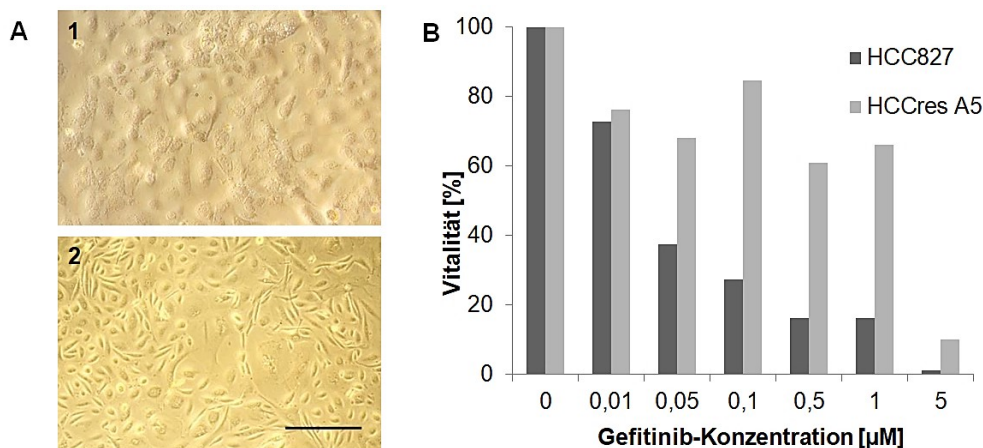


Abbildung 22: Morphologie und Vitalität von HCC827- und HCCres A5-Zellen in der 2D Zellkultur. **A)** Morphologie. 1) HCC827-Zellen. 2) HCCres A5-Zellen. Die Subpopulation HCCres A5 weist unter dem Lichtmikroskop ein inhomogenes Bild mit spindelförmiger Morphologie auf. Die Balkenlänge entspricht 100 μm . **B)** Vitalität nach dreitägiger Behandlung mit Gefitinib in verschiedenen Konzentrationen. Es zeigte sich keine vollständige Resistenz der HCCres A5-Zellen. Eine Behandlung mit 5 μM Gefitinib führte zu einer Vitalität von 10 %. Im Vergleich zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Vitalitätsabfall der HCC827-Zellen auf 3%. Die Vitalität wurde mit dem CellTiter-Glo[®] *luminescent* Zellvitalitätsassay bestimmt. Die Lumineszenz-Werte wurden jeweils auf die unbehandelte Probe bezogen, n=1.

4. Diskussion

Das Lungenkarzinom ist die zweithäufigste Tumorerkrankung weltweit und mit einer sehr schlechten Prognose verbunden [3, 4]. Lungenadenokarzinome, die eine aktivierende *EGFR*-Mutation aufweisen, werden unter anderem mit dem oralen EGFR-TKI Gefitinib (Iressa[®], ZD1839) behandelt. Diese Behandlung führt im Vergleich zu einer Behandlung mit klassischen platinhaltigen Chemotherapeutika zu einer signifikanten Prognoseverbesserung [45, 55, 126]. Leider kommt es jedoch bei fast allen Patienten zu einer graduellen Entwicklung von Resistenzen und letztendlich zu einem sukzessiven Voranschreiten der Erkrankung [63].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Eignung des in unserem Labor etablierten humanen Lungentumormodells für Untersuchungen zu pharmakologischen Dosis-Wirkungs-Beziehung sowie zur Entwicklung von Resistenzen überprüft werden.

Hierfür wurde die Wirkung von Gefitinib in der 2D Zellkultur, im statisch sowie im dynamisch kultivierten 3D Lungentumormodell verglichen. Es zeigten sich konzentrationsabhängige und zeitliche Veränderungen in Wachstumsverhalten, Vitalität, Proliferation, Apoptose, Markerexpression und den Signalwegsaktivierungen.

Die Versuche in dieser Arbeit wurden mit der Gefitinib-sensitiven Zelllinie HCC827, die eine aktivierende *EGFR*-Mutation aufweist, sowie mit der daraus generierten Gefitinib-resistenten Subpopulation HCCres A2 durchgeführt. Außerdem wurde eine weitere Population HCCres A5 generiert.

Um die Vitalität der Zellen unter einer Behandlung mit Gefitinib zu bestimmen, wurden zunächst Vitalitätsassays für das statische 3D Lungentumormodell etabliert.

4.1. Etablierung der Vitalitätsassays

Die Bestimmung der Zellvitalität ist ein relevantes Kriterium in der Erprobung von zytotoxischen Medikamenten. Ein häufig verwendeter Assay ist der 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid (MTT)-Assay, bei dem in metabolisch aktiven Zellen MTT zum blau gefärbten Formazan reduziert wird [127]. Dieses lässt sich photometrisch bestimmen und ist direkt proportional zur Anzahl an lebenden Zellen [127]. In 90 % der Untersuchungen zeigten sich jedoch niedrigere IC_{50} -Werte als in den ATP-Assays, in denen Luciferin, im Beisein von ATP, zu Oxyluciferin und einem Lichtsignal katalysiert wird [128-130]. Zudem dauert der MTT-Assay länger und es ist eine Interaktion von verschiedenen Chemotherapeutika mit MTT beschrieben [128, 129]. Für die vorliegende Arbeit wurde deshalb eine Anpassung der ATP-Assays CellTiter-Glo[®] 3D Zellvitalitätsassay und RealTime-Glo[™] MT Zellvitalitätsassay von Promega für eine Verwendung im statischen 3D Lungentumormodell präferiert.

4.1.1. Anpassung des CellTiter-Glo[®] 3D Zellvitalitätsassay

Der CellTiter-Glo[®] 3D Zellvitalitätsassay wurde laut Hersteller für 3D Mikrogewebe getestet und hat eine höhere lytische Kapazität als der CellTiterGlo[®] *luminescent* Zellvitalitätsassay [125]. Es erfolgte eine Anpassung an die größeren 3D Lungentumormodelle in 12-Well Platten durch Variation der Messplatten, der Inkubationszeiten, der Lysebedingungen und des Verhältnisses von CellTiter-Glo[®] 3D Reagenz zu Medium. Dabei wurde die Höhe des Lumineszenz-Signals als richtungsbestimmender Faktor gewählt, da diese direkt mit der Menge an vorliegendem ATP korreliert [131, 132].

Zunächst wurden die Mengen an CellTiter-Glo[®] 3D Zellvitalität Reagenz variiert, um falsch-niedrige Lumineszenz-Signale, hervorgerufen durch eine zu geringe Menge Reagenz im Verhältnis zur Zellzahl, auszuschließen. Auffällig war, dass größere Mengen an Reagenz nicht zu einem höheren Lumineszenz-Signal führten. Eine Reagenzmenge von 200 μ L in 200 μ L Medium scheint demnach ausreichend, um mithilfe allen vorhandenen ATPs Luciferin zu Oxyluciferin und Licht umzuwandeln.

Die höchsten Werte des Lumineszenz-Signals zeigten sich nach Überführung des Lysats aus der durchsichtigen 12-Well Platte, in der die Tumormodelle kultiviert und lysiert worden waren, in eine weiße 96-Well Platte. Als ursächlich ist eine Streuung der Lichtsignale und Überlagerung der Lumineszenzen aus den verschiedenen Wells denkbar. In einer weißen Platte hingegen kann es zu einer Reflektion und somit einer Verstärkung der Signale von der Well-Wand kommen, während in einer schwarzen Platte eine Lichtabsorption und eine Signalabschwächung möglich sind [124]. Im Produktdatenblatt von Promega wird ebenfalls die Messung in einer undurchsichtigen, weißen Platte empfohlen [125].

In 3D Zellkulturen zeigt sich meist ein Vitalitätsunterschied zwischen den toten Zellen im Zentrum des Gewebes und denen auf der Oberfläche und damit ein starker ATP-Gradient [133]. Eine vollständige Lyse der gesamten 3D Struktur ist demnach notwendig, um keine artifiziell hohen Vitalitäts-Werte zu erhalten. Laut Hersteller müssen die Zellen für die optimale Bestimmung der Lumineszenz fünf Minuten geschüttelt werden. Eine adäquate Durchmischung von Reagenzien und Zellen ist essentiell für eine erfolgreiche Lyse und aussagekräftige ATP-Extraktion [125].

Nach Zugabe der Reagenzien und 45-minütigem Schütteln auf dem Wippschüttler zeigten sich weiterhin intakte Zellverbände auf der SISmuc. Auch in Versuchen mit 3D Sphäroid-Kulturen hatte sich eine optische Intaktheit der Mikrogewebe trotz vollständiger Lyse der Zellen gezeigt [125]. Die Penetrations- und die Lyse-Kapazität der Reagenzien sinken in Gewebeproben, die einen Durchmesser größer als 350 µm aufweisen [125]. Aufgrund der größeren Zellverbände in den 3D Lungentumormodellen und der komplexen strukturellen Gegebenheiten auf der SISmuc-Oberfläche wurde eine Optimierung der Lyse-Bedingungen in Angriff genommen.

Unter Zuhilfenahme von mechanischen Lyseverfahren wie dem Abschaben der Zellen von der gefurchten Oberfläche, dem Vortexen der besiedelten Matrix und dem kurzzeitigen Einfrieren der Proben war ein höheres Lumineszenz-Signal und somit eine höhere ATP-Ausbeute zu verzeichnen. Diese Schritte wurden in das neue Protokoll integriert.

Eine längere Inkubation von 60 anstelle von 45 Minuten zeigte kein höheres Lumineszenz-Signal. Die Halbwertszeit der Reagenzien des CellTiter-Glo[®] 3D Zellvitalitätsassays liegt bei drei Stunden [125], von einer Stabilität der Enzyme zu beiden Messzeitpunkten kann also ausgegangen werden. Eine Inkubation von 45 Minuten ist demnach ausreichend für die lichtbildende Reaktion.

Als Obergrenze der Linearität des CellTiter-Glo[®] 3D Zellvitalitätsassays sind 10 μM ATP angegeben [125]. Um die ATP-Menge in den zellreichen 3D Lungentumormodellen zu bestimmen, wäre eine ATP Standard-Kurve von Nutzen gewesen. Eventuell hätte eine Verdünnung der Proben erfolgen müssen.

4.1.2. Anpassung des RealTime-Glo[™] MT Zellvitalitätsassay

Der RealTime-Glo[™] MT Zellvitalitätsassay erlaubt eine Echtzeitbestimmung der Zellvitalität ohne die Notwendigkeit einer vorherigen Lyse der Zellen. Es wird das Reduktionsvermögen von lebenden Zellen verwendet, welche ein im Assay enthaltenes Prosubstrat in das Substrat der Luciferase reduzieren. Mithilfe dessen entsteht ein Lumineszenz-Signal, das mit der Menge an lebenden Zellen korreliert [124].

Anders als in der Anpassung des CellTiter-Glo[®] 3D Zellvitalitätsassays, war ein Überführen von Medium aus den Zellkronen in der 12-Well Platte in eine weiße 96-Well Platte nicht möglich, da die gesamte Medienmenge im inneren Kompartiment der Zellkrone (1 mL) für stündliche Messungen über einen Behandlungszeitraum von 72 Stunden zu gering gewesen wäre. Die Messungen mussten demnach in der 12-Well Platte erfolgen. Um eine Reflektion des Lumineszenz-Signals von den Zellkronen-Oberflächen auszuschließen, wurden Zellkronen aus PEEK anstatt Metall verwendet und es erfolgte eine Platzierung der Zellkronen in nicht nebeneinanderliegenden Wells. Eine Zunahme der Lumineszenz-Signale nach Zugabe des RealTime-Glo[™] Reagenz, wie sie innerhalb der ersten 18-24 Stunden zu beobachten war, ist laut Herstellerangaben keine Seltenheit bei proliferierenden Zellen [124].

Die RealTime-Glo™ MT *Cell Viability* Reagenzien sind bei 37°C über 72 Stunden stabil [124]. Diese Linearität gilt jedoch für eine Besiedelung von weniger als 1500 Zellen/Well (in einer 384-Well Platte), bei einer einfachen RealTime-Glo™ Reagenz-Konzentration [124]. Dichtere Zellbesiedelungen zeigten kürzere Stabilitätszeiträume [124]. Im zeitlichen Verlauf der Lumineszenz-Signale der 3D Lungentumormodelle war ein Abfall der gemessenen Werte nach 24 Stunden und nach 72 Stunden bis unter den T₀-Wert zu beobachten. Dies könnte an einer zu dichten Besiedelung der Matrices, an einem Mangel an verfügbarem RealTime-Glo™ Reagenz oder an einem reduzierten Metabolismus der Zellen aufgrund von sinkendem Nährstoffangebot liegen [124]. Die Lumineszenz-Signale mit dem RealTime-Glo™ Reagenz sowohl im inneren als auch im äußeren Zellkronen-Kompartiment lagen zu jedem Messzeitpunkt höher als die der Ansätze, bei denen das Reagenz nur in das Innere der Kompartimente gegeben wurde. Dies würde für ein nicht vollständig ausgeschöpftes Reduktionspotential der Zellen durch eine zu geringere Menge an verfügbarem RealTime-Glo™ Reagenz in den Ansätzen mit Reagenzien nur im Inneren der Zellkrone sprechen. Da der Abfall des Lumineszenz-Signals im Ansatz mit einer insgesamt höheren Reagenz-Konzentration jedoch zum gleichen Zeitpunkt stattfand wie im Ansatz mit Reagenzien nur im Inneren der Zellkrone, ist auf die größere Menge an RealTime-Glo™ Reagenz verzichtet worden. Es wurde nur von einer Stabilität der Reagenzien bis 24 Stunden ausgegangen.

Es zeigten sich Unterschiede zwischen den T₀-Werten der verschiedenen Versuchsreihen, die auf eine unterschiedliche Besiedelung der 3D Lungentumormodelle zurück zu führen ist und die unterschiedlichen Lumineszenz-Signale der Ansätze mit weniger/mehr Reagenz erklären könnte. Die Varianz innerhalb einer Versuchsreihe war jedoch sehr gering bei 0,04-0,23, sodass von einer verlässlichen Messung des Lumineszenz-Signals ausgegangen werden kann.

4.2. Dosis-Wirkungs-Beziehung von Gefitinib

Gefitinib (Iressa[®], ZD 1839) ist ein oraler reversibler EGFR-TKI, der in der Behandlung von Adenokarzinomen der Lunge mit einer aktivierenden *EGFR*-Mutation eingesetzt wird. Nach den aktuellen deutschen Leitlinien besteht die Gefitinib-Therapie aus einer einmaligen oralen Gabe von 250 mg Gefitinib alle 24 Stunden [134].

4.2.1. Konzentrationsabhängige Wirkung

Die Untersuchungen zur Zellvitalität in vorliegender Arbeit in der 2D Zellkultur der HCC827-Zellen ergaben einen IC₅₀-Wert zwischen 0,01-0,05 µM Gefitinib.

In präklinischen *in vitro* Versuchen vor der Erstzulassung des Medikaments Iressa[®] (Gefitinib) wurde der IC₅₀-Wert für die Inhibition des EGFR-abhängigen Zellwachstums bei 0,054 µM Gefitinib erreicht [135]. Diese Versuche wurden jedoch mit der Zelllinie A549 durchgeführt, bei der es sich um eine NSCLC-Zelllinie handelt, die einen Wildtyp-EGFR und damit eigentlich nur eine intermediäre Sensitivität gegenüber Gefitinib aufweist [136, 137].

Die in vorliegender Arbeit verwendete humane Krebszelllinie HCC827 hat eine aktivierende Mutation im Exon 19, (del E746-750) des *EGFR*-Gen. Diese Mutation führt zu einer konstitutiven Autophosphorylierung des EGFR. Gefitinib zeigt eine stärkere Affinität zum mutierten EGFR als zum Wildtyp-EGFR. Die HCC827-Zellen sind dementsprechend durch eine hohe Gefitinib-Sensitivität gekennzeichnet und wiesen auch in vorangegangenen Versuchen einen *in vitro* IC₅₀- Wert von 0,01 µM auf [17, 138, 139]. Die Zelllinie HCC4006, der ebenfalls eine Deletion von E746-750 im *EGFR*-Gen auf Exon 19 zugrunde liegt, zeigte einen IC₅₀-Wert von 0,027 µM, während NSCLC-Zelllinien mit einem Wildtyp-EGFR und anderen onkogenen Mutationen wie der *ALK*-Translokation oder *KRAS*-Mutationen bei einem IC₅₀-Wert > 10 µM gegen Gefitinib resistent sind [140]. Diese Untersuchungen bestätigen vorliegende Beobachtungen zu den Dosis- Wirkungsbeziehungen von Gefitinib, sie fanden jedoch ausschließlich in 2D Zellkulturen statt [140].

Im statischen 3D Lungentumormodell zeigte sich in dieser Arbeit allenfalls ein konzentrationsabhängiger Vitalitätsverlust bis zu einer Gefitinib-Dosis von 0,05 μM . Der IC_{50} -Wert wurde nicht vollständig erreicht (52 % vitale Zellen bei 0,05 μM). Anders als in der 2D Zellkultur, konnte durch eine Erhöhung der Gefitinib-Konzentrationen im statisch kultivierten 3D Lungentumormodell kein weiterer Vitalitätsverlust erzielt werden. Die Bestimmungen des Proliferationsindex im statischen 3D Tumormodell ergaben eine Halbierung der Proliferation bei einer Behandlung 0,05 μM Gefitinib. Die höchste Apoptoserate wurde bei 0,1 μM Gefitinib erreicht. Höhere Konzentrationen zeigten hier ebenfalls keinen stärkeren Effekt.

Auch die Dosis-Wirkungs-Untersuchungen von Gefitinib in klinischen Studien ergaben bei einer Behandlung mit höheren Konzentrationen keinen weiteren Effekt auf das Tumorstadium und die Prognose, sondern nur eine Zunahme der Nebenwirkungen [45, 46].

Obwohl das schnelle Wachstum von Zelllinien in 2D Zellkulturen eine zügige Untersuchung von Behandlungserfolgen ermöglicht, entspricht es nicht dem Wachstumsverhalten von Tumoren im menschlichen Organismus und führt zu einem vermehrten Einsatz und einer Überschätzung der Effektivität von antiproliferativ wirkenden Therapien [88]. Dies ist mit den Ergebnissen aus vorliegender Arbeit vereinbar und spricht dafür, dass das statische 3D Lungentumormodell die Gegebenheiten im menschlichen Körper besser imitieren kann als 2D Zellkulturen (weitere Ausführungen zur Eignung des Tumormodells unter 4.3).

In Patienten, die täglich mit 250 mg Gefitinib behandelt wurden, zeigte sich ein recht zügiges Erreichen der *Steady-State* Plasma-Konzentration. Dennoch wurden sehr große inter- und intraindividuelle Schwankungen, mit Talspiegel von Gefitinib zwischen 0,12-4,50 μM , vermerkt [17, 141-143]. Trotz der großen Schwankungsbreite würde beim schnellen Aufbau eines Kumulationsgleichgewichts der IC_{50} -Wert von ca. 0,05 μM Gefitinib, den das statische 3D Lungentumormodell ergeben hat, auch in Phasen geringer Plasmakonzentration erreicht werden.

4.2.2. Zeitliche Wirkung

Die Echtzeitmessungen der Vitalität im statischen 3D Lungentumormodell ergaben einen ersten Vitalitätsabfall nach vier Stunden und einen weiteren zwischen sechs und neun Stunden Behandlung mit Gefitinib. Ein Anstieg der Apoptose war nach 24 Stunden zu beobachten.

Eine erste Herabregulierung einzelner Signalmoleküle durch Gefitinib wurde in *in vitro* Versuchen bereits nach 30 Minuten detektiert [144]. Auch Untersuchungen zur Glukoseaufnahme von Lungentumorzellen mit einer *EGFR*-Mutation zeigten eine Reduktion der Glukoseaufnahme auf <50 % nach nur zweistündiger Behandlung mit Gefitinib [145]. Gefitinib hat dementsprechend einen sehr schnellen Wirkeintritt auf molekularer Ebene, während die Effekte auf zellulärer Ebene im Stundenbereich liegen.

In klinischen Beobachtungen von Patienten unter Gefitinib-Therapie lag die durchschnittliche Zeit bis zum Eintreten von symptomatischen Verbesserungen bei acht Tagen [146, 147]. Erste Effekte auf Organismus-Ebene wurden jedoch bereits wenige Stunden bis Tage nach Therapiebeginn beschrieben und es zeigte sich eine radiologische Reduktion der Tumormasse nach 14 Tagen [146, 148]. Diese schnelle Reduktion der Tumormasse im Patienten wurde vermehrt dem anti-inflammatorischen Potential einer *EGFR*-Inhibition über die Herabregulierung von $\text{TNF-}\alpha$ u.a. zugeschrieben [149], sodass der genaue klinische Zeitpunkt des Wirkeintritts weiterhin unklar ist.

Die komplette Inhibition der Autophosphorylierung des *EGFR* zeigte in Zellkulturen eine anhaltende Wirkung über 24 Stunden [135]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Effekt von Gefitinib auf die *EGFR*-Signalkaskade neun Stunden nach Behandlungsbeginn und eine Persistenz der Wirkung von Gefitinib auf die Apoptose und die *EGFR*-Kaskade über 72 Stunden beobachtet.

In den pharmakodynamischen Untersuchungen von Gefitinib war eine maximale Plasmakonzentration nach drei bis sieben Stunden und eine Eliminationshalbwertszeit von 28-48 Stunden zu detektieren [150]. Es zeigte sich eine sehr schnelle gastrointestinale Aufnahme und ein Anfluten im Blut innerhalb von zwei Stunden nach Gefitinib-Gabe. Gefitinib verteilte sich vornehmlich in Lunge und Leber und wurde innerhalb von zehn Tagen hepatisch eliminiert [151]. Zu beachten ist weiterhin, dass Gefitinib im menschlichen Organismus eine Bioverfügbarkeit von ca. 60 % hat [44], zu 91 % gebunden an Plasmaproteine vorliegt und eine hepatische Metabolisierung durch Cytochrom P450 3A4 und 2D6 erfährt [151, 152]. Diese Einflüsse auf die Pharmakodynamik und die Pharmakokinetik von Gefitinib können im vorliegenden 3D Lungentumormodell nicht imitiert werden.

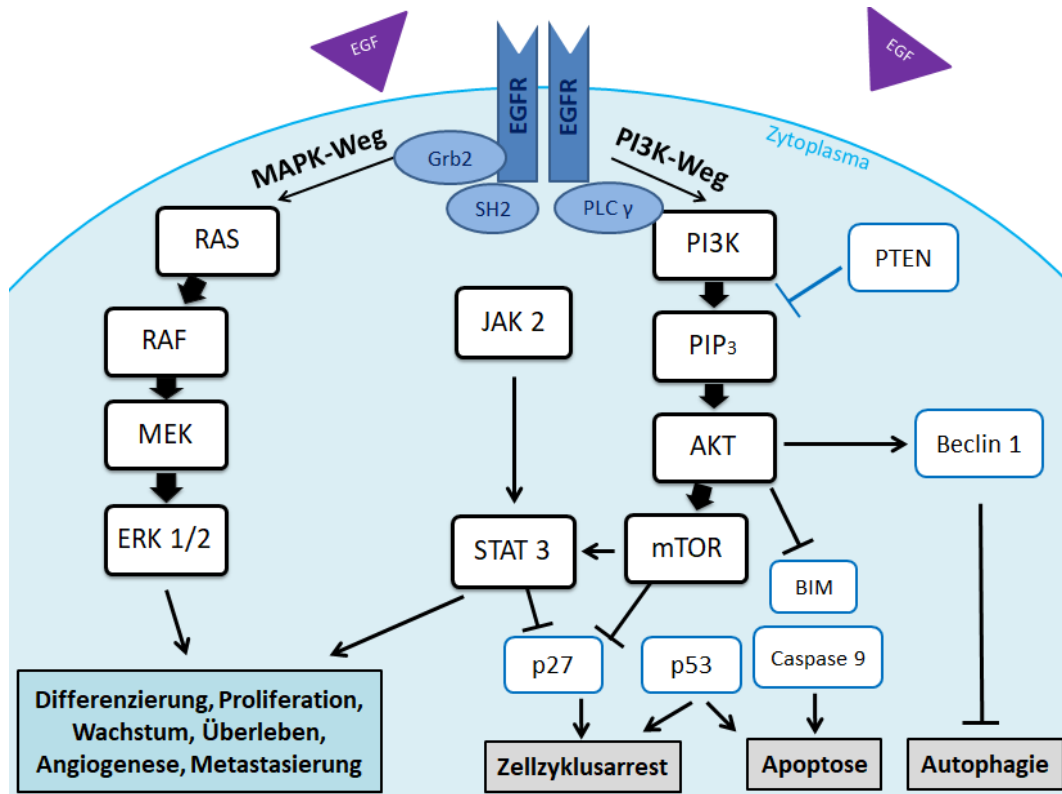
Aufgrund der klinischen Beobachtungen und der vorliegenden Ergebnisse zum Wirkeintritt von Gefitinib kann dennoch von einer ausreichend langen Bioverfügbarkeit von Gefitinib über den Wirkzeitraum ausgegangen werden. Auch die einmal tägliche Gabe von Gefitinib ist demnach suffizient.

4.2.3. Die EGFR-Signalkaskade

Gefitinib ist ein reversibler, kompetitiver Inhibitor der ATP-Bindungsstelle des EGFR. Die autonome Aktivität der mutierten EGFR wird durch Gefitinib gehemmt und die nachfolgenden Signalkaskaden unterbrochen. Aus Gründen der Übersicht, nachfolgend eine erneute Darstellung der Abbildung 1.

4.2.3.1. Einflüsse auf die EGFR-Familie

Die Untersuchung des EGFR in den statisch und dynamisch kultivierten HCC827-Zellen ergab eine hohe Grundaktivität, die, wie zu erwarten, nach einer Behandlung mit Gefitinib konzentrationsabhängig stark abfiel. Eine geringe Restaktivität des Rezeptors war jedoch auch bei Gefitinib-Konzentrationen von 1 μM zu detektieren. Wie auch in anderen Untersuchungen zur Wirkung von EGFR-TKIs beschrieben ist [153], blieb die quantitative Expression des Rezeptors von der Behandlung mit Gefitinib unbeeinflusst.



AKT	Protein Kinase B	p27	Protein 27/CDK-Inhibitor 1B
BIM	Bcl-2 interagierender Zelltodmediator	p53	Protein 53
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor	PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor	PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
ERK 1/2	Extrazellulär-Signal regulierte Kinase 1/2	PLC γ	Phospholipase C γ
Grb2	Wachstumsfaktorgebundenes Protein 2	PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
JAK 2	Janus Kinase 2	RAF	Rapid-Akzeleriertes Fibrosarkom
MAPK	Mitogen-Aktivierte Protein Kinase	RAS	Ratten Sarkom
MEK	Mitogen-Aktivierte Protein Kinase Kinase	SH2	SRC Homolog 2 Domäne
mTOR	mechanisches Zielmolekül von Rapamycin	STAT 3	Signaltransduktor und Transkriptionsaktivator 3

Abbildung 1: Übersicht über die EGFR-Signalkaskade. Es werden der MAPK-Weg und der PI3K-Weg unterschieden. Onkogene und wachstumsfördernde Prozesse sind in dem blau hinterlegten Kasten aufgelistet, während die das Wachstum kontrollierenden Prozesse in den grau hinterlegten Kästen dargestellt sind. Bildquelle: modifiziert nach [19, 35] (19: mit freundlicher Genehmigung von Elsevier; 35: *Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License*).

Weitere Rezeptoren der EGFR-Familie wie HER-2 und HER-3 zeigten eine geringere Aktivität in den HCC827-Zellen als der EGFR, sprachen aber ebenfalls auf eine Behandlung mit bereits 0,05 μM Gefitinib an. Gefitinib bindet sehr spezifisch an den mutierten EGFR mit einem IC_{50} -Wert von 0,2-0,033 μM im Gegensatz zu HER-2 mit einem IC_{50} -Wert von $>3,7 \mu\text{M}$ [144, 154].

Wurde die Gefitinib-Wirkung auf das Wachstum von Tumorzellen mit sowohl einer EGFR als auch einer HER-2-Expression untersucht, zeigte sich unerwartet dennoch eine große Sensibilität der Zellen mit einem IC_{50} -Wert von nur 0,8-2 μM und einer verminderten HER-2-Aktivität [144, 154, 155]. Auch eine Reduktion der HER-3-Aktivität durch Gefitinib ist vorbeschrieben [154]. Einen Erklärungsansatz, der diese Beobachtungen vereint, liefert Normanno et al. in der Bildung von Heterodimeren aus Rezeptoren der HER-Familie. Durch die Behandlung mit Gefitinib kommt es zur Dimerisierung von inhibierten EGFR mit HER-2 oder HER-3. Die Rezeptoren werden nicht phosphoryliert und sind dadurch in einer inaktiven Form gebunden [156].

4.2.3.2. Einfluss auf die *Downstream*-Signalwege

In Versuchen zur Pharmakokinetik von Gefitinib zeigte sich *in vitro* eine Inhibition der EGFR-Tyrosin-Kinase bereits ab Gefitinib-Konzentrationen von 0,015-0,2 μM [135, 157, 158], doch Konzentrationen, die zu einer Inhibition des EGFR führen, müssen nicht zwingend Auswirkungen auf die weiterführenden Signalkaskaden haben [159]. Nach der Dimerisation der Rezeptoren können zwei Hauptsignalwege aktiviert werden: der MAPK/ERK-Weg und die PI3K/AKT-Kaskade [30].

Im statischen Tumormodell hat sich in der vorliegenden Arbeit eine konstante Menge an ERK 1/2 und AKT unabhängig von der Gefitinib-Konzentration gezeigt. Die Menge an phosphorylierten ERK 1/2 und AKT hingegen fiel bereits ab Konzentrationen von 0,05 μM Gefitinib ab. Dies bestätigt frühere Versuche mit *EGFR*-mutierten Lungenkarzinomzellen, in denen eine Inhibition der Aktivität sowohl von ERK 1/2 als auch von AKT durch Gefitinib nachweisbar war [31, 138, 140]. Die jeweilige Gesamtproteinexpression blieb ebenfalls von einer Behandlung mit Gefitinib unbeeinflusst [160].

Der Transkriptionsfaktor CREB, der unter anderem von ERK 1/2 aktiviert wird, zeigte im statischen Lungentumormodell eine geringe Aktivität, die unter Gefitinib-Behandlung abfiel und somit die finalen Effekte von Gefitinib im Zellkern widerspiegelt. Einflüsse auf den Zyklin-Abhängige-Kinase (CDK)-Inhibitor p27 oder STAT 3, als Beispiele anderer von ERK 1/2 oder AKT

beeinflusster Moleküle, konnten in präklinischen und klinischen Untersuchungen beobachtet werden. Die beobachteten Einflüsse zeigten aber keine eindeutige Dosis-Abhängigkeit [153, 161, 162]. Eine richtungsweisende Aktivität von STAT3 in den 3D-kultivierten HCC827 Zellen nach Gefitinib-Gabe war auch in vorliegender Arbeit nicht zu verzeichnen. STAT3 kann zu einer Herabregulierung von p53 führen und dadurch eine Kontrolle von Zellzyklus und Zellproliferation umgehen [33]. Auf die Beobachtungen zu p53 wird unter 4.2.4 ausführlich eingegangen.

Weitere Signalproteine der EGFR-Kaskade wie mTOR, die Phospholipase Cy (PLCy) und c-Jun, zeigten in den durchgeführten Arrays der statischen Tumormodelle keine nachweisbare Phosphorylierung, was an der Sensitivität der Arrays liegen könnte.

In den Arrays zeigte sich eine Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase WNK 1 und von HSP60, die nicht eindeutig Teil der EGFR-Signalkaskade sind.

WNK 1 ist eine Kinase, die vor allem in der Elektrolyt-Homöostase und der Blutdruckregulation eine große Rolle spielt und in fast allen Geweben exprimiert wird [163]. Die in vorliegender Arbeit in den statischen 3D Lungentumormodellen gemessene WNK 1 Aktivität in den HCC827-Zellen wurde durch Behandlung mit Gefitinib vermindert.

Dieser Gefitinib-abhängige Aktivitätsverlust könnte durch mögliche Mitogen-Aktivierte-Protein-Kinase-Kinase-Kinase (MAP4K)-Aktivität von WNK 1, die über EGF reguliert wird [163], erklärt werden.

HSP 60 war in allen Arrays der behandelten und unbehandelten statischen 3D Lungentumormodelle aktiv. HSP 60 ist ein mitochondriales Protein, das die Faltung und den Transport von Proteinen unterstützt, aber auch in der Stressregulation, im Zellwachstum und der Differenzierung eine Rolle spielt und in vielen Tumoren vermehrt exprimiert wird [164]. Die Expression von HSP 60 ist mit einer besseren Prognose in Urothelkarzinomen und mit einer schlechteren Prognose im Ovarialkarzinom assoziiert [165, 166]. Der Einfluss auf das pulmonale Adenokarzinom ist nicht bekannt. Eine Aktivierung von ERK 1/2 durch HSP60 und eine daraus resultierende Zell-Proliferation sind vorbeschrieben [167].

Gefitinib zeigte im vorliegenden Lungentumormodell keinen Einfluss auf die HSP60-Aktivierung. HSPs können Cluster der Differenzierung 4 und 8 positive (CD4⁺ und CD8⁺) T-Zellen aktivieren, indem sie tumorassoziierte Antigene binden und diese den Antigen-Präsentierenden-Zellen (APCs) zeigen. Anti-Tumor-Impfstoffe, die sich diese Eigenschaft von HSP60 zu Nutze machen, sind das Ziel aktueller Forschung [168].

Zusammenfassend lässt sich im statischen 3D Lungentumormodell, ähnlich wie in präklinischen und klinischen Wirksamkeits-Untersuchungen, ein großer Einfluss von Gefitinib auf den EGFR sowie auf die Repräsentanten ERK 1/2 und AKT der zwei Hauptsignalwege beobachten. Aufgrund der großen Fehleranfälligkeit und Ungenauigkeit in der Auswertung der Arrays können in der vorliegenden Arbeit nur beobachtende Veränderungen in den Signalkaskaden beschrieben werden. Detaillierte und quantitative Untersuchungen wären beispielsweise mithilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) möglich.

4.2.4. Zellzyklusarrest oder Apoptose?

Forcella et al. postulierten, dass die Gefitinib-Wirkung überwiegend über eine Inhibition der Zell-Proliferation durch einen Zellzyklusarrest zu erklären sei, da der EGFR vornehmlich Proliferations-Signalwege beeinflusst. Eine Zunahme des programmierten Zelltodes mit ansteigenden Gefitinib-Konzentrationen konnte ebenfalls beobachtet werden [30, 140, 169].

Die Bestimmung des Proliferationsindex im statischen 3D Tumormodell ergab eine starke Reduktion der Proliferation durch Gefitinib mit Anstieg der Apoptoserate. Dieser Anstieg der Apoptose auf das Drei-bis Vierfache des Ausgangswertes bestätigt vorbeschriebene Erkenntnisse [35, 138, 158]. Im dynamischen 3D Lungentumormodell zeigte sich ebenfalls eine Abnahme der Proliferation, aber keine eindeutige Zunahme der Apoptose nach einer Behandlung mit 1 μ M Gefitinib. Für weitere Ausführungen bezüglich der Apoptose im dynamischen Tumormodell siehe 4.4.2.

Der Tumorsuppressor p53 ist zuständig für die Regulierung von Zellproliferation und Differenzierung und soll im Nachfolgenden genauer betrachtet werden.

Die Aktivierung von p53 über eine post-translationale Phosphorylierung oder Acetylierung von Aminosäuren führt unter anderem zu Zellzyklusarrest und Apoptose der Zellen [170, 171]. Weisen Zellen DNA-Schäden auf, wie sie beispielsweise durch eine erhöhte Proliferation entstehen, oder sind vermehrtem Stress ausgesetzt, so wird der Zellzyklus durch p53 unterbrochen und die Zelle dem programmierten Zelltod zugeführt [172]. Ein Triggerfaktor von p53 ist dabei unter anderem die überschießende Aktivität von RAS [172, 173]. In den Lungentumorzellen zeigte sich eine Aktivität von p53, was an einer Aktivierung durch RAS über den EGFR oder an vorliegenden DNA-Schäden liegen könnte. Die durch Gefitinib induzierte Zunahme der Apoptoserate und der Abfall der Proliferation zeigten überraschenderweise weder im statisch noch im dynamisch kultivierten Lungentumormodell einen begleitenden Anstieg der p53-Phosphorylierung. Nach 72 Stunden war eher eine Abnahme der Phosphorylierung von p53 zu detektieren.

Zu differenzieren ist zunächst der Einfluss der unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen von p53 auf die wachstumsregulierenden Prozesse. In vorliegender Arbeit konnten mithilfe des pK-Arrays drei Phosphorylierungsstellen, die Serine S15, S46 und S392, untersucht werden.

Für S15 konnten in keinem der Ansätze Phosphorylierungen detektiert werden. Eine Phosphorylierung von S15 würde zu einer reduzierten Inhibition und somit einer Aktivierung von p53 führen [174] und ist in Zellen, die eine Apoptose durchlaufen, sowie in Zellen, die nur einen Zellzyklusarrest erfahren, vergleichbar [175].

Eine Phosphorylierung von S46 zeigte sich besonders in Zellen während der Apoptose [175, 176]. Eine Phosphorylierung von S392 hingegen ist mit einer vermehrten Expression des Proliferationsmarker Ki67 assoziiert, die in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus sowie in Urothelkarzinomen eine Progression des Tumors begünstigt und eher für eine Aufhebung des Zellzyklusarrest spricht [177, 178].

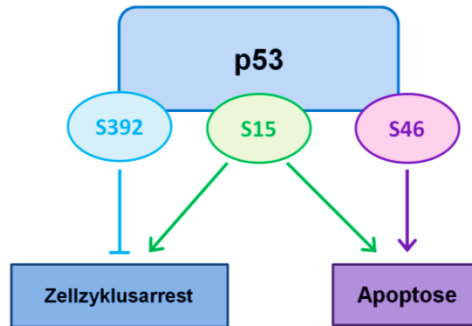


Abbildung 23: Vereinfachter Überblick über die Phosphorylierungsstellen S15, S46 und S392 von p53. S15 führt zu einer Zunahme von Apoptose und Zellzyklusarrest in gleichen Maßen. S392 ist mit einer Zunahme des Proliferationsmarkers Ki67 assoziiert, welches die Hemmung des Zellzyklusarrest vermuten lässt. Eine Phosphorylierung von S46 führt zur Zunahme der Apoptose. Eigene Darstellung inhaltlich basierend auf [174-178]

Die beobachtete verminderte Proliferation nach Gefitinib-Behandlung in den statischen und dynamischen Tumormodellen kann durch eine verminderte S392-Phosphorylierung der HCC827-Zellen bedingt sein. Die geringere S46-Phosphorylierung müsste hingegen zu einer geringeren Apoptoserate führen. Dies war jedoch in keinem der Ansätze zu beobachten. Die Phosphorylierung von S392 präsentierte sich stärker detektierbar als die Phosphorylierung von S46, sodass der Effekt von Erstgenanntem zu überwiegen scheint.

Insgesamt war kein eindeutiger Effekt der Gefitinib-Behandlung auf die jeweiligen Phosphorylierungsstellen zu detektieren. Eine Apoptose-Induktion und eine Hemmung der Proliferation über andere Signalmoleküle sind demnach zu vermuten.

Der antiproliferative Effekt einer EGFR-Inhibition lässt sich alternativ durch einen Zellzyklusarrest in der ersten Lücken-Phase (*Gap 1*, G_1) durch eine wegfallende Hemmung von p27 und p21 über den PI3K/AKT-Weg und daraus resultierender Inhibition der CDK2-Aktivität erklären (Abbildung 23) [161, 179-181]. Signalproteine wie mTOR aus dem PI3K/AKT-Weg kontrollieren die Zellzyklus-Progression von der G_1 - zur Synthese-(S-)-Phase abhängig von Nährstoff- und Energie-Angebot [182]. Wurden Zellen mit einem MEK 1 Inhibitor behandelt, so zeigte dies keinen Zellzyklusarrest, während eine Inhibition der PI3K zu einer Hochregulation von p27 und einem Verbleiben in der G_1 -Phase führte [161].

In vorangegangenen Untersuchungen befanden sich 90 % aller Lungentumorzellen zwei Tage nach Behandlungsbeginn mit Gefitinib in einem Zellzyklusarrest in G₁ [145].

Der zusätzlich beobachtete apoptotische Effekt von EGFR-TKIs muss somit in einem weiteren Mechanismus begründet liegen. Zellen mit einer aktivierenden *EGFR*-Mutation empfangen über den PI3K/AKT- und STAT-Weg kontinuierlich anti-apoptotische Signale, von denen sie überlebensabhängig sind („*oncogene addiction*“) [30, 36]. Durch eine Inhibition des EGFR durch Gefitinib entfällt die hemmende Wirkung von ERK 1/2 und AKT auf pro-apoptotische Proteine wie Caspase 9 und BIM, die Proteinexpression wird gesteigert und es kommt zum programmierten Zelltod (Abbildung 23) [68, 180].

Neben dem Zellzyklusarrest und der Apoptose ist auch eine Autophagie der Zellen durch die Inhibition des EGFR bekannt [183]. Dieser Selbstverdau stellt eine Reaktion auf Stressfaktoren, den Entzug von Wachstumsfaktoren oder Hypoxie dar und führt zum lysosomalen Abbau der Zellorganellen [184]. Eine Inhibition durch Gefitinib führt zu einem Wegfall der Autophagie-Inhibition über AKT/mTOR und Beclin-1 und es kommt zu einem Selbstverdau der Tumorzelle (Abbildung 23) [183, 185]. Untersuchungen zur Autophagie sind in dieser Arbeit nicht durchgeführt worden.

Zusammenfassend hat sich bestätigt, dass das Erfolgsprinzip von einer effektiven Tumorthherapie nicht darin liegt, dass diese nur Einfluss auf einzelne Signalmoleküle und Signalwege hat, sondern dass sie in ganze Netzwerke eingreift und ein breitgefächertes Wirkspektrum aufweist [186, 187].

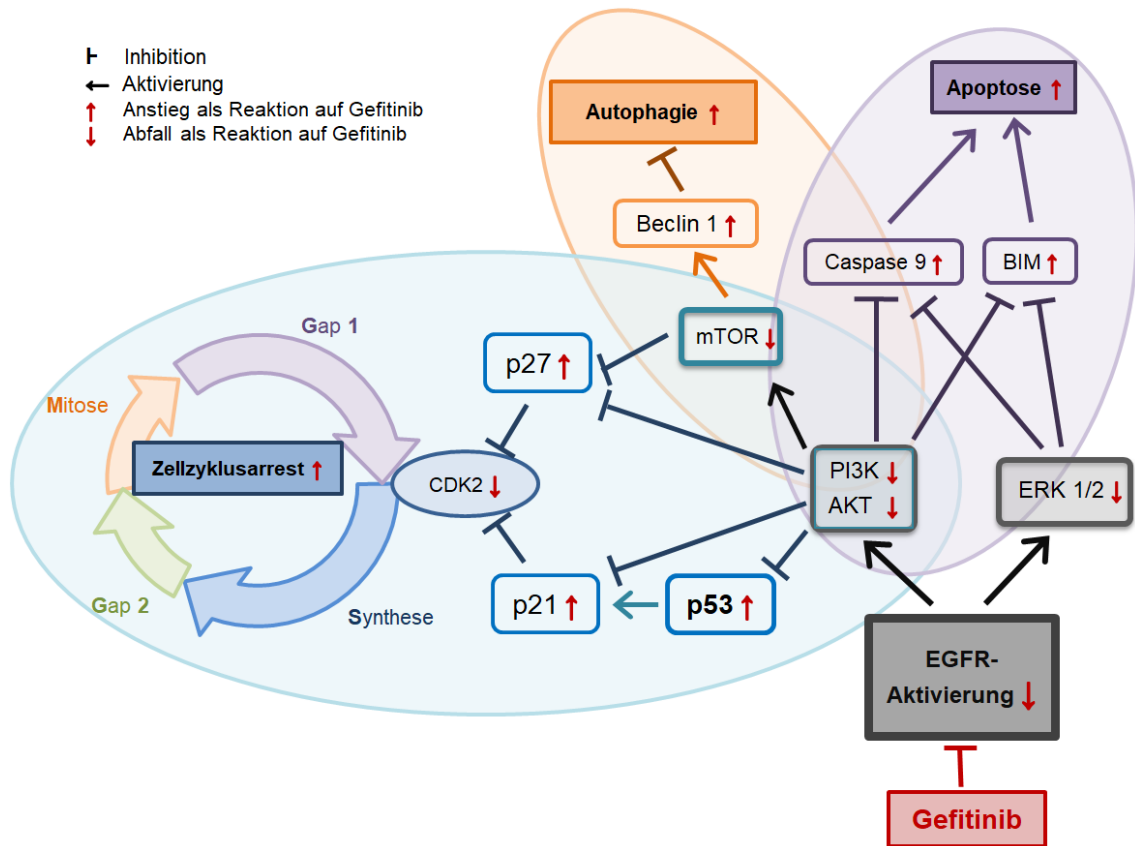


Abbildung 24: Darstellung des Einflusses von Gefitinib auf den Zellzyklusarrest, die Apoptose und die Autophagie. Die EGFR-Inhibition durch Gefitinib führt über ein vielschichtiges Netzwerk an Molekülen zu einer Hochregulierung von p27 und p21, welches einen Zellzyklusarrest in der G₁-Phase bewirkt (blau unterlegter Bereich). Über den PI3K/AKT-Weg und Beclin 1 wird eine Autophagie der Zelle in die Wege geleitet (orange unterlegter Bereich). Durch einen Wegfall überlebenswichtiger anti-apoptotischer Signale über ERK 1/2 und AKT kommt es zur Apoptose der Zelle (lila unterlegter Bereich). Eigene Darstellung inhaltlich basierend auf [68, 179-185, 188].

4.3. Eignung des Lungentumormodells

Die einfache Handhabung, das schnelle Wachstum und die gute Reproduktion von Ergebnissen in der Arbeit mit Tumorzelllinien stellen große Vorteile in der Erforschung von neuen Therapien und deren Effektivität dar [88]. Wie auch unter 4.2.1 dargestellt, führt ihre Anwendung in der 2D Zellkultur jedoch zu einer Überschätzung des Zellwachstums und des Behandlungserfolges [88], denn wie Smalley im Titel seines Reviews schreibt: „*Life isn't flat*“ [93]. In 2D Zellkulturen kann es beispielsweise zu einem gesteigerten Wachstum aufgrund einer Stimulation durch im Serum enthaltene Wachstumsfaktoren und einer Adhärenz an das Plastik kommen [189, 190]. Tumorzelllinien in 3D Tumormodellen hingegen zeigen ein langsames, mehr den *in vivo* Bedingungen entsprechendes, Zellwachstum [90]. Miller et al. beobachteten bereits eine verminderte Wirksamkeit von Medikamenten in 3D Sphäroid-Kulturen im Vergleich zu 2D Zellkulturen [191]. Außerdem ist bekannt, dass die direkte Umgebung des Tumors zu dessen Progression beiträgt [10, 92]. Zelldifferenzierung, Zellinteraktionen und Signalkaskaden werden von Zell-Zell-Kontakten und Zell-EZM-Interaktionen beeinflusst [91, 106]. Die Untersuchung von Tumorzelllinien im humanen Tumormodell stellt die Möglichkeit dar, *in vivo* bestehende 3D Gegebenheiten und Zell-EZM-Interaktionen zu simulieren, Tumoreigenschaften zu ergründen und neue Therapieoptionen zu entwickeln.

4.3.1. Wachstumseigenschaften

Für den Aufbau des 3D Lungentumormodells wurde die biologische Matrix SISmuc (*Small Intestine Submucosa with mucosa*), eine avaskularisierte Variante der BioVaSc[®] (*Biological Vascularised Scaffold*), gewählt [115, 119]. Dabei handelt es sich um die azellularisierte Darmwand von porcinem Dünndarm mit intakter Basalmembran und Epithelstruktur, eine Trägerstruktur, die optimale Wachstumsbedingungen für die Lungenkarzinom-Zelllinie gezeigt hat [35, 119]. Die in dieser Arbeit verwendete humane Krebszelllinie HCC827 ist eine Adenokarzinom-Zelllinie. Bei den Adenokarzinomen handelt es sich um maligne Neubildungen, ausgehend von epithelialen Strukturen.

Die Zotten und Krypten der SISmuc ermöglichen zum einen ein dreidimensionales Wachstum der Tumorzellen und eine Ausdifferenzierung mit der Bildung von komplexen epithelialen Strukturen und zum anderen Beobachtungen von Invasions- oder Metastasierungsvorgängen aufgrund der Polarität des Modells mit einer Basalmembran und einer „Ober-“ und „Unterfläche“ [35, 119]. Epithelzellen zeigen eine charakteristische Polarität, wachsen als einheitlicher Monolayer auf einer Basalmembran und sind über verschiedene Zell-Zell-Kontakte fest miteinander verbunden.

Die HCC827-Zellen zeigten auch im statischen 3D Lungentumormodell ein Wachstum als durchgängiger Monolayer, der bis in die Krypten hinabreichte.

Um ansatzweise physiologische Bedingungen im Organismus zu imitieren, wurde die besiedelte SISmuc vergleichend in einen Fluss-Bioreaktor eingespannt und dynamisch kultiviert.

Das dynamische 3D Lungentumormodell wies im Gegensatz zum statisch kultivierten 3D Lungentumormodell eine höhere Zellzahl, ein mehrschichtiges Wachstum und eine die Krypten ausfüllende Besiedelung auf. Dies lässt sich durch das konstante Angebot von Nährstoffen und Sauerstoff aus dem vorbeiströmenden Nährmedium und dem sofortigen Abtransport von Abfallstoffen im Bioreaktor erklären. Eine Wachstumszunahme unter der direkten Perfusion durch einen Bioreaktor wurde beispielsweise auch in Keratinozyten [192] und Osteozyten [193] beobachtet.

Die Therapie mit Gefitinib im statischen 3D Lungentumormodell resultierte in einer zunehmend lückenhaften Besiedelung der SISmuc Oberfläche und zellfreien Krypten. Im dynamischen 3D Lungentumormodell zeigte sich ebenfalls eine starke Abnahme der Zellquantität und der Besiedelungsdichte. Ein dünner durchgängiger Monolayer und ein geringes Wachstum in den Krypten blieben allerdings erhalten. Die erhaltene Besiedelung der Krypten könnte durch die von Scherkräften geschützte Lage im Vergleich zu der SISmuc-Oberfläche zu erklären sein.

Eine Invasion der Tumorzellen von der SISmuc-Oberfläche in die Matrix als erster Schritt einer beginnenden Metastasierung [10, 92] war weder im statischen noch im dynamischen Modell zu beobachten.

Ursächlich hierfür könnten der begrenzte Beobachtungszeitraum oder im Modell nicht berücksichtigte Invasion-induzierende Faktoren der umgebenden Gewebe sein.

4.3.2. Proliferation

Der Proliferationsindex nach 14 Tagen war in den statisch und in den dynamisch kultivierten unbehandelten Modellen gleich. Da im unbehandelten dynamischen 3D Lungentumormodell insgesamt ein stärkeres Zellwachstum zu beobachten war als im statisch kultivierten Modell, kann davon ausgegangen werden, dass die Proliferation im Erstgenanntem zu einem früheren Zeitpunkt größer gewesen sein muss. Dafür wären vergleichende Proliferationsbestimmungen innerhalb des 14-tägigen Kultivierungszeitraums weiterführend. Bekannt ist, dass Zellen durch den Nährmediennfluss im dynamischen Modell einer konstanten Scherspannung ausgesetzt sind. Ist diese sehr stark, kann es zu Zellschäden kommen [122, 194-196]. Besonders in Epithelzellen hingegen zeigt sich darunter auch ein vermehrter Übergang von Zellen aus der G_0 - und G_1 -Phase in die S-, G_2 - und Mitose (M)-Phasen [122], was für eine vermehrte Proliferation spricht.

In der Literatur zu 3D Sphäroid-Kulturen, als alternative Kultivierungsmethode von 3D-Strukturen, war auffällig, dass es zu einer verminderten Proliferation bis hin zur Nekrose im Zentrum der Strukturen kommen kann, da dort das Nährstoffangebot geringer ist als an der Oberfläche [90, 133]. Dies ist auch in schnellwachsenden soliden Tumoren *in vivo* der Fall, wenn die Angiogenese nicht mit dem Wachstum mithalten kann [197]. Ein Abfall der Proliferation in den zentralen Bereichen der mehrschichtig wachsenden Zellen im dynamischen 3D Lungentumormodell war jedoch nicht zu beobachten. Eine ausreichende Versorgung aller Zellen mit Nährstoffen im Modell liegt somit nahe, entspricht jedoch nicht zwingend den *in vivo* Bedingungen.

Unter der Therapie mit Gefitinib zeigte sich im statischen 3D Lungentumormodell ein Abfall der Proliferation bis auf 10 %, während sie im dynamischen Modell bis auf unter 5 % abfiel.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass durch den kontinuierlichen Fluss des Nährmediums, und somit auch des Gefitinibs, immer wieder frisches Gefitinib zu den Tumorzellen transportiert wird. Dies führt aufgrund des kontinuierlichen Nachschubs des Medikaments zu einer ständigen hohen Konkurrenz des Gefitinibs um die ATP-Bindungsstelle und dadurch zu einer stärkeren Inhibition des Wachstumsrezeptors als in den statischen Modellen.

4.3.3. Zelldifferenzierung und Markerexpression

Neben den positiven Effekten auf die Proliferation können die linearen Scherkräfte im dynamischen Tumormodell zu einer Differenzierung und vermehrten epithelialen Markerexpression in Epithelzellen führen [122, 194-196].

Mucine sind Proteine, die Einflüsse auf intrazelluläre Signalkaskaden nehmen und in Lungenkarzinomen unterschiedlich exprimiert werden [198, 199]. Während Mucin-1 vornehmlich auf der apikalen Seite von gesunden Epithelzellen und differenzierten Adenokarzinom-Zellen exprimiert wird, wandert es im Verlauf der Entdifferenzierung eher an eine basolaterale bzw. zytoplasmatische Lokalisation [200, 201]. Mucin-1 interagiert mit dem EGFR und hat Einflüsse auf β -Catenin und den MAPK/ERK-Weg [199, 202, 203]. Außerdem zeigen sich Einflüsse auf die Invasivität und Migration von Tumorzellen durch die anti-adhäsiven Eigenschaften von Mucin-1 [199]. Mucin-1 gilt als Polarisationsmarker und die apikale Lokalisation der den oberen Epithelzellen aufliegende Mucin-1 Schicht in den statisch und dynamisch kultivierten Tumormodellen spricht für eine gute Differenzierung der Zellen.

Bei E-Cadherin handelt es sich um ein Calcium-abhängiges Zell-Zell-Adhäsions-Protein, das in epithelialen Geweben, u.a. auch in Epithelzellen der Lungenalveolen und in NSCLC, vorkommt und mit β -Catenin verbunden ist [204].

Pan-Cytokeratine sind Keratinproteine, die sich im Zytoskelett von Epithelzellen finden, während Vimentin ein Intermediärfilament von mesenchymalen Zellen ist und sich in den der SISmuc-Oberfläche anliegenden Zellen im dynamischen 3D Lungentumormodell stärker exprimiert zeigte, als im statischen Modell.

Dies könnte jedoch ein rein optischer Eindruck sein und an der dichteren Besiedelung der Krypten liegen.

Eine Expression der epithelialen Marker Mucin-1, E-Cadherin, β -Catenin und pan-Cytokeratin zeigte sich jedoch in den vorliegenden Modellen bereits unter statischen Bedingungen, was für eine grundlegende epitheliale Differenzierung der HCC827-Zellen spricht. Auch die dynamische Kultivierung im Vergleich zur statischen führte zu keiner weiteren Expression epithelialer Marker. Dies ist eine Bestätigung früherer Untersuchungen [116].

Nach der Behandlung mit Gefitinib zeigte sich zwar in allen Ansätzen und Modellen eine Reduktion der epithelialen Marker-Expression, nicht jedoch eine Lokalisationsänderung, die für eine Entdifferenzierung sprechen würde. Pan-Cytokeratin blieb vor allem in den Krypten nachweisbar, wobei auch hier noch die meisten Zellen vorzufinden waren. Vimentin als mesenchymaler Marker zeigte keinen Unterschied in der Expression mit und ohne Gefitinib-Therapie.

4.4. Entwicklung von Resistenzen

Die Entwicklung von Resistenzen stellt in der klinischen Anwendung von Gefitinib ein großes Problem dar [55-57]. Die Eigenschaften der Gefitinib-sensiblen Zelllinie HCC827 wurden mit denen einer Gefitinib-resistenten Subpopulation HCCres A2 im dynamischen 3D Lungentumormodell verglichen und es wurde zudem eine neue Subpopulation HCCres A5 generiert. Im Folgenden werden anhand der resistenten Subpopulationen die drei Hauptmechanismen der erworbenen Resistenzbildung betrachtet:

- I. Veränderung des EGFR
- II. Aktivierung alternativer Signalkaskaden
- III. Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) oder Transformation in SCLC

4.4.1. Generierung resistenter Zellen

Die Erforschung der Resistenzentwicklung basiert meist auf der Untersuchung von Re-Biopsien nach Krankheitsprogress. Dies ist jedoch durch kleine Gewebeproben limitiert, erlaubt nur eine rein retrospektive Beobachtung [62] und beinhaltet einen erneuten operativen Eingriff für den Patienten. Durch die Generierung von resistenten Tumorzelllinien können neue Erkenntnisse gewonnen werden. Dabei stellt das graduelle Erhöhen der Medikamenten-Konzentration im Nährmedium eine Methode der Resistenzbildung dar [205-208]. Ausgehend von einer Gefitinib-Konzentration des IC_{50} -Wertes waren vollständig resistente Zellen nach vier bis sechs Monaten zu beobachten [205, 207-209]. Ein alternativer Ansatz ist eine Medikamenten-Exposition der Zellen in sehr hohen Dosen [209, 210]. Es zeigte sich eine Gefitinib-Resistenz nach sechs Monaten mit einem IC_{50} -Wert von $>5 \mu\text{M}$. Je nach verwendeter Methode zeigten sich große Unterschiede in den jeweiligen Mechanismen der entwickelten Resistenzen [210]. Während HCC827-Zellen durch das schrittweise Anheben der Gefitinib-Konzentration häufiger eine MET-Amplifikation aufwiesen, hat sich in HCC827-Zellen, die hohen Gefitinib-Dosen ausgesetzt waren, meist eine EMT gezeigt [209].

Für die Generierung einer neuen resistenten Zelllinie wurde die Hochdosis-Gefitinib-Exposition gewählt, um möglichst klinische Bedingungen zu imitieren. Wie bereits erwähnt weist Gefitinib zwar zwischen Patienten sehr variable Plasmakonzentrationen auf, doch auch in der Klinik wird die Therapie nicht eingeschlichen und bereits nach wenigen Tagen zeigt sich eine *steady state* Plasma-Konzentration [141].

Nach 40-tägiger Behandlung der Tumorzelllinie HCC827 mit 1 μM zeigten sich Zellen mit Spindelzell-förmiger Morphologie und einem reduzierten Ansprechen auf Gefitinib. Dies unterstützt oben genannte Erkenntnisse von Shien et al. [209]. Weiterführende Untersuchungen der Markerexpression, der Signalwege und der Eigenschaften im 3D Lungentumormodell zur genauen Identifikation des Resistenzmechanismus wären von Interesse.

In klinischen Studien zeigte sich ein Krankheitsprogress aufgrund von Resistenzbildung bereits nach 9-13 Monaten [55-57]. Die beginnende *in vitro* - Selektion von resistenten Zellen nach 40 Tagen anstatt von sechs Monaten hätte demnach einen zeitlichen Gewinn darstellen können, um bestehende Therapien anzupassen und spezifischen Resistenzen entgegen zu wirken. Eine vollständige Resistenz der HCCres A5-Zellen gegen Gefitinib (5 μM) war in vorliegenden Untersuchungen jedoch nicht induzierbar. Eine längere Behandlung ist demnach möglicherweise erforderlich.

Tumore im menschlichen Körper bestehen nicht aus identischen Zellen eines Klons, sodass es unter der Therapie neben der Entwicklung von Resistenzen auch zur Selektion von primär resistenten Zellen kommen kann [8]. Um spezifische Therapieregime für einzelne Patienten im Rahmen der personalisierten Medizin zu erstellen, wäre die Generierung von resistenten Tumormodellen aus primärem Tumorgewebe ein zusätzlich vielversprechender Ansatz.

4.4.2. Veränderung des EGFR

Der in der Klinik am häufigsten beobachtete Mechanismus der Resistenzbildung ist die T790M Mutation, die zu einer verminderten Inhibition des EGFR durch Gefitinib führt [67].

Die Untersuchung der EGFR-Aktivität in den HCC827-Zellen und in den HCCres A2-Zellen in vorliegender Arbeit mit Hilfe des pRTK-Arrays ergab eine sehr hohe Aktivität des EGFR in beiden Zellpopulationen, die durch eine Behandlung mit Gefitinib jeweils stark abfiel. Der EGFR zeigt demnach auch in der resistenten Zelllinie weiterhin eine Sensibilität für Gefitinib, sodass eine Resistenzbildung aufgrund einer T790M Mutation unwahrscheinlich erscheint.

Die T790M Mutation kann über das pro-apoptotische Protein BIM die Apoptose blockieren [68]. Der Vergleich von HCC827-Zellen und HCCres A2-Zellen zeigte einen minimalen Anstieg der Apoptoserate in den Gefitinib-sensiblen HCC827-Zellen, jedoch keinen relevanten Unterschied in den Gefitinib-resistenten HCCres A2-Zellen. Ursächlich für diese Unterschiede zwischen den Zelllinien könnte die Blockade der Apoptose über BIM in den HCCres A2 sein. Ein anderer Grund könnte sein, dass die Apoptoserate bei den HCCres A2-Zellen mit dem M30-ELISA nicht vollständig erfasst wurde: Der M30-ELISA misst die Apoptoserate über das für Epithelzellen spezifische cck18(2.2.5). Bei einer möglichen, geringeren Differenzierungsrate der resistenten Zellen wäre der M30-ELISA nicht sensitiv genug.

Doch diese Überlegungen und Beobachtungen geben keine absolute Sicherheit für das (Nicht-)Vorliegen der Mutation in den untersuchten HCCres A2-Zellen. Ursprüngliche Untersuchungen gehen davon aus, dass die T790M Mutation eine rein erworbene Mutation ist und nur in wenigen Zellklonen primär exprimiert wird [211]. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Resistenz-vermittelnde T790M Mutation bereits vor Behandlungsbeginn in etwa 80 % der Tumorbiospien in geringen Mengen vorliegt und mit einem kürzeren progressionsfreien Überleben zusammenhängt [212]. Die Selektion dieser Zellen durch EGFR-TKIs kann möglicherweise durch eine zusätzliche Behandlung mit vaskulär endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF)-Inhibitoren verhindert werden, da sich eine vermehrte VEGF-Expression in besagten Zellen gezeigt hatte [212, 213]. Eine Therapie mit irreversiblen EGFR-TKIs, die mit einer kovalenten Bindung die ATP-Bindungsstelle besetzen, zeigte einige positive Effekte [63, 66, 214, 215]. EGFR-TKIs die die T790M Mutation direkt angreifen, werden als mögliche Therapieoption untersucht [216].

4.4.3. Aktivierung alternativer Signalkaskaden

Da in den resistenten HCCres A2-Zellen trotz Inhibition des EGFR durch Gefitinib weiterhin Wachstum und Proliferation der Zellen gemessen werden konnten, wurde nach einer veränderten Aktivität von *Downstream*-Signalproteinen gesucht. Besonders von Interesse war die durch *MET*-Amplifikation auf DNA-Ebene verursachte Aktivierung von PI3K/AKT. Die Mutation führt zu EGFR-unabhängiger Aktivierung dieses Signalwegs [71, 72].

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich zwar eine HGFR-Aktivierung in den Gefitinib-sensiblen Zellen im statischen und im dynamischen Tumormodell, nicht aber in den resistenten HCCres A2-Zellen. Eine Behandlung mit Gefitinib führte zu einem Abfall der HGFR-Aktivierung.

Engelman et al. generierten gegen Gefitinib resistente HCC827-Zellen und verglichen diese mit den sensiblen HCC827-Zellen. In den resistenten Zellen konnte eine bestehende Phosphorylierung von AKT trotz Behandlung mit Gefitinib nachwiesen werden [217, 218].

Wie auch in der vorliegenden Arbeit zeigten die HCC827-Zellen eine Phosphorylierung von EGFR und HGFR, die bei Therapie mit Gefitinib abfiel [217]. Während in der Untersuchung von Engelman et al. die Aktivität von EGFR und HGFR in der resistenten Zelllinie erhöht war und keinen Einfluss durch Gefitinib zeigte [217], war in den hier verwendeten HCCres A2-Zellen keine vermehrte Aktivität von HGFR zu beobachten. Auch weitere *Downstream*-Kinasen der EGFR-Signalkaskade wie AKT, ERK 1/2, mTOR, p53 und STAT3 zeigten in der resistenten Zelllinie keine vermehrte Aktivität im Vergleich zu der Gefitinib-sensiblen Zelllinie.

Eine Aktivierung von AKT kann auch durch den Verlust des Tumorsuppressors Phosphatase und Tensin Homolog (PTEN) oder durch eine aktivierende Mutation im *PIK3CA*-Gen, das für die PIK3 codiert, entstehen [65, 205, 219].

MER ist eine RTK aus der AXL-Familie, die besonders in Zellen der hämatopoetischen Reihe, aber auch in Epithelzellen exprimiert wird und häufig mit der Bildung von Resistenzen gegen TKIs assoziiert ist [220]. Eine Aktivierung über c-Jun durch MEK/ERK oder über den HGFR ist vorbeschrieben [221, 222].

In den vorliegenden Gefitinib-sensiblen Zellen zeigte sich ein Abfall der MER-Aktivität zusammen mit ERK und dem HGFR. Dies spricht gegen eine Resistenzbildung aufgrund von erhöhter MER-Aktivität.

Wie bereits erwähnt, lässt die Untersuchung der pK in Arrays nur eine qualitative Beobachtung und keine quantitative Auswertung zu, doch die vorliegenden Ergebnisse sprechen gegen eine Resistenzentwicklung in der HCCres A2 Subpopulation aufgrund von einer Hochregulierung der untersuchten alternativen Signalwege.

4.4.4. EMT und SCLC-Transformation

Die EMT im Rahmen der Resistenzentwicklung führt zu Zellen mit einem länglichen, Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp [73], welcher auch in den neu generierten HCCres A5-Zellen vorzufinden war. Die HCCres A2-Zellen zeigten im dynamischen Tumormodel im Vergleich zu den HCC827-Zellen ein unregelmäßiges, gering konfluierendes Wachstum ohne geschlossenen Zellrasen. Dies spricht für eine geringere Zelladhäsion durch einen Verlust der Zell-Zell-Kontakte, wie sie bei der EMT durch Herunterregulation der Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin stattfindet [76-79].

Während der EMT zeigt sich eine Translokation von β -Catenin von der Zellmembran in Richtung Zellkern [223]. β -Catenin stellt eine Verbindung zwischen zytoskelettalen Proteinen und Adhäsionsproteinen wie E-Cadherin mit der Regulation der Genexpression dar [224]. In den HCC827-Zellen war E-Cadherin mit β -Catenin an der Zellmembran kolokalisiert. In den resistenten HCCres A2-Zellen fiel die E-Cadherin und β -Catenin Expression geringer aus, sodass wir von weniger epithelialen Eigenschaften ausgingen. Es wurde ein Zusammenhang zwischen E-Cadherin Expression und Gefitinib-Sensibilität beobachtet [225]. Die in vorliegender Arbeit beobachteten schwächeren Ausprägungen der E-Cadherin und β -Catenin Expression in den Gefitinib-resistenten HCCres A2-Zellen können diesen Zusammenhang bestätigen.

Die EMT ist ein bekannter Resistenzmechanismus in EGFR-TKI-resistenten Zellen und lässt sich durch die vermehrte Expression des mesenchymalen Markers Vimentin anstelle von pan-Cytokeratin charakterisieren [207].

Auch die in dieser Arbeit gezeigte reduzierte Expression von Mucin-1 im Rahmen einer EMT ist bereits vorbeschrieben [78].

Wie bereits erwähnt war eine Invasion als beginnende Metastasierung der Tumorzellen in die Trägerstruktur SISmuc, die in der EMT begründet sein kann [35, 226], nicht zu beobachten.

Die heterogene Morphologie mit vor allem spindelförmigen Zellen in neu generierten HCCres A5-Zellen könnte nicht nur für eine EMT, sondern ebenfalls für einen Übergang in ein SCLC sprechen. Um diese Umwandlung bei den HCCres A5-Zellen zu belegen, wären weitere histologische Untersuchungen und eine Färbung hinsichtlich neuroendokriner Marker, wie Synaptophysin, Chromogranin und CD56, nötig [62].

Das gleichzeitige Vorliegen verschiedener Resistenzmechanismen ist keine Seltenheit und kann unterschiedliche Therapieansätze verlangen [62]. In neu generierten resistenten HCC827-Zellen wurden beispielsweise sowohl die EMT als auch die *MET*-Amplifikation in verschiedenen Subklonen beschrieben [207]. Von weiterführendem Interesse wäre der Vergleich der Umgebungs- und Generierungsbedingungen von Zellen, die unterschiedliche Resistenzmechanismen aufweisen, sich jedoch aus derselben Ursprungszelllinie generieren ließen [217].

4.5. Ausblick

Wie in den vorangegangenen Abschnitten diskutiert, kann das 3D Lungentumormodell die Diskrepanz zwischen der 2D Zellkultur und der Komplexität von klinisch vorgefundenen Lungentumoren teilweise überbrücken. Es bestehen jedoch Ansatzpunkte für eine weitere Optimierung des Modells.

In 3D Strukturen erfolgt die Versorgung der Zellen durch Diffusion. Diese ist jedoch auf eine Tiefe von ca. 200 μm limitiert, was dem Abstand von Kapillaren in lebenden Organismen entspricht [227]. Besonders im Zentrum von größeren Geweben, unter anderem auch schnell proliferierenden Tumorzellen, kann es so zu einer Unterversorgung der Zellen mit Nährstoffen kommen. Ein Lungentumormodell mit der BioVaSc[®] als Scaffold, dessen bestehendes Gefäßsystem mit Endothelzellen besiedelt und über den Bioreaktor perfundiert wird, würde sich für Fragestellungen zur Gewebegängigkeit und Diffusion von Medikamenten sowie der Gefäßversorgung von Tumoren anbieten [114, 119, 120]. In dem Rahmen wäre auch die Kombination eines Lungentumormodells mit einem Lebermodell denkbar, um die hepatische Metabolisierung von Medikamenten zu simulieren.

Tumorstammzellen sind *in vivo* ein häufiger Grund für das Wiederauftreten von bereits erfolgreich behandelten Tumoren [228-230]. Ein Vorgang, der in Modellen bestehend aus nur einer Tumorzelllinie nicht berücksichtigt wird und Raum für weitere Forschung bietet. Um die Heterogenität von humanen Tumoren möglichst naturgetreu nachzubilden, wäre eine Konstruktion von Tumormodellen aus primären Geweben denkbar. Im Sinne der personalisierten Medizin könnten die Tumorzusammensetzung, das Therapieansprechen und die Resistenzentwicklung von Gewebe, das direkt dem Patienten entnommen wurde, erforscht werden.

Ein weiteres Problem in der Behandlung von Lungentumoren ist die rasche Metastasierung der Tumore [3, 4, 231]. Die Hintereinanderschaltung von verschiedenen Geweben im Bioreaktor könnte die Begebenheiten im Organismus imitieren. Als initiierender Mechanismus der Metastasierung zählt die EMT [35, 226], welche im Lungentumormodell beispielsweise durch den Transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF- β) stimuliert werden kann [116].

Die Entwicklung von Resistenzen in Lungentumoren unterstreicht die Notwendigkeit von Untersuchungen zu alternativen Angriffspunkten für zielgerichtete Therapien sowie dafür geeigneter Testmodelle [232]. Als vielversprechende Substanzen gelten unter anderem Bevacizumab, (Avastin, Roche), ein monoklonaler AK, der die Angiogenese durch Binden von VEGF-A inhibiert [233] und Nivolumab (Opdivo, Bristol-Myers Squibb), ein humaner monoklonaler AK gegen das programmierte Zelltod Protein-1 (PD-1), dessen Binden eine Aktivierung der T-Zell-vermittelten Immunantwort gegen die Tumorzellen bewirkt [234]. Um diese und viele weitere Mechanismen zu untersuchen, werden sehr viel umfassendere Testmodelle benötigt, denn wie Bissel schreibt: „*half of the secret of the cell, lies outside the cell*“ [235].

In der Erforschung pharmakologischer Substanzen sind die *Organs-on-a-Chip* eine neue Technologie. Diese sind artifizielle Organe in Form von Zellkultur-Chips, die die physiologische Reaktion, Aktivität und Mechanik von Organen, Geweben oder ganzen Organismen simulieren und so physiologische Bedingungen realitätsgetreu wiedergeben können [236, 237]. Dies würde nicht nur begrenzte, beobachtende Untersuchungen zu Dosis-Wirkungs-Beziehungen ermöglichen, sondern auch das vielschichtige, komplexe Netz an Einflüssen und Interaktionen imitieren können. Dadurch ist eine zielgerichtete Erforschung von Medikamenten ohne Tierversuche sicherer und schneller möglich.

5. Zusammenfassung

Als die häufigste tödliche Tumorerkrankung weltweit ist das Lungenkarzinom mit einer sehr schlechten Prognose verbunden. Eine Behandlungsoption für Lungenadenokarzinome, die eine aktivierende *EGFR*-Mutation aufweisen, ist der orale *EGFR*-TKI Gefitinib (Iressa[®], ZD1839). Die Resistenzentwicklung von Tumoren gegen diese Therapie stellt ein großes klinisches Problem dar.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Dosis-Wirkungs-Beziehung von Gefitinib, sowie die Entwicklung von Resistenzen in einem etablierten humanen 3D Lungentumormodell zu untersuchen und dieses Testsystem für eben diese Fragestellungen zu validieren.

Vorliegende Arbeit bestätigt, dass pharmakologische Untersuchungen in Zellkulturen häufig zu einer Überschätzung des Behandlungserfolges führen. Das verwendete Modell entspricht mehr den *in vivo* Bedingungen. In dieser Arbeit wurden zwei ATP-Zellvitalitätsassays für die statischen 3D Lungentumormodelle etabliert und erfolgreich angewendet. Dabei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Wirkung von Gefitinib auf das Wachstum, die Proliferation, die Apoptose, die Markerexpression sowie die Signalwegsaktivierungen. Im statischen 3D Lungentumormodell lag der IC_{50} -Wert zwischen 0,05-0,1 μ M Gefitinib welches den Werten aus klinischen Beobachtungen entspricht. Auch der in der Klinik bereits nach wenigen Stunden eintretende zeitliche Effekt von Gefitinib konnte in unserem Modell bestätigt werden. Eine dynamische Kultivierung der Lungentumorzellen, mit von Scherkräften verursachtem schnellerem Zellwachstum, führte zu einer weiteren Annäherung an die klinischen Gegebenheiten. Das Netzwerk der Gefitinib-Wirkung auf die *EGFR*-Signalkaskade wurde in unserem Modell charakterisiert. Die Betrachtung einer resistenten Zell-Subpopulation zeigte einen Resistenzmechanismus über eine Epitheliale-Mesenchymale-Transition. Zusätzlich wurde versucht, eine neue medikamenten-resistente Zell-Subpopulation zu generieren.

Das beschriebene 3D Lungentumormodell ermöglicht richtungsweisende Untersuchungen zu Dosis-Wirkungs-Beziehung von Gefitinib. Ansätze für eine weitere Optimierung des Modells wurden herausgearbeitet.

6. Literaturverzeichnis

1. Gaber, E.W., Manfred, *Sterblichkeit, Todesursachen und regionale Unterschiede* Robert Koch Institut, Statistisches Bundesamt, Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2011. **Heft 52 available from:**
https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsT/sterblichkeit.pdf?__blob=publicationFile (07.11.2018).
2. Global Burden of Disease Cancer, C., et al., *Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study*. JAMA Oncol, 2017. **3**(4): p. 524-548.
3. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(2): p. 87-108.
4. Torre, L.A., et al., *Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2016. **25**(1): p. 16-27.
5. Howlander N, N.A., Krapcho M, Miller D, Bishop K, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014*. National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/.
6. Travis, W.D., *The 2015 WHO classification of lung tumors*. Pathologe, 2014. **35 Suppl 2**: p. 188.
7. Cheng, T.Y., et al., *The International Epidemiology of Lung Cancer: Latest Trends, Disparities, and Tumor Characteristics*. J Thorac Oncol, 2016. **11**(10): p. 1653-71.
8. Langer, C.J., et al., *The evolving role of histology in the management of advanced non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(36): p. 5311-20.
9. Stratton, M.R., P.J. Campbell, and P.A. Futreal, *The cancer genome*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 719-24.
10. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
11. Cooper, W.A., et al., *Molecular biology of lung cancer*. J Thorac Dis, 2013. **5 Suppl 5**: p. S479-90.
12. Youlden, D.R., S.M. Cramb, and P.D. Baade, *The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends*. J Thorac Oncol, 2008. **3**(8): p. 819-31.
13. Chan, B.A. and B.G. Hughes, *Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future*. Transl Lung Cancer Res, 2015. **4**(1): p. 36-54.
14. Pao, W. and N. Girard, *New driver mutations in non-small-cell lung cancer*. Lancet Oncol, 2011. **12**(2): p. 175-80.
15. Janku, F., et al., *Novel therapeutic targets in non-small cell lung cancer*. J Thorac Oncol, 2011. **6**(9): p. 1601-12.

16. Tokumo, M., et al., *The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(3): p. 1167-73.
17. Lynch, T.J., et al., *Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib*. N Engl J Med, 2004. **350**(21): p. 2129-39.
18. Pao, W., et al., *EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(36): p. 13306-11.
19. Goffin, J.R. and K. Zbuk, *Epidermal growth factor receptor: pathway, therapies, and pipeline*. Clin Ther, 2013. **35**(9): p. 1282-303.
20. Cohen, S., *The epidermal growth factor (EGF)*. Cancer, 1983. **51**(10): p. 1787-91.
21. Carpenter, G. and J.G. Zendegui, *Epidermal growth factor, its receptor, and related proteins*. Exp Cell Res, 1986. **164**(1): p. 1-10.
22. Edwin, F., et al., *A historical perspective of the EGF receptor and related systems*. Methods Mol Biol, 2006. **327**: p. 1-24.
23. Burden, S. and Y. Yarden, *Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis*. Neuron, 1997. **18**(6): p. 847-55.
24. Normanno, N., et al., *Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer*. Gene, 2006. **366**(1): p. 2-16.
25. Oda, K., et al., *A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling*. Mol Syst Biol, 2005. **1**: p. 2005 0010.
26. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(2): p. 127-37.
27. Hynes, N.E. and H.A. Lane, *ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(5): p. 341-54.
28. Olayioye, M.A., et al., *The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer*. EMBO J, 2000. **19**(13): p. 3159-67.
29. Hynes, N.E. and G. MacDonald, *ErbB receptors and signaling pathways in cancer*. Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(2): p. 177-84.
30. Sordella, R., et al., *Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways*. Science, 2004. **305**(5687): p. 1163-7.
31. Ciardiello, F. and G. Tortora, *EGFR antagonists in cancer treatment*. N Engl J Med, 2008. **358**(11): p. 1160-74.
32. Carrera, S., et al., *Epidermal growth factor receptor tyrosine-kinase inhibitor treatment resistance in non-small cell lung cancer: biological basis and therapeutic strategies*. Clin Transl Oncol, 2014. **16**(4): p. 339-50.
33. Yu, H. and R. Jove, *The STATs of cancer--new molecular targets come of age*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(2): p. 97-105.
34. Yokogami, K., et al., *Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR*. Curr Biol, 2000. **10**(1): p. 47-50.

35. Stratmann, A.T., et al., *Establishment of a human 3D lung cancer model based on a biological tissue matrix combined with a Boolean in silico model*. Mol Oncol, 2014. **8**(2): p. 351-65.
36. Weinstein, I.B., *Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer*. Science, 2002. **297**(5578): p. 63-4.
37. Baselga, J., et al., *Phase II study of weekly intravenous trastuzumab (Herceptin) in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer*. Semin Oncol, 1999. **26**(4 Suppl 12): p. 78-83.
38. Druker, B., *Signal transduction inhibition: results from phase I clinical trials in chronic myeloid leukemia*. Semin Hematol, 2001. **38**(3 Suppl 8): p. 9-14.
39. Druker, B.J., et al., *Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells*. Nat Med, 1996. **2**(5): p. 561-6.
40. Schiller, J.H., et al., *Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2002. **346**(2): p. 92-8.
41. Breathnach, O.S., et al., *Twenty-two years of phase III trials for patients with advanced non-small-cell lung cancer: sobering results*. J Clin Oncol, 2001. **19**(6): p. 1734-42.
42. Melosky, B., S. Popat, and D.R. Gandara, *An Evolving Algorithm to Select and Sequence Therapies in EGFR Mutation-positive NSCLC: A Strategic Approach*. Clin Lung Cancer, 2018. **19**(1): p. 42-50.
43. Selvaggi, G., et al., *Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer*. Ann Oncol, 2004. **15**(1): p. 28-32.
44. Cohen, M.H., et al., *United States Food and Drug Administration Drug Approval summary: Gefitinib (ZD1839; Iressa) tablets*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(4): p. 1212-8.
45. Kris, M.G., et al., *Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial*. JAMA, 2003. **290**(16): p. 2149-58.
46. Fukuoka, M., et al., *Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]*. J Clin Oncol, 2003. **21**(12): p. 2237-46.
47. Thatcher, N., et al., *Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer)*. Lancet, 2005. **366**(9496): p. 1527-37.
48. Savas, P., B. Hughes, and B. Solomon, *Targeted therapy in lung cancer: IPASS and beyond, keeping abreast of the explosion of targeted therapies for lung cancer*. J Thorac Dis, 2013. **5** Suppl 5: p. S579-92.
49. Mok, T.S., et al., *Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma*. N Engl J Med, 2009. **361**(10): p. 947-57.
50. Fukuoka, M., et al., *Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced*

- non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS)*. J Clin Oncol, 2011. **29**(21): p. 2866-74.
51. Saijo, N., M. Takeuchi, and H. Kunitoh, *Reasons for response differences seen in the V15-32, INTEREST and IPASS trials*. Nat Rev Clin Oncol, 2009. **6**(5): p. 287-94.
 52. Ward, W.H.J., et al., *Epidermal Growth-Factor Receptor Tyrosine Kinase - Investigation of Catalytic Mechanism, Structure-Based Searching and Discovery of a Potent Inhibitor*. Biochemical Pharmacology, 1994. **48**(4): p. 659-666.
 53. Barker, A.J., et al., *Studies leading to the identification of ZD1839 (Iressa (TM)): An orally active, selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor targeted to the treatment of cancer*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2001. **11**(14): p. 1911-1914.
 54. Yaish, P., et al., *Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors*. Science, 1988. **242**(4880): p. 933-5.
 55. Maemondo, M., et al., *Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR*. N Engl J Med, 2010. **362**(25): p. 2380-8.
 56. Fujiwara, A., et al., *A Retrospective Comparison of the Clinical Efficacy of Gefitinib, Erlotinib and Afatinib in Japanese Patients with Non-small Cell Lung Cancer*. Oncol Res, 2018.
 57. Mitsudomi, T., et al., *Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2010. **11**(2): p. 121-8.
 58. Wolf, M., H. Swaisland, and S. Averbuch, *Development of the novel biologically targeted anticancer agent gefitinib: determining the optimum dose for clinical efficacy*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(14): p. 4607-13.
 59. Rowinsky, E.K., *The Pursuit of Optimal Outcomes in Cancer Therapy in a New Age of Rationally Designed Target-Based Anticancer Agents*. Drugs, 2000. **60**(1): p. 1-14.
 60. Fox, E., G.A. Curt, and F.M. Balis, *Clinical trial design for target-based therapy*. Oncologist, 2002. **7**(5): p. 401-409.
 61. Siegelin, M.D. and A.C. Borczuk, *Epidermal growth factor receptor mutations in lung adenocarcinoma*. Lab Invest, 2014. **94**(2): p. 129-37.
 62. Yu, H.A., et al., *Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(8): p. 2240-7.
 63. Kobayashi, S., et al., *EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib*. N Engl J Med, 2005. **352**(8): p. 786-92.
 64. Kuiper, J.L., et al., *Incidence of T790M mutation in (sequential) rebiopsies in EGFR-mutated NSCLC-patients*. Lung Cancer, 2014. **85**(1): p. 19-24.
 65. Sequist, L.V., et al., *Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors*. Sci Transl Med, 2011. **3**(75): p. 75ra26.
 66. Pao, W., et al., *Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain*. PLoS Med, 2005. **2**(3): p. e73.

67. Yun, C.H., et al., *The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(6): p. 2070-5.
68. Costa, D.B., et al., *BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations*. PLoS Med, 2007. **4**(10): p. 1669-79; discussion 1680.
69. Balak, M.N., et al., *Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(21): p. 6494-501.
70. Bean, J., et al., *Acquired resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors associated with a novel T854A mutation in a patient with EGFR-mutant lung adenocarcinoma*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(22): p. 7519-25.
71. Sattler, M., et al., *The role of the c-Met pathway in lung cancer and the potential for targeted therapy*. Ther Adv Med Oncol, 2011. **3**(4): p. 171-84.
72. Yano, S., et al., *Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations*. Cancer Res, 2008. **68**(22): p. 9479-87.
73. Hay, E.D., *An overview of epithelio-mesenchymal transformation*. Acta Anat (Basel), 1995. **154**(1): p. 8-20.
74. Lambert, A.W., D.R. Pattabiraman, and R.A. Weinberg, *Emerging Biological Principles of Metastasis*. Cell, 2017. **168**(4): p. 670-691.
75. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
76. Battle, E., et al., *The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 84-9.
77. Cano, A., et al., *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(2): p. 76-83.
78. Guaita, S., et al., *Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39209-16.
79. Yang, J., et al., *Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis*. Cell, 2004. **117**(7): p. 927-39.
80. Hugo, H., et al., *Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression*. J Cell Physiol, 2007. **213**(2): p. 374-83.
81. Watanabe, S., et al., *Transformation to small-cell lung cancer following treatment with EGFR tyrosine kinase inhibitors in a patient with lung adenocarcinoma*. Lung Cancer, 2013. **82**(2): p. 370-2.
82. US Department of Human and Health Services, *Innovation or Stagnation: Challenge and Opportunity on the Critical Path to New Medical Products*. Website: <http://wayback.archive-it.org/7993/20180125032208/https://www.fda.gov/ScienceResearch/Sp>

- cialTopics/CriticalPathInitiative/CriticalPathOpportunitiesReports/ucm077262.htm, 28.06.2018, 2004(US Food and Drug Administration (FDA)).
83. Pampaloni, F., E.G. Reynaud, and E.H. Stelzer, *The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(10): p. 839-45.
 84. Gazdar, A.F., B. Gao, and J.D. Minna, *Lung cancer cell lines: Useless artifacts or invaluable tools for medical science?* Lung Cancer, 2010. **68**(3): p. 309-18.
 85. Sato, G., *Tissue culture: the unrealized potential*. Cytotechnology, 2008. **57**(2): p. 111-4.
 86. Sato, G.H., et al., *Tissue culture: the unlimited potential*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2010. **46**(7): p. 590-4.
 87. Gazdar, A.F., et al., *Lung cancer cell lines as tools for biomedical discovery and research*. J Natl Cancer Inst, 2010. **102**(17): p. 1310-21.
 88. Cree, I.A., S. Glaysher, and A.L. Harvey, *Efficacy of anti-cancer agents in cell lines versus human primary tumour tissue*. Curr Opin Pharmacol, 2010. **10**(4): p. 375-9.
 89. Gazdar, A.F. and J.D. Minna, *Cell lines as an investigational tool for the study of biology of small cell lung cancer*. Eur J Cancer Clin Oncol, 1986. **22**(8): p. 909-11.
 90. Yamada, K.M. and E. Cukierman, *Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D*. Cell, 2007. **130**(4): p. 601-10.
 91. Nelson, C.M. and M.J. Bissell, *Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 287-309.
 92. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
 93. Smalley, K.S., M. Lioni, and M. Herlyn, *Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2006. **42**(8-9): p. 242-7.
 94. Cespedes, M.V., et al., *Mouse models in oncogenesis and cancer therapy*. Clin Transl Oncol, 2006. **8**(5): p. 318-29.
 95. Man, S., R. Munoz, and R.S. Kerbel, *On the development of models in mice of advanced visceral metastatic disease for anti-cancer drug testing*. Cancer Metastasis Rev, 2007. **26**(3-4): p. 737-47.
 96. Hackam, D.G. and D.A. Redelmeier, *Translation of research evidence from animals to humans*. JAMA, 2006. **296**(14): p. 1731-2.
 97. Perel, P., et al., *Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review*. BMJ, 2007. **334**(7586): p. 197.
 98. Schenke-Layland, K. and R.M. Nerem, *In vitro human tissue models--moving towards personalized regenerative medicine*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(4-5): p. 195-6.
 99. Russell, W.M.S., Burch, R.L., , *The Principles of Humane Experimental Technique*. Universities Federation for Animal Welfare Wheathampstead, England. 1959.
 100. Bundesamt für Justiz, *Verordnung zum Schutz von zu Versuchszwecken oder zu anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren*

- (*Tierschutz-Versuchstierverordnung - TierSchVersV*), 2013. <http://www.gesetze-im-internet.de/tierschversv/BJNR312600013.html>, vom 07.03.2019.
101. Hacker, M.C. and A.G. Mikos, *Trends in tissue engineering research*. *Tissue Eng*, 2006. **12**(8): p. 2049-57.
 102. Polak, J.M. and A.E. Bishop, *Stem cells and tissue engineering: past, present, and future*. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1068**: p. 352-66.
 103. Zeilinger, K., et al., [*Liver cell culture in bioreactors for in vitro drug studies as an alternative to animal testing*]. *ALTEX*, 2000. **17**(1): p. 3-10.
 104. Bisceglie, V., *Über die antineoplastische immunität; heterologe Einpflanzung von Tumoren in Hühner-embryonen*. *Ztschr. Krebsforsch* 1933. **40**(122–140).
 105. Arosarena, O., *Tissue engineering*. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2005. **13**(4): p. 233-41.
 106. Weaver, V.M., et al., *The importance of the microenvironment in breast cancer progression: recapitulation of mammary tumorigenesis using a unique human mammary epithelial cell model and a three-dimensional culture assay*. *Biochem Cell Biol*, 1996. **74**(6): p. 833-51.
 107. Hutmacher, D.W., et al., *Translating tissue engineering technology platforms into cancer research*. *J Cell Mol Med*, 2009. **13**(8A): p. 1417-27.
 108. Santini, M.T., G. Rainaldi, and P.L. Indovina, *Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2000. **36**(2-3): p. 75-87.
 109. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. *Science*, 1993. **260**(5110): p. 920-6.
 110. Nasser, B.A., K. Ogawa, and J.P. Vacanti, *Tissue engineering: an evolving 21st-century science to provide biologic replacement for reconstruction and transplantation*. *Surgery*, 2001. **130**(5): p. 781-4.
 111. Vacanti, J.P. and R. Langer, *Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation*. *Lancet*, 1999. **354** **Suppl 1**: p. S132-4.
 112. Sodian, R., et al., *Tissue-engineering bioreactors: a new combined cell-seeding and perfusion system for vascular tissue engineering*. *Tissue Eng*, 2002. **8**(5): p. 863-70.
 113. Serbo, J.V. and S. Gerecht, *Vascular tissue engineering: biodegradable scaffold platforms to promote angiogenesis*. *Stem Cell Res Ther*, 2013. **4**(1): p. 8.
 114. Mertsching, H., et al., *Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation*. *Biomaterials*, 2005. **26**(33): p. 6610-7.
 115. Schanz, J., et al., *Vascularised human tissue models: a new approach for the refinement of biomedical research*. *J Biotechnol*, 2010. **148**(1): p. 56-63.
 116. Gottlich, C., et al., *A Combined 3D Tissue Engineered In Vitro/In Silico Lung Tumor Model for Predicting Drug Effectiveness in Specific Mutational Backgrounds*. *J Vis Exp*, 2016(110): p. e53885.

117. Nietzer, S., et al., *Mimicking Metastases Including Tumor Stroma: A New Technique to Generate a Three-Dimensional Colorectal Cancer Model Based on a Biological Decellularized Intestinal Scaffold*. *Tissue Eng Part C Methods*, 2016. **22**(7): p. 621-35.
118. National Institutes of Health, *Guide for Care and Use of Laboratory Animals*. NIH publication no. 85-23, revised 1996.
119. Linke, K., et al., *Engineered liver-like tissue on a capillarized matrix for applied research*. *Tissue Eng*, 2007. **13**(11): p. 2699-707.
120. Schultheiss, D., et al., *Biological vascularized matrix for bladder tissue engineering: matrix preparation, reseeding technique and short-term implantation in a porcine model*. *J Urol*, 2005. **173**(1): p. 276-80.
121. Moll, C., et al., *Tissue engineering of a human 3D in vitro tumor test system*. *J Vis Exp*, 2013(78).
122. Yamamoto, K., et al., *Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress*. *J Appl Physiol* (1985), 2003. **95**(5): p. 2081-8.
123. Promega Corporation, M., WI 53711-5399 USA, *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Technical Bulletin TB288*. 21.10.2018 Available from: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocol.pdf>, 2015.
124. Promega Corporation, M., WI, USA, *RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay Technical Manual TM431*. 27.02.2018: Available from: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/realtimeloglo-mt-cell-viability-assay-protocol.pdf>, 2016.
125. Promega Corporation, M., WI, USA, *CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay Technical Manual TM412*. 27.02.2018 Available from: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/celltiter-glo-3d-cell-viability-assay-protocol.pdf>, 2015.
126. Vansteenkiste, J., *Gefitinib (Iressa): a novel treatment for non-small cell lung cancer*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2004. **4**(1): p. 5-17.
127. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. *J Immunol Methods*, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
128. Ulukaya, E., et al., *The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested*. *Toxicol In Vitro*, 2008. **22**(1): p. 232-9.
129. Maehara, Y., et al., *The ATP assay is more sensitive than the succinate dehydrogenase inhibition test for predicting cell viability*. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 1987. **23**(3): p. 273-6.
130. Andreotti, P.E., et al., *Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma*. *Cancer Res*, 1995. **55**(22): p. 5276-82.
131. Crouch, S.P., et al., *The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity*. *J Immunol Methods*, 1993. **160**(1): p. 81-8.

132. Mueller, H., M.U. Kassack, and M. Wiese, *Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines*. J Biomol Screen, 2004. **9**(6): p. 506-15.
133. Walenta, S., et al., *Metabolic imaging in multicellular spheroids of oncogene-transfected fibroblasts*. J Histochem Cytochem, 2000. **48**(4): p. 509-22.
134. Goeckenjan G, *Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms: Interdisziplinäre S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft*. Pneumologie 2010, 2010. **64**: p. Supplement 2: e1– e164.
135. Wakeling, A.E., et al., *ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy*. Cancer Res, 2002. **62**(20): p. 5749-54.
136. Noro, R., et al., *Gefitinib (IRESSA) sensitive lung cancer cell lines show phosphorylation of Akt without ligand stimulation*. BMC Cancer, 2006. **6**: p. 277.
137. Lieber, M., et al., *A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells*. Int J Cancer, 1976. **17**(1): p. 62-70.
138. Amann, J., et al., *Aberrant epidermal growth factor receptor signaling and enhanced sensitivity to EGFR inhibitors in lung cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(1): p. 226-35.
139. Paez, J.G., et al., *EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy*. Science, 2004. **304**(5676): p. 1497-500.
140. Forcella, M., et al., *Non-small cell lung cancer (NSCLC), EGFR downstream pathway activation and TKI targeted therapies sensitivity: Effect of the plasma membrane-associated NEU3*. PLoS One, 2017. **12**(10): p. e0187289.
141. Baselga, J., et al., *Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic trial of ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with five selected solid tumor types*. J Clin Oncol, 2002. **20**(21): p. 4292-302.
142. Herbst, R.S., et al., *Selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 is generally well-tolerated and has activity in non-small-cell lung cancer and other solid tumors: results of a phase I trial*. J Clin Oncol, 2002. **20**(18): p. 3815-25.
143. Nakamura, Y., et al., *Pharmacokinetics of gefitinib predicts antitumor activity for advanced non-small cell lung cancer*. J Thorac Oncol, 2010. **5**(9): p. 1404-9.
144. Moasser, M.M., et al., *The tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ("Iressa") inhibits HER2-driven signaling and suppresses the growth of HER2-overexpressing tumor cells*. Cancer Res, 2001. **61**(19): p. 7184-8.
145. Su, H., et al., *Monitoring tumor glucose utilization by positron emission tomography for the prediction of treatment response to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(19): p. 5659-67.

146. Thongprasert, S., et al., *Health-related quality-of-life in a randomized phase III first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients from Asia with advanced NSCLC (IPASS)*. J Thorac Oncol, 2011. **6**(11): p. 1872-80.
147. Wu, Y.L., et al., *Tumor response and health-related quality of life in clinically selected patients from Asia with advanced non-small-cell lung cancer treated with first-line gefitinib: post hoc analyses from the IPASS study*. Lung Cancer, 2013. **81**(2): p. 280-7.
148. Bearz, A., et al., *Gefitinib in patients with non-small cell lung cancer: symptomatic improvement within a few days*. Lung Cancer, 2005. **49**(3): p. 417-8.
149. Suspitsin, E.N., et al., *Rapid symptomatic improvement in gefitinib-treated patients with EGFR-mutated lung cancer: possible role of downregulation of inflammatory molecules?* Onkologie, 2011. **34**(10): p. 559-60.
150. Swaisland, H., et al., *Pharmacokinetics and tolerability of the orally active selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 in healthy volunteers*. Clin Pharmacokinet, 2001. **40**(4): p. 297-306.
151. McKillop, D., et al., *Metabolic disposition of gefitinib, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in rat, dog and man*. Xenobiotica, 2004. **34**(10): p. 917-34.
152. McKillop, D., et al., *Cytochrome P450-dependent metabolism of gefitinib*. Xenobiotica, 2005. **35**(1): p. 39-50.
153. Albanell, J., et al., *Pharmacodynamic studies of the epidermal growth factor receptor inhibitor ZD1839 in skin from cancer patients: Histopathologic and molecular consequences of receptor inhibition*. Journal of Clinical Oncology, 2002. **20**(1): p. 110-124.
154. Moulder, S.L., et al., *Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo*. Cancer Res, 2001. **61**(24): p. 8887-95.
155. Normanno, N., et al., *Cooperative inhibitory effect of ZD1839 (Iressa) in combination with trastuzumab (Herceptin) on human breast cancer cell growth*. Ann Oncol, 2002. **13**(1): p. 65-72.
156. Normanno, N., M.R. Maiello, and A. De Luca, *Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs): simple drugs with a complex mechanism of action?* J Cell Physiol, 2003. **194**(1): p. 13-9.
157. Woodburn J. R.; Barker, A.J.G., K. H.; Ashton, S. E.; Wakeling, A. E.; Curry, B. J.; Scarlett, L.; Henthorn, L. R., *ZD1839, An epidermal growth factor tyrosine kinase inhibitor selected for clinical development*. Journal of Immunotherapy, 1997. **20**(5): p. 408.
158. Ciardiello, F., et al., *Inhibition of growth factor production and angiogenesis in human cancer cell lines by ZD1839 (Iressa (TM)), an EGFR-selective tyrosine kinase inhibitor*. Clinical Cancer Research, 2000. **6**: p. 4542s-4542s.

159. Li, B., et al., *Resistance to small molecule inhibitors of epidermal growth factor receptor in malignant gliomas*. *Cancer Res*, 2003. **63**(21): p. 7443-50.
160. Zhao, J.G., W.F. Men, and J. Tang, *MicroRNA-7 enhances cytotoxicity induced by gefitinib in non-small cell lung cancer via inhibiting the EGFR and IGF1R signalling pathways*. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2015. **19**(3): p. 201-6.
161. Busse, D., et al., *Reversible G(1) arrest induced by inhibition of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase requires up-regulation of p27(KIP1) independent of MAPK activity*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(10): p. 6987-95.
162. Malik, S.N., et al., *Pharmacodynamic evaluation of the epidermal growth factor receptor inhibitor OSI-774 in human epidermis of cancer patients*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(7): p. 2478-86.
163. Xu, B.E., et al., *WNK1: analysis of protein kinase structure, downstream targets, and potential roles in hypertension*. *Cell Res*, 2005. **15**(1): p. 6-10.
164. Ciocca, D.R. and S.K. Calderwood, *Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications*. *Cell Stress Chaperones*, 2005. **10**(2): p. 86-103.
165. Hjerpe, E., et al., *HSP60 predicts survival in advanced serous ovarian cancer*. *Int J Gynecol Cancer*, 2013. **23**(3): p. 448-55.
166. Urushibara, M., et al., *HSP60 may predict good pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in bladder cancer*. *Jpn J Clin Oncol*, 2007. **37**(1): p. 56-61.
167. Zhou, C., et al., *Oncogenic HSP60 regulates mitochondrial oxidative phosphorylation to support Erk1/2 activation during pancreatic cancer cell growth*. *Cell Death Dis*, 2018. **9**(2): p. 161.
168. Ciocca, D.R., et al., *Heat shock proteins (HSPs) based anti-cancer vaccines*. *Curr Mol Med*, 2012. **12**(9): p. 1183-97.
169. Tracy, S., et al., *Gefitinib induces apoptosis in the EGFR L858R non-small-cell lung cancer cell line H3255*. *Cancer Res*, 2004. **64**(20): p. 7241-4.
170. Gottlieb, T.M. and M. Oren, *p53 in growth control and neoplasia*. *Biochim Biophys Acta*, 1996. **1287**(2-3): p. 77-102.
171. Dai, C. and W. Gu, *p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis*. *Trends Mol Med*, 2010. **16**(11): p. 528-36.
172. Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine, *Surfing the p53 network*. *Nature*, 2000. **408**(6810): p. 307-10.
173. Sherr, C.J. and J.D. Weber, *The ARF/p53 pathway*. *Curr Opin Genet Dev*, 2000. **10**(1): p. 94-9.
174. Shieh, S.Y., et al., *DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2*. *Cell*, 1997. **91**(3): p. 325-34.
175. Smeenk, L., et al., *Role of p53 serine 46 in p53 target gene regulation*. *PLoS One*, 2011. **6**(3): p. e17574.
176. Oda, K., et al., *p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53*. *Cell*, 2000. **102**(6): p. 849-62.

177. Matsumoto, M., et al., *Prognostic significance of serine 392 phosphorylation in overexpressed p53 protein in human esophageal squamous cell carcinoma*. *Oncology*, 2004. **67**(2): p. 143-50.
178. Furihata, M., et al., *Frequent phosphorylation at serine 392 in overexpressed p53 protein due to missense mutation in carcinoma of the urinary tract*. *J Pathol*, 2002. **197**(1): p. 82-8.
179. Peng, D., et al., *Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 up-regulates p27KIP1 and induces G1 arrest in prostatic cancer cell line DU145*. *Cancer Res*, 1996. **56**(16): p. 3666-9.
180. Gong, Y., et al., *Induction of BIM is essential for apoptosis triggered by EGFR kinase inhibitors in mutant EGFR-dependent lung adenocarcinomas*. *PLoS Med*, 2007. **4**(10): p. e294.
181. Di Gennaro, E., et al., *Critical role of both p27KIP1 and p21CIP1/WAF1 in the antiproliferative effect of ZD1839 ('Iressa'), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in head and neck squamous carcinoma cells*. *J Cell Physiol*, 2003. **195**(1): p. 139-50.
182. Bjornsti, M.A. and P.J. Houghton, *The TOR pathway: a target for cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(5): p. 335-48.
183. Wei, Y., et al., *EGFR-mediated Beclin 1 phosphorylation in autophagy suppression, tumor progression, and tumor chemoresistance*. *Cell*, 2013. **154**(6): p. 1269-84.
184. Levine, B. and G. Kroemer, *Autophagy in the pathogenesis of disease*. *Cell*, 2008. **132**(1): p. 27-42.
185. Wang, R.C., et al., *Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation*. *Science*, 2012. **338**(6109): p. 956-9.
186. Lamb, J., *The Connectivity Map: a new tool for biomedical research*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(1): p. 54-60.
187. Frantz, S., *Drug discovery: playing dirty*. *Nature*, 2005. **437**(7061): p. 942-3.
188. Besson, A., S.F. Dowdy, and J.M. Roberts, *CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond*. *Dev Cell*, 2008. **14**(2): p. 159-69.
189. Fernando, A., et al., *Effect of culture conditions on the chemosensitivity of ovarian cancer cell lines*. *Anti-Cancer Drugs*, 2006. **17**(8): p. 913-919.
190. Andreotti, P.E., et al., *TCA-100 tumour chemosensitivity assay: differences in sensitivity between cultured tumour cell lines and clinical studies*. *J Biolumin Chemilumin*, 1994. **9**(6): p. 373-8.
191. Miller, B.E., F.R. Miller, and G.H. Heppner, *Factors affecting growth and drug sensitivity of mouse mammary tumor lines in collagen gel cultures*. *Cancer Res*, 1985. **45**(9): p. 4200-5.
192. Navarro, F.A., et al., *Perfusion of medium improves growth of human oral neomucosal tissue constructs*. *Wound Repair Regen*, 2001. **9**(6): p. 507-12.
193. Bancroft, G.N., et al., *Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(20): p. 12600-5.

194. Gharravi, A.M., M. Orazizadeh, and M. Hashemitabar, *Fluid-induced low shear stress improves cartilage like tissue fabrication by encapsulating chondrocytes*. Cell Tissue Bank, 2016. **17**(1): p. 117-22.
195. Qazi, H., Z.D. Shi, and J.M. Tarbell, *Fluid shear stress regulates the invasive potential of glioma cells via modulation of migratory activity and matrix metalloproteinase expression*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20348.
196. King, J.A. and W.M. Miller, *Bioreactor development for stem cell expansion and controlled differentiation*. Curr Opin Chem Biol, 2007. **11**(4): p. 394-8.
197. Tsou, Y.A., et al., *Analysis of prognostic factors of chemoradiation therapy for advanced hypopharyngeal cancer--does tumor volume correlate with central necrosis and tumor pathology?* ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec, 2006. **68**(4): p. 206-12.
198. Lopez-Ferrer, A., et al., *Mucins as differentiation markers in bronchial epithelium. Squamous cell carcinoma and adenocarcinoma display similar expression patterns*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001. **24**(1): p. 22-29.
199. Hollingsworth, M.A. and B.J. Swanson, *Mucins in cancer: protection and control of the cell surface*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(1): p. 45-60.
200. Aubert, S., et al., *MUC1, a new hypoxia inducible factor target gene, is an actor in clear renal cell carcinoma tumor progression*. Cancer Res, 2009. **69**(14): p. 5707-15.
201. Ho, S.B., et al., *Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues*. Cancer Res, 1993. **53**(3): p. 641-51.
202. Schroeder, J.A., et al., *Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland*. J Biol Chem, 2001. **276**(16): p. 13057-64.
203. Li, Y., et al., *The epidermal growth factor receptor regulates interaction of the human DF3/MUC1 carcinoma antigen with c-Src and beta-catenin*. J Biol Chem, 2001. **276**(38): p. 35239-42.
204. Shimoyama, Y., et al., *Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas*. Cancer Res, 1989. **49**(8): p. 2128-33.
205. Engelman, J.A., et al., *Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer*. J Clin Invest, 2006. **116**(10): p. 2695-706.
206. Ricci, C., et al., *Mutation in the ATP-binding pocket of the ABL kinase domain in an STI571-resistant BCR/ABL-positive cell line*. Cancer Res, 2002. **62**(21): p. 5995-8.
207. Jakobsen, K.R., et al., *MET amplification and epithelial-to-mesenchymal transition exist as parallel resistance mechanisms in erlotinib-resistant, EGFR-mutated, NSCLC HCC827 cells*. Oncogenesis, 2017. **6**(4): p. e307.
208. Terai, H., et al., *Activation of the FGF2-FGFR1 autocrine pathway: a novel mechanism of acquired resistance to gefitinib in NSCLC*. Mol Cancer Res, 2013. **11**(7): p. 759-67.

209. Shien, K., et al., *Acquired resistance to EGFR inhibitors is associated with a manifestation of stem cell-like properties in cancer cells*. *Cancer Res*, 2013. **73**(10): p. 3051-61.
210. Sagawa, Y., et al., *Establishment of three cisplatin-resistant endometrial cancer cell lines using two methods of cisplatin exposure*. *Tumour Biol*, 2011. **32**(2): p. 399-408.
211. Inukai, M., et al., *Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer*. *Cancer Res*, 2006. **66**(16): p. 7854-8.
212. Costa, C., et al., *The impact of EGFR T790M mutations and BIM mRNA expression on outcome in patients with EGFR-mutant NSCLC treated with erlotinib or chemotherapy in the randomized phase III EURTAC trial*. *Clin Cancer Res*, 2014. **20**(7): p. 2001-10.
213. Naumov, G.N., et al., *Combined vascular endothelial growth factor receptor and epidermal growth factor receptor (EGFR) blockade inhibits tumor growth in xenograft models of EGFR inhibitor resistance*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(10): p. 3484-94.
214. Miller, V.A., et al., *Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial*. *Lancet Oncol*, 2012. **13**(5): p. 528-38.
215. Ramalingam, S.S., et al., *Randomized phase II study of dacomitinib (PF-00299804), an irreversible pan-human epidermal growth factor receptor inhibitor, versus erlotinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(27): p. 3337-44.
216. Zhou, W., et al., *Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M*. *Nature*, 2009. **462**(7276): p. 1070-4.
217. Engelman, J.A., et al., *MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling*. *Science*, 2007. **316**(5827): p. 1039-43.
218. Turke, A.B., et al., *Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC*. *Cancer Cell*, 2010. **17**(1): p. 77-88.
219. Sos, M.L., et al., *PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR*. *Cancer Res*, 2009. **69**(8): p. 3256-61.
220. Schoumacher, M. and M. Burbridge, *Key Roles of AXL and MER Receptor Tyrosine Kinases in Resistance to Multiple Anticancer Therapies*. *Curr Oncol Rep*, 2017. **19**(3): p. 19.
221. Yeh, C.Y., et al., *Transcriptional activation of the Axl and PDGFR-alpha by c-Met through a ras- and Src-independent mechanism in human bladder cancer*. *BMC Cancer*, 2011. **11**: p. 139.
222. Brand, T.M., et al., *AXL mediates resistance to cetuximab therapy*. *Cancer Res*, 2014. **74**(18): p. 5152-64.
223. Klymkowsky, M.W., *beta-catenin and its regulatory network*. *Hum Pathol*, 2005. **36**(3): p. 225-7.

224. Wikramanayake, A.H., et al., *An ancient role for nuclear beta-catenin in the evolution of axial polarity and germ layer segregation*. Nature, 2003. **426**(6965): p. 446-50.
225. Witta, S.E., et al., *ErbB-3 expression is associated with E-cadherin and their coexpression restores response to gefitinib in non-small-cell lung cancer (NSCLC)*. Ann Oncol, 2009. **20**(4): p. 689-95.
226. Moustakas, A. and C.H. Heldin, *Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression*. Cancer Sci, 2007. **98**(10): p. 1512-20.
227. Jain, R.K., et al., *Engineering vascularized tissue*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(7): p. 821-3.
228. Singh, S.K., et al., *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. Cancer Res, 2003. **63**(18): p. 5821-8.
229. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 3983-8.
230. Lapidot, T., et al., *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. Nature, 1994. **367**(6464): p. 645-8.
231. Moreau, J.E., et al., *Tissue-engineered bone serves as a target for metastasis of human breast cancer in a mouse model*. Cancer Res, 2007. **67**(21): p. 10304-8.
232. Minguet, J., K.H. Smith, and P. Bramlage, *Targeted therapies for treatment of non-small cell lung cancer--Recent advances and future perspectives*. Int J Cancer, 2016. **138**(11): p. 2549-61.
233. Gordon, M.S., et al., *Phase I safety and pharmacokinetic study of recombinant human anti-vascular endothelial growth factor in patients with advanced cancer*. J Clin Oncol, 2001. **19**(3): p. 843-50.
234. Topalian, S.L., et al., *Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer*. N Engl J Med, 2012. **366**(26): p. 2443-54.
235. Bissell, M.J., *Modelling molecular mechanisms of breast cancer and invasion: lessons from the normal gland*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 1): p. 18-22.
236. Huh, D., et al., *Reconstituting organ-level lung functions on a chip*. Science, 2010. **328**(5986): p. 1662-8.
237. Kodzius, R., et al., *Organ-on-Chip Technology: Current State and Future Developments*. Genes (Basel), 2017. **8**(10).

7. Anhang

7.1. Zusatzabbildungen

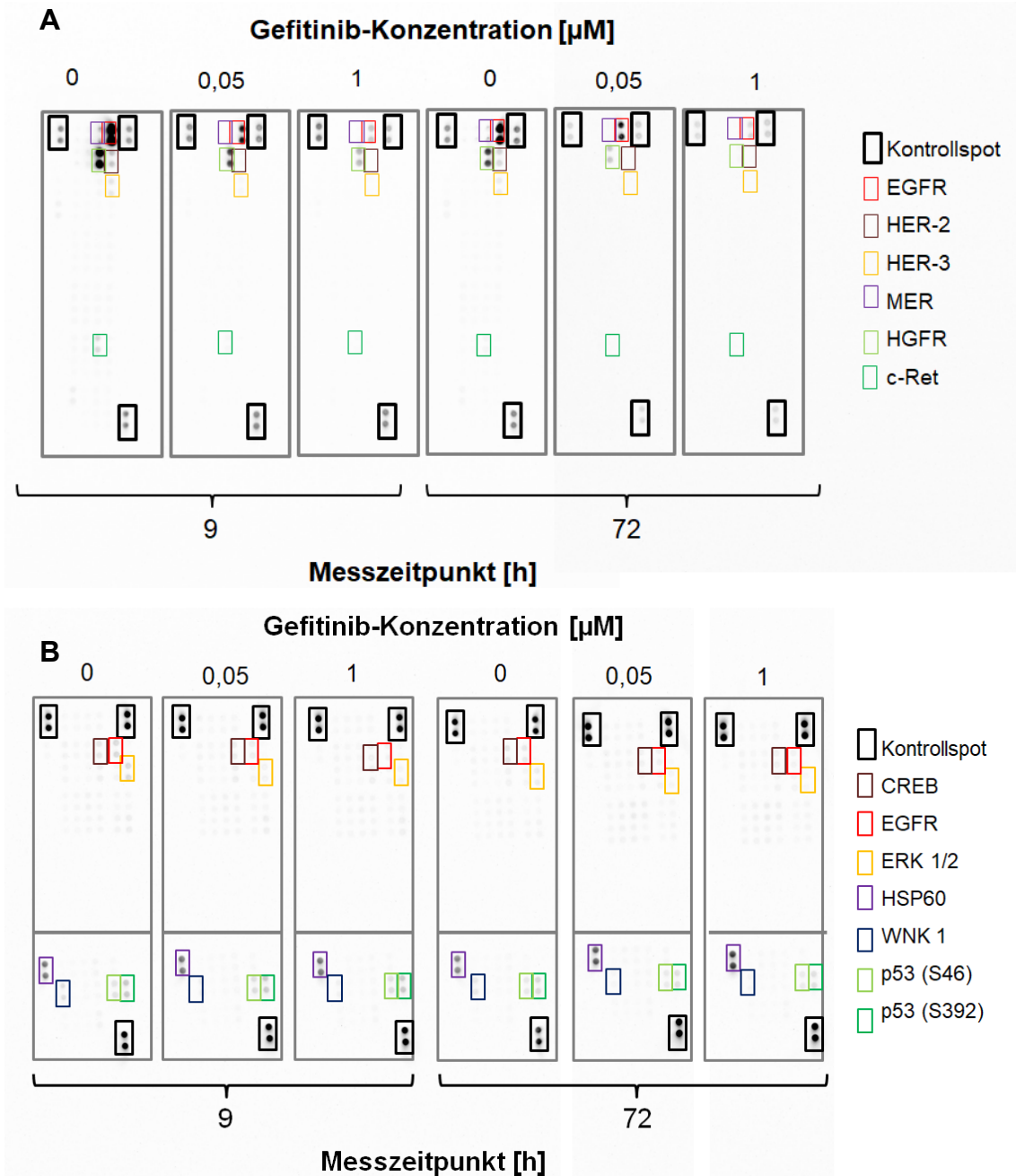


Abbildung 25: Darstellung der Array-Membranen nach 9-stündiger und 72-stündiger Behandlung der statischen 3D Lungentumormodelle mit 0,05 μM und 1 μM Gefitinib sowie einer unbehandelten Probe. **A)** Membranen des pRTK-Arrays. Es zeigen sich ausgeprägte EGFR- und HGFR-Punkte, die durch die Behandlung mit Gefitinib weniger intensiv werden. **B)** Membranen des pK-Arrays. Die HSP60-Punkte sind am eindeutigsten zu identifizieren, gefolgt von p53 (S46 und S392) und EGFR, ERK 1/2 und CREB. Die Kontrollpunkte sind in den schwarzen Kästchen dargestellt und die sichtbaren pKs nach obiger Legende in bunten Kästchen.

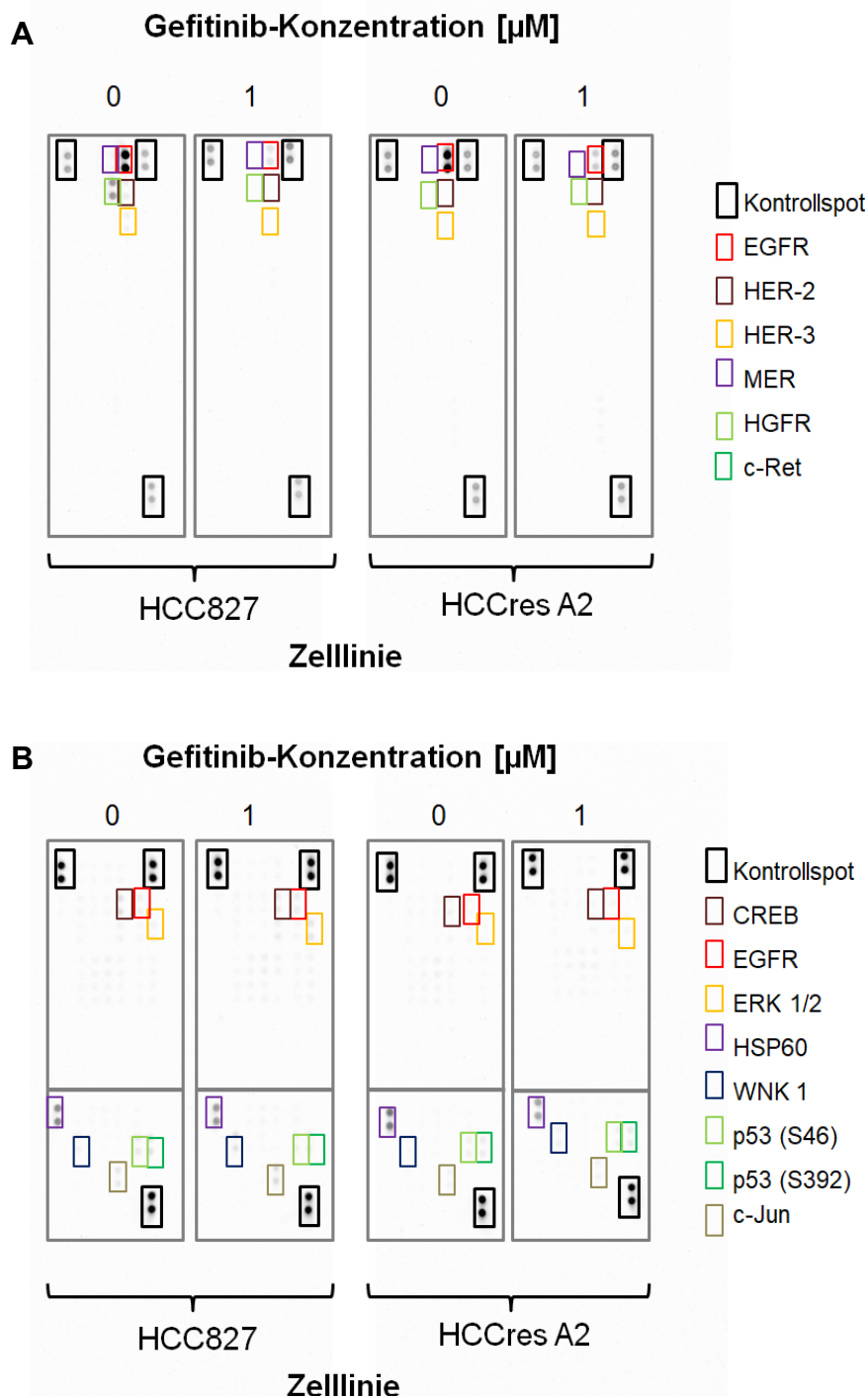


Abbildung 26: Darstellung der Array-Membranen nach Behandlung der HCC827-Zellen und der HCCres A2 Subpopulation mit $1 \mu\text{M}$ Gefitinib sowie einer unbehandelten Probe im dynamischen 3D Lungentumormodell. A) Membranen des pRTK-Arrays. Es ist eine starke Phosphorylierung der EGFR-Punkte in beiden unbehandelten Ansätzen zu detektieren, während eine Behandlung zu keiner Detektion mehr führt. B) Membranen des pK-Arrays. Mit Ausnahme von HSP60 sind keine eindeutigen Punkte der untersuchten pKs zu sehen. Die Kontrollpunkte sind in den schwarzen Kästchen und die sichtbaren pKs nach obiger Legende in bunten Kästchen dargestellt. Die Kontrollpunkte sind in den schwarzen Kästchen dargestellt und die sichtbaren pKs nach obiger Legende in bunten Kästchen.

7.2. Abkürzungsverzeichnis

Chemische Elemente wurden gemäß ihrer Bezeichnung im Periodensystem und Aminosäuren und Formelgrößen mit den international gebräuchlichen SI-Einheiten abgekürzt.

Tabelle 32: Übersicht über die verwendeten Abkürzungen.

Abkürzung	Bedeutung
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
µM	µmol/L
AK	Antikörper
AKT	Protein Kinase B
ALK	Anaplastische Lymphom Kinase
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	Antigen-Präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AXL	AXL Rezeptor Tyrosin Kinase
Bcl-2	B-Zelllymphom 2
BIM	Bcl-2 interagierender Zelltodmediator
BioVaSc [®]	Biologische Vaskularisierte Trägermatrix
BRAF	Rapid Akzeleriertes Fibrosarkom Homolog B1
BSA	Bovines Serum Albumin
CD4 ⁺	Cluster der Differenzierung 4 positiv
CD8 ⁺	Cluster der Differenzierung 8 positiv
ccK18	Durch Caspasen gespaltenes Cytokeratin 18
CDK	Zyclin abhängige Kinase
c-Jun	Zelluläres Jun
CREB	zyklisches AMP <i>response element</i> bindendes Protein
CYP2D6	Cytochrom P450 2D6
CYP3A4	Cytochrom P450 3A4
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
del	Deletion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DOC	Dezellularisierungslösung
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ELISA	<i>Enzym Linked Immunosorbent Assay</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ERK 1/2	Extrazellulär-Signal regulierende Kinase 1/2

EZM	Extrazellulärmatrix
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FCS	Fetales Kälberserum
G-Phase	Lücken-Phase (Zellzyklus)
Grb2	Wachstumsfaktorgebundenes Protein 2
HCC827	Humane Lungenadenokarzinom-Zelllinie
HCCres	Resistente Subpopulation der HCC827
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER	Humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
HGFR	Hepatozyten Wachstumsfaktorrezeptor
HRP	Meerrettichperoxidase
HSP60	Hitze Schock Protein 60
IC ₅₀ -Wert	Mittlere inhibitorische Konzentration
JAK 2	Janus Kinase 2
KRAS	Kirsten Ratten Sarkom Homolog
MAPK	Mitogen-Aktivierte Protein Kinase (=ERK 1/2)
MAP4K	Mitogen-Aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase Kinase
MEK	Mitogen-Aktivierte Protein Kinase Kinase
MER	MER Protoonkogen Tyrosin Kinase
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
mTOR	Mechanisches Zielmolekül von Rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- Diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT)
MYC	Myelozytomatose-zelluläres-Onkogen
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
p-	Phospho-
p27	Protein 27/CDK-Inhibitor 1B
p53	Protein 53
PBS +/-	Phosphat-gepufferte Saline <small>mit/ohne Magnesium und Calcium</small>
PBS-T	Phosphat-gepufferte Saline mit Tween
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PD-1	Programmiertes Zelltod Protein-1
PEEK	Polyetheretherketon
Pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat 3-Kinase, katalytische Untereinheit Alpha
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
pK-Array	phospho Kinase-Array
PLC γ	Phospholipase C γ
pRTK-Array	phospho Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Array
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
RAF	Rapid-Akzeleriertes Fibrosarkom
RAS	Ratten Sarkom
RLU	Relative Lichteinheiten

rpm	Umdrehungen die Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institut (Eigenname für ein Zellkulturmedium)
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
SCLC	Kleinzelliges Lungenkarzinom
SDS	Natriumdodezylsulfat
SISmuc	Dünndarm Submukosa mit Mukosa
SH2	SRC Homolog 2 Domäne
S-Phase	Synthese-Phase (Zellzyklus)
STAT	Signaltransduktoren und Transkriptionsaktivatoren
Strep	Streptomycin
TBS-T	Tris-gepufferte Saline mit Tween
TEMED	N-Tetramethylethyldiamin
TERM	Lehrstuhl für <i>Tissue Engineering</i> und Regenerative Medizin
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor β
TKI	Tyrosin-Kinase-Inhibitor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
u.a.	unter anderem
v/v	Volumenprozent
VE	vollentsalzt
VEGF	Vakulär endothelialer Wachstumsfaktor
w/v	Gewichtsvolumen
WNK 1	Serin/Threonin-Kinase ohne Lysin K 1
ZEMM	Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin

7.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über die EGFR-Signalkaskade.

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Prinzipien des *Tissue Engineering*.

Abbildung 3: Einspannen der SISmuc in die Zellkrone.

Abbildung 4: Behandlungsschemata und Untersuchungen des statischen 3D Lungentumormodells.

Abbildung 5: Aufbau des Flussbioreaktors für das dynamische 3D Tumormodell.

Abbildung 6: Funktionsprinzip des CellTiterGlo[®] *luminescent* Zellvitalitätsassay

Abbildung 7: Wirkprinzip des RealTime-Glo[™] MT Zellvitalitätsassay.

Abbildung 8: Aufbau des *Western Blots*.

Abbildung 9: Lumineszenz-Signale des CellTiter-Glo[®] 3D Vitalitätsassays in 3D.

Abbildung 10: Optimierung der Zellyse im CellTiter-Glo[®] 3D Zellvitalitätsassay.

Abbildung 11: Anpassung der Menge an MT Zellvitalität Prosubstrat und NanoLuc[®] Luciferase an die 3D Lungentumormodelle.

Abbildung 12: Mittelwert und Standardabweichung der Lumineszenz-Signale zum Zeitpunkt T0 in den 5 verschiedenen Versuchsreihen.

Abbildung 13: Vitalität der HCC827-Zellen in der 2D Kultur nach dreitägiger Behandlung mit unterschiedlichen Gefitinib-Konzentrationen.

Abbildung 14: Wachstumsverhalten der HCC827-Zellen im statischen 3D Lungentumormodelle nach dreitägiger Behandlung mit unterschiedlichen Gefitinib-Konzentrationen.

Abbildung 15: Vitalität, Apoptose und Proliferation der HCC827-Zellen im statischen 3D Lungentumormodell nach Behandlung mit Gefitinib in unterschiedlichen Konzentrationen.

Abbildung 16: Vitalität der HCC827-Zellen in 24 h Behandlung mit Gefitinib.

Abbildung 17: Markerexpression in unbehandelten HCC827-Zellen sowie nach dreitägiger Behandlung mit 0,05 μM und 1 μM Gefitinib.

Abbildung 18: Expression von Signalproteinen und Menge der aktivierten Proteine in unbehandelten HCC827-Zellen sowie nach 9 h und 72 h Behandlung mit 0,05 μM und 1 μM Gefitinib im statischen 3D Tumormodell.

Abbildung 19: Proliferation und Apoptoserate in HCC827 und HCCres A2-Zellen nach dreitägiger Behandlung mit 1 μM Gefitinib.

Abbildung 20: Wachstumsverhalten von HCC827- und HCCres A2-Zellen im dynamischen 3D Lungentumormodell.

Abbildung 21: Charakterisierung unbehandelter HCC827- und HCCres A2-Zellen sowie nach dreitägiger Behandlung mit 1 μM Gefitinib.

Abbildung 22: Morphologie und Vitalität von HCC827- und HCCres A5-Zellen in der 2D Zellkultur.

Abbildung 23: Vereinfachter Überblick über die Phosphorylierungsstellen S15, S46 und S392 von p53.

Abbildung 24: Darstellung des Einflusses von Gefitinib auf den Zellzyklusarrest, die Apoptose und die Autophagie.

Abbildung 25: Darstellung der Array-Membranen nach 9-stündiger und 72-stündiger Behandlung der statischen 3D Lungentumormodelle mit 0,05 μM und 1 μM Gefitinib sowie einer unbehandelten Probe.

Abbildung 26: Darstellung der Array-Membranen nach Behandlung der HCC827-Zellen und der HCCres A2 Subpopulation mit 1 μM Gefitinib sowie einer unbehandelten Probe im dynamischen 3D Lungentumormodell.

7.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Geräte.

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Labormaterialien.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.

Tabelle 5: Übersicht über die Medien, Puffer und Lösungen für die Zellkultur.

Tabelle 6: Übersicht über Lösungen und Puffer für Histologie und Immunhistochemie.

Tabelle 7: Übersicht über Lösungen und Puffer für die Proteinchemie.

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Kits.

Tabelle 9: Übersicht über in der Immunhistochemie verwendete Antikörper.

Tabelle 10: Übersicht über die für *Western Blot* verwendeten Antikörper.

Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Zelllinien.

Tabelle 12: Übersicht über die verwendete Software.

Tabelle 13: Herstellung der SISmuc aus porcinem Dünndarm.

Tabelle 14: Protokoll des CellTiter-Glo[®] 3D Zellvitalitätsassay laut Herstellerangaben und mit variierten Parametern.

Tabelle 15: Protokoll des RealTime-Glo[™] MT Zellvitalitätsassay laut Herstellerangaben und mit variierten Parametern.

Tabelle 16: Protokoll der automatisierten Paraffineinbettungsmaschine.

Tabelle 17: Protokoll zum Entparaffinieren und Rehydrieren.

Tabelle 18: Protokoll der HE-Färbung.

Tabelle 19: Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung.

Tabelle 20: BSA Verdünnungsreihe.

Tabelle 21: Protokoll des humanen pRTK-Arrays.

Tabelle 22: Verdünnungsschema des humanen Phospho-RTK-Arrays.

Tabelle 23: Protokoll des humanen pK-Array.

Tabelle 24: Verdünnungsschema des humanen pK-Arrays.

Tabelle 25: Beurteilung der Phosphorylierung im pRTK-Array.

Tabelle 26: Einteilung der prozentualen Phosphorylierungsgrade im pK-Array.

Tabelle 27: Protokoll des Proteinnachweises beim *Western Blot*.

Tabelle 28: Vergleich von Signalmolekülen der HCC827 Zellen nach 9 und 72 h Behandlung mit Gefitinib mit Hilfe des pRTK-Arrays.

Tabelle 29: Vergleich von Signalmolekülen der HCC827 Zellen nach 9 und 72 h Behandlung mit Gefitinib mit Hilfe des pK-Arrays.

Tabelle 30: Vergleich von Signalmolekülen in HCC827 und HCCres A2.

Tabelle 31: Vergleich von Signalmolekülen in HCC827 und HCCres A2.

Tabelle 32: Übersicht über die verwendeten Abkürzungen.

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen, die mich über die Jahre begleitet, getragen, motiviert und damit diese Doktorarbeit möglich gemacht haben.

Allen voran gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Thorsten Walles, der mich trotz Stellenwechsel und Umzug immer zuverlässig betreute und durch den ich mich unerwarteter Weise doch an eine experimentelle Arbeit wagte. Ich habe es nie bereut – Danke!

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Claudia, die mir geduldig die Grundlagen der Laborarbeit nahelegte, mich stetig vor dem Chaos rettete und für den planmäßigen Ablauf meiner Versuche sorgte.

Sarah und Gudrun – ihr habt mich am TERM immer aus dem Hintergrund unterstützt und vorangebracht und seid dann auf dem Endspurt nochmal heroisch zu meiner Hilfe geeilt. Danke für alle Korrekturen, Anmerkungen und Erklärungen!

Frau Prof. Heike Walles und allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für *Tissue Engineering* möchte ich für alle helfenden Hände und die liebevolle Adoption einer unerfahrenen Medizinstudentin danken.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden.

Meinen Freunden für alle Ratschläge, liebevollen Worte und Unternehmungen. Meinen Geschwistern und Cousinchen danke ich für das aufrichtige Interesse an meiner Arbeit (*Was machst du da eigentlich? Und Hast du deine Zellen heute schon gefüttert?*). Ihr habt mich Dinge immer aufs Neue hinterfragen lassen und für willkommene Ablenkung gesorgt.

Meinen Großeltern, die mich liebevoll mahnend jede Woche nach dem Stand der Arbeit fragten und nebenher für leibliches und seelisches Wohl sorgten.

Den Medizinerinnen in meiner Familie, besonders meiner Patentante, die mir Vorbilder in Klinik, Forschung und Lehre sind und mich meinen Weg (in der Chirurgie ☺) gehen lassen.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern – ich bin glücklich. Meine Entscheidung Ärztin zu werden (und eigentlich auch alle anderen Entscheidungen) habt ihr nie hinterfragt und immer aufs Vollste unterstützt. In allen schwierigen Zeiten seid ihr da, fangt auf und motiviert. Ihr macht mich zu der die ich bin. Danke.

Lebenslauf

Schulbildung	1998-2001 2001-2005 2005-2010	Europäische Schule Brüssel II, Belgien Deutsche Schule Seoul, Süd Korea Europäische Schule Brüssel II, Belgien Europäisches Abitur 07/2010 (94/100)
Studium der Humanmedizin	10/2010- 11/2017	Julius-Maximilians-Universität, Würzburg 1. Staatsexamen: 08/2012 (1,5) 2. Staatsexamen: 10/2016 (2,0) 11/2017 (2,0)
	08/2013- 06/2014	Auslandsstudium: Universidad de Guadalajara, Mexiko
Stipendium	10/2010- 11/2017	Studienstiftung des deutschen Volkes
Promotion	04/2015- 05/2020	Dosis-Wirkungsbeziehungen von Gefitinib in einem humanen Lungentumormodell. Prof. Dr. med. Thorsten Walles, aus der Klinik und Poliklinik für Thorax-, Herz- und Thorakale Gefäßchirurgie
Assistenzärztin für Kinderchirurgie	Seit 01.09.2018	Kinderchirurgische Klinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital München
Sprachen		Deutsch (Muttersprache) Englisch (fließend) Spanisch (fließend) Französisch (fließend)

München, Mai 2020