



**Etablierung eines humanen 3D Lungentumor-Testsystems zur
Analyse von Behandlungseffekten**

**Establishment of a human 3D lung tumor test system for the
analysis of treatment effects**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse: Biomedizin

Vorgelegt von

Claudia Göttlich

geboren in Zittau

angefertigt am

Universitätsklinikum Würzburg,
Lehrstuhl Tissue Engineering und Regenerative Medizin

Würzburg 2017

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Peter Heuschmann
1. Betreuer:	Prof. Dr. Heike Walles
2. Betreuer:	Prof. Dr. Thomas Dandekar
3. Betreuer:	Prof. Dr. Dr. h.c. H. K. Müller-Hermelink

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Zusammenfassung

Lungenkrebs ist weltweit für die meisten krebsassoziierten Tode verantwortlich. Ursache dafür ist unter anderem, dass viele Medikamente in der klinischen Anwendung, aufgrund nicht übertragbarer Ergebnisse aus der Präklinik, scheitern. Zur Entwicklung neuer Therapiestrategien werden deshalb Modelle benötigt, welche die *in vivo* Situation besser widerspiegeln. Besonders wichtig ist es dabei, zu zeigen, für welche Fragestellungen ein neues Testsystem valide Ergebnisse liefert.

In dieser Arbeit ist es mit Hilfe des Tissue Engineering gelungen, ein humanes 3D *in vitro* Lungentumor-Testsystem weiter zu entwickeln und für verschiedene Fragestellungen zu validieren. Zudem konnten sowohl für die Herstellung als auch für die Behandlung der Tumormodelle SOPs etabliert werden. Hier wurde zunächst beobachtet, dass die Auswerteparameter für die Beurteilung von Behandlungseffekten eine geringe Varianz aufweisen und das 3D Modell deshalb als Testsystem geeignet ist.

Ein Vergleich der Morphologie, des EMT-Status und der Differenzierung der Tumorzelllinien im 3D Modell mit Tumorbiosaten von Adenokarzinompatienten verdeutlichte, dass die 3D Modelle tumorrelevante Merkmale besitzen. So sind die Zelllinien auf der biologischen Matrix, verglichen mit der jeweiligen 2D Kultur, durch eine reduzierte Proliferationsrate gekennzeichnet, welche eher der *in vivo* Situation entspricht. Für die Etablierung und Validierung des 3D Modells als Testsystem war es notwendig, klinisch relevante Therapien in dem Modell anzuwenden und die Ergebnisse der Behandlung *in vitro* mit denen im Patienten zu vergleichen. Dabei konnte zunächst bestätigt werden, dass eine zielgerichtete Therapie gegen den EGFR in dem 3D System zu einer verstärkten Induktion der Apoptose im Vergleich zu 2D führt. Dies entspricht klinischen Beobachtungen, bei denen *EGFR*-mutierte Patienten gut auf eine Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) ansprechen. Anschließend wurde in dieser Arbeit erstmals *in vitro* gezeigt, dass die Behandlung mit einem HSP90-Inhibitor bei *KRAS*-Mutation wie in behandelten Patienten keine eindeutigen Vorteile bringt, diese jedoch in Experimenten der 2D Zellkultur mit den entsprechenden Zelllinien vorhergesagt werden. Die Ergebnisse aus dem *in vitro* Modell spiegeln damit verschiedene klinische Studien wider und unterstreichen das Potenzial des 3D Lungentumor-Testsystems die Wirkung zielgerichteter Therapien vorherzusagen. Durch die Messung von Signalwegsaktivierungen

über Phospho-Arrays und Western Blot konnten in dieser Arbeit Unterschiede zwischen 2D und 3D nach Behandlung gezeigt werden. Diese lieferten die Grundlage für bioinformatische Vorhersagen für Medikamente.

Mit fortschreitender Erkrankung und dem Entstehen invasiver Tumore, die möglicherweise Metastasen bilden, verschlechtert sich die Prognose von Krebspatienten. Zudem entwickeln Patienten, die zunächst auf eine Therapie mit TKI ansprechen, bereits nach kurzer Zeit Resistenzen, die ebenfalls zur Progression des Tumorwachstums führen. Zur Wirkungsuntersuchung von Substanzen in solchen fortgeschrittenen Erkrankungsstadien wurde das bestehende Testsystem erweitert. Zum einen wurde mit Hilfe des Wachstumsfaktors TGF- β 1 eine EMT ausgelöst. Hier konnte beobachtet werden, dass sich die Expression verschiedener EMT- und invasionsassoziierter Gene und Proteine veränderte und die Zellen vor allem in dynamischer Kultur verstärkt die Basalmembran der Matrix überquerten. Zum anderen wurde die Ausbildung von Resistenzen gegenüber TKI durch die Generierung von resistenten Subpopulationen aus einer ursprünglich sensitiven Zelllinie und anschließender Kultivierung auf der Matrix abgebildet. Dabei zeigte sich keine der klinisch bekannten Mutationen als ursächlich für die Resistenz, sodass weitere Mechanismen untersucht wurden. Hier konnten Veränderungen in der Signaltransduktion sowie der Expression EMT-assoziierter Proteine festgestellt werden.

Im letzten Teil der Arbeit wurde eine neuartige Behandlung im Bereich der Immuntherapie erfolgreich in dem 3D Modell angewendet. Dafür wurden T-Zellen, die einen chimären Antigen-Rezeptor (CAR) gegen ROR1 tragen, in statischer und dynamischer Kultur zu den Tumorzellen gegeben und der Therapieeffekt mittels histologischer Färbung und der Bestimmung der Apoptose evaluiert. Zusätzlich konnten Eigenschaften der T-Zellen, wie deren Proliferation sowie Zytokinausschüttung quantifiziert und damit eine spezifische Wirkung der CAR transduzierten T-Zellen gegenüber Kontroll-T-Zellen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend ist es in dieser Arbeit gelungen, ein humanes 3D Lungentumor-Testsystem für die Anwendung in der präklinischen Entwicklung von Krebsmedikamenten sowie der Grundlagenforschung im Bereich der Tumorbiologie zu etablieren. Dieses Testsystem ist in der Lage relevante Daten zu Biomarker-geleiteten Therapien, zur Behandlung fortgeschrittener Tumorstadien und zur Verbesserung neuartiger Therapiestrategien zu liefern.

Abstract

Lung cancer is the most common cause of cancer related deaths worldwide. One reason for this is that many drugs fail in the clinical application due to inefficient transferability of preclinical results. Consequently, for the development of new treatment strategies tumor models that better reflect the *in vivo* situation are required. It is of special significance to show for which questions a new test system provides valid results.

In the here presented work, a human 3D *in vitro* lung tumor test system was refined and validated for different interrogations using tissue engineering methods. The generation of the model as well as its treatment were defined in SOPs. First, it was shown that the variance of the analysis parameters was low, demonstrating the 3D model to be suitable as a test system.

A comparison of the morphology, the EMT status and the differentiation of the tumor cell lines in the 3D model with tumor biopsies from adenocarcinoma patients revealed that the 3D tumor models exhibit tumor relevant characteristics. The cells on the matrix had a lower proliferation rate compared to the respective 2D culture that better mimic the *in vivo* situation. For the establishment and validation of the test system, clinically relevant therapies were applied and the results of the treatment *in vitro* were compared to those in patients. By doing so, it was confirmed that a targeted therapy against the EGFR led to an increased apoptosis induction in the 3D system compared to 2D. This resembles clinical observations, in which *EGFR*-mutated patients respond to the therapy with tyrosine kinase inhibitors (TKIs). Next, it was shown for the first time *in vitro* in the 3D model that the treatment with a HSP90 inhibitor in the context of a *KRAS* mutation has no clear advantages as observed in patients, but which had been predicted in 2D cell culture. The results from the *in vitro* model match several clinical studies and emphasize the potential of the 3D lung tumor test system to predict the effect of targeted treatments. By measuring the activation of signal transduction pathways using phosphoarrays and western blots, differences between 2D and 3D after treatment were shown. These provided the basis for bioinformatic drug predictions.

With the progress of the disease and the development of invasive tumors that might form metastases, the prognosis of patients worsens. Additionally, patients that initially

respond to a therapy with TKIs develop resistances that also lead to the progression of tumor growth. To evaluate the effect of substances in these life-threatening disease stages, the existing test system was enhanced. On the one hand EMT was induced by addition of the growth factor TGF- β 1. Here, it was observed that the expression of several EMT- and invasion-associated genes and proteins changed and the cells crossed the basement membrane to a higher extent, especially in the dynamic culture. On the other hand, the development of resistances against TKIs was represented by the generation of resistant subpopulations from an initial sensitive cell line and subsequent culture on the matrix. In the course of this experiment, none of the known mutations could be attributed to the resistance, so that other potential mechanisms were investigated. Here, changes in the signal transduction as well as in the expression of EMT-associated proteins were found.

In the last part of the thesis, a new treatment strategy in the field of immune therapies was successfully tested in the 3D model. For that, T cells bearing a chimeric antigen receptor (CAR) against ROR1 were added to the tumor cells in static and dynamic culture. The therapy effect was determined by histological staining and apoptosis measurement. Moreover, the characteristics of the T cells, such as proliferation or cytokine release, were quantified and exhibited a specific effect of the CAR transduced T cells compared to the control T cells.

In summary, in this thesis a human 3D lung tumor test system was established for the application in preclinical testing of cancer drugs as well as for basic research in tumor biology. It was shown that the test system can provide relevant data on biomarker-driven therapies, the treatment of advanced tumor stages and the improvement of new treatment strategies.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	III
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis	XII
Abbildungsverzeichnis.....	XIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Epidemiologie von Lungenkrebs	1
1.2 Zielgerichtete Therapien beim Lungenkrebs.....	1
1.3 Primäre und sekundäre Resistenzen der Therapie mit EGFR-TKI	6
1.4 Epithelial-Mesenchymale Transition	9
1.5 Krebsimmuntherapie	14
1.6 Modelle zur Testung von Therapiestrategien.....	16
1.7 Tissue Engineering	21
2 Zielsetzung.....	24
3 Materialien.....	25
3.1 Biologisches Material.....	25
3.1.1 Zelllinien.....	25
3.1.2 Tumorbiopsate	26
3.1.3 Schweinematix: SISmuc	27
3.2 Xenograftmodelle.....	27
3.3 Kits	28
3.4 Antikörper	29
3.5 Primer	31
3.6 Chemikalien	31
3.7 Medien, Puffer und Lösungen	35
3.8 Verbrauchs- und Labormaterialien.....	39
3.9 Laborgeräte.....	43
3.10 Software	45
4 Methoden	46
4.1 Allgemeine Zellkulturtechniken.....	46
4.1.1 Kultivierung der Zelllinien HCC827, A549 und H441	46
4.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	46
4.1.3 Medienwechsel der Zelllinien	47
4.1.4 Passagieren der Zelllinien.....	47
4.1.5 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung.....	48
4.2 2D Zellkultur	49
4.3 Aufbau von einem humanen 3D Tumortestsystem	49
4.3.1 Herstellung des Scaffolds SISmuc	49
4.3.2 Aufbau des Tumormodells	50
4.3.3 Statische Kultivierung	51

4.3.4	Dynamische Kultivierung.....	51
4.3.5	Stimulation mit TGF- β 1	52
4.3.6	Behandlung mit zielgerichteten Inhibitoren	52
4.3.7	Behandlung mit ROR1-spezifischen CAR T-Zellen.....	53
4.4	Etablierung von Gefitinib-resistenten Subpopulationen	54
4.5	Zellvitalitätsassays	54
4.5.1	CellTiter-Glo [®] Assay.....	54
4.5.2	CellTiter-Glo [®] 3D Assay.....	55
4.5.3	RealTime-Glo [™] MT Assay.....	56
4.6	Apoptosemessung.....	57
4.7	Histologische und immunhistologische Charakterisierung.....	58
4.7.1	Fixieren von Zellen und Gewebe	58
4.7.2	Paraffineinbettung und Anfertigung von Paraffinschnitten	59
4.7.3	Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte	59
4.7.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	60
4.7.5	Immunfluoreszenzfärbung.....	61
4.8	Bestimmung der Proliferationsrate.....	62
4.9	Quantifizierung der in die Matrix eingewanderten Zellen	63
4.10	Ultrastrukturelle Analyse	63
4.11	Proteinanalyse	64
4.11.1	Herstellung von Tumorzelllysaten	64
4.11.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	64
4.11.3	Proteinfällung	65
4.11.4	Phospho-Protein-Arrays	65
4.11.4.1	Phospho-Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Array	66
4.11.4.2	Phospho-Kinase-Array.....	66
4.11.4.3	Semi-quantitative Auswertung der Array Signale	67
4.11.5	Western Blot.....	67
4.12	Genexpressionsanalyse.....	68
4.12.1	Expression der miRNA-21	68
4.12.1.1	miRNA-Isolation.....	68
4.12.1.2	RT und qRT-PCR zur miRNA-Quantifizierung	68
4.12.2	Genexpressionsanalyse.....	70
4.12.2.1	RNA-Isolation mit dem RNeasy [®] Mini Kit.....	70
4.12.2.2	RNA-Isolation mit dem RNeasy [®] Micro Kit.....	71
4.12.2.3	cDNA-Synthese	71
4.12.2.4	qRT-PCR zur mRNA-Quantifizierung	72
4.13	DNA-Sequenzierung	73
4.14	Statistische Auswertung	74
5	Ergebnisse.....	75
5.1	Charakterisierung des humanen 3D Lungentumor-Testsystems.....	75
5.1.1	Aufbau des 3D Tumortestsystems.....	75

5.1.2	Untersuchung von Markern der Tumorbiologie sowie der Proliferation in Patientenmaterial, Xenografts und 2D im Vergleich mit dem 3D Tumormodell.....	76
5.1.3	Varianz der Analyseparameter Proliferation und Apoptose.....	87
5.1.4	Vitalität als zusätzlicher Analyseparameter in 3D	89
5.2	Etablierung des 3D Testsystems anhand zielgerichteter Therapien.....	90
5.2.1	Biomarkergeleitete anti-EGFR-Therapie mit Gefitinib.....	90
5.2.2	Anti-HSP90-Therapie mit 17-AAG bei <i>KRAS</i> -Mutation.....	95
5.3	Darstellung von fortgeschrittenen Tumorstadien.....	100
5.3.1	Induktion von EMT und Invasion durch TGF- β 1-Stimulation	100
5.3.2	Charakterisierung von Gefitinib-resistenten Subpopulationen	107
5.4	Testung alternativer Therapiestrategien im 3D Tumormodell.....	114
6	Diskussion.....	118
6.1	Charakterisierung des humanen 3D Lungentumor-Testsystems.....	118
6.2	Etablierung des 3D Testsystems anhand zielgerichteter Therapien.....	124
6.3	Darstellung von fortgeschrittenen Tumorstadien.....	129
6.4	Testung alternativer Therapiestrategien im 3D Tumormodell.....	139
7	Ausblick.....	142
	Literatur	144
	Anhang.....	164
	Eidesstattliche Erklärung	184
	Danksagung	185
	Lebenslauf.....	188
	Publikationen	189

Abkürzungsverzeichnis

2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
A	Alanin
AGR2	<i>Anterior gradient protein 2 homolog</i>
Akt	Proteinkinase B
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
β -Cat	β -Catenin
BioVaSc [®]	<i>Biological Vascularized Scaffold</i>
C	Cystein
CAR	Chimärer Antigen-Rezeptor
cDNA	<i>Complementary</i> , komplementäre DNA
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECM	<i>Extracellular matrix</i> , extrazelluläre Matrix
E-Cad	Epitheliales Cadherin
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMT	Epithelial-Mesenchymale-Transition
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i> , epitheliales Zelladhäsionsmolekül
ErbB2	<i>HER2, human epidermal growth factor receptor 2</i> , humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
Erk	<i>Extracellular-signal regulated kinases</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
G	Glycin
gDNA	Genomische DNA
Gef	Gefitinib

GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> , saures Gliafaserprotein
GrB-2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GTPase	Guanosin-Triphosphat-Hydrolase
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i> , hepatozytischer Wachstumsfaktor
HGFR	<i>Hepatocyte growth factor receptor</i> , hepatozytischer Wachstumsfaktor-Rezeptor
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HSP	Hitzeschockprotein
IGF1R	<i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i> , Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-Rezeptor 1
IF	Immunfluoreszenzfärbung
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemische Färbung
IPASS	<i>Iressa Pan-Asia Study</i>
JAK	Januskinase
Kol IV	Kollagen IV
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
KT-Zellen	Kontroll-T-Zellen
M	Methionin
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	MAPK/Erk-Kinase
MET	Mesenchymal-Epitheliale-Transition
<i>MET</i> (Gen)	Gen für den hepatozytischen Wachstumsfaktor-Rezeptor
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
miRNA	Mikro-RNA
MSPR	<i>Macrophage stimulating protein receptor 1</i>
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i> oder <i>mammalian target of rapamycin</i>
MUC-1	Mucin-1
MW	Medienwechsel
NGS	<i>Next generation sequencing</i> , Sequenzierung der nächsten Generation
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle

NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i> , nicht kleinzelliges Karzinom
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PBMC	<i>Peripheral blood mononucleic cells</i> , mononukleären Zellen des peripheren Blutes
PCK	<i>Pan Cytokeratin</i> , pan-Zytokeratin
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PD-1/ PDL-1	<i>Programmed cell death receptor/ligand 1</i>
PDX	<i>Patient-derived xenograft</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PK-Array	Phospho-Kinase-Array
PKC	Proteinkinase C
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
Q	Glutamin
qRT-PCR	<i>Quantitative real time polymerase chain reaction</i>
R	Arginin
RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i> oder <i>rat fibrosarcoma</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROR1	<i>Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1</i>
RPMI	<i>RosWell Park Memorial Institute</i>
Rt	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
S	Serin
SCLC	<i>Small cell lung cancer</i> , kleinzelliges Karzinom
SERPINE1	<i>Serine proteinase inhibitor family E member 1</i>
SHC	<i>SHC transforming protein</i>
SISMuc	<i>Small Intestinal Submucosa</i> mit <i>Mucosa</i>
SOP	<i>Standard operation procedure</i>

SP-A	<i>Major surfactant apoprotein</i>
SPINK1	<i>Serine protease inhibitor Kazal-type 1</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
T	Threonin
TβR	TGF-β-Rezeptor
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFPI2	<i>Tissue factor pathway inhibitor 2</i>
TJ	<i>Tight junction</i>
TKI	Tyrosin-Kinase-Inhibitor
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
VE	Vollentsalzt
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VF	Verdünnungsfaktor
Vim	Vimentin
WB	Western Blot
WNK1	<i>WNK Lysine Deficient Protein Kinase 1</i>
w/o	Ohne
ZO-1	<i>Zonula occludens</i>

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Treibermutationen und Genveränderungen im NSCLC	5
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Zelllinien.....	25
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Biopsate	27
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Kits.....	28
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Antikörper.....	29
Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Primer	31
Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Chemikalien.....	31
Tabelle 8: Medien und Lösungen für die Zellkultur und zur Dezellularisierung	35
Tabelle 9: Puffer und Lösungen für die Histologie und Immunhistologie	36
Tabelle 10: Puffer und Lösungen für die Proteinbiochemie.....	37
Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	39
Tabelle 12: Übersicht der verwendeten Labormaterialien.....	41
Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Laborgeräte	43
Tabelle 14: Übersicht der verwendeten Software.....	45
Tabelle 15: Aussaatdichte der Zelllinien	48
Tabelle 16: Aussaatdichten der Zellen in 2D Kultur	49
Tabelle 17: Messprogramm für den CellTiter-Glo [®] Assay	55
Tabelle 18: Messprogramm für den CellTiter-Glo [®] 3D Assay	56
Tabelle 19: Messprogramm für den M30 CytoDeath [™] ELISA.....	58
Tabelle 20: Programm zur Paraffineinbettung.....	59
Tabelle 21: Entparaffinieren und Rehydrieren von Gewebeschnitten.....	60
Tabelle 22: Protokoll zur H&E-Färbung	60
Tabelle 23: Protokoll zur Immunfluoreszenzfärbung	61
Tabelle 24: Bestimmung der Proliferationsrate	62
Tabelle 25: Reaktionsansatz zum Umschreiben der miRNA	69
Tabelle 26: Thermocycler Einstellungen zum Umschreiben der miRNA	69
Tabelle 27: Einstellungen für die qRT-PCR zur miRNA Quantifizierung.....	69
Tabelle 28: Temperaturprotokoll der cDNA-Synthese im Thermocycler	72
Tabelle 29: Temperaturprotokoll für die qRT-PCR	72
Tabelle 30: Nachweis von epithelialen und mesenchymalen Markern in Biopsaten	78
Tabelle 31: Nachweis von epithelialen und mesenchymalen Markern in Xenografts ...	80
Tabelle 32: Markeranalyse der Zelllinien unter verschiedenen Kulturbedingungen.....	86
Tabelle 33: Proliferationsraten der Tumorzellen	87
Tabelle 34: Variationskoeffizienten der Analyseparameter	88
Tabelle 35: Änderung der Signaltransduktion nach Gefitinib-Behandlung	95
Tabelle 36: Änderung der Signaltransduktion nach Behandlung mit 17-AAG.....	100
Tabelle 37: Mutationen der resistenten Subpopulationen im Vergleich zu HCC827...	109
Tabelle 38: Änderung der Signaltransduktion in den resistenten Zellen.....	114

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema des EGFR-Signalwegs	3
Abbildung 2: Klinisch relevante Mutationen in der Kinase-Domäne des <i>EGFR</i>	7
Abbildung 3: EMT und MET bei der Entstehung und Progression von Karzinomen....	11
Abbildung 4: SMAD-abhängige und -unabhängige TGF- β -Signalwege	12
Abbildung 5: Das Prinzip des Tissue Engineering	22
Abbildung 6: Flussreaktoraufbau für die dynamische 3D Kultur.....	52
Abbildung 7: Schema für die Behandlung des 3D Tumormodells.....	53
Abbildung 8: Epitheliales Wachstum der Tumorzellen auf der SISmuc	75
Abbildung 9: Markeranalyse von Tumorbiopsaten	77
Abbildung 10: Analyse von tumorrelevanten Markern in Xenografts	79
Abbildung 11: HCC827-Zellen in 2D, im 3D statischen und dynamischen System.....	82
Abbildung 12: A549-Zellen in 2D, im 3D statischen und dynamischen System.....	83
Abbildung 13: H441-Zellen in 2D, im 3D statischen und dynamischen System.....	85
Abbildung 14: Schwankungen der Analyseparameter Proliferation und Apoptose	88
Abbildung 15: Lumineszenzsignale des RealTime-Glo TM -Vitalitätsassays in 3D.....	90
Abbildung 16: Biomarkerspezifische Antwort auf Gefitinib in 2D und 3D.....	91
Abbildung 17: Phospho-RTK-Array nach Gefitinib-Behandlung in 2D und 3D.....	93
Abbildung 18: PK-Array nach Gefitinib-Behandlung in 2D und 3D.....	94
Abbildung 19: Sensitivität der Zelllinien gegenüber 17-AAG in 2D.....	96
Abbildung 20: Behandlung mit dem HSP90-Inhibitor 17-AAG in 2D und 3D	97
Abbildung 21: Proliferation und Apoptose nach Behandlung mit 17-AAG	98
Abbildung 22: Signalwegsanalyse nach HSP90-Inhibitor-Behandlung in 2D und 3D ..	99
Abbildung 23: EMT-Induktion durch TGF- β 1 in HCC827-Zellen	101
Abbildung 24: EMT-Induktion durch TGF- β 1 in A549-Zellen	103
Abbildung 25: Quantifizierung der in die Matrix eingewanderten Zellen	104
Abbildung 26: Genexpression TGF- β 1-stimulierter Tumorzellen in 2D und 3D	105
Abbildung 27: Gefitinib-Behandlung von TGF- β 1-stimulierten HCC827-Zellen.....	106
Abbildung 28: Resistenzentwicklung in HCC827-Subpopulationen	107
Abbildung 29: Proliferation und Apoptose in den resistenten Subpopulationen.....	108
Abbildung 30: MiRNA-21-Expression in den resistenten Subpopulationen.....	110
Abbildung 31: Markerexpression der HCCres A2 und A3 im Vergleich zu HCC827. 111	
Abbildung 32: Morphologie der resistenten Zellen.....	112
Abbildung 33: Signalwegsanalyse der Gefitinib-resistenten Subpopulationen.....	113
Abbildung 34: Behandlung mit ROR1-CAR T-Zellen im Bioreaktor	115
Abbildung 35: Proliferation der ROR1-CAR T- und KT-Zellen	116

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie von Lungenkrebs

Das Robert Koch-Institut rechnet für Deutschland mit einem Anstieg der Lungenkrebsneuerkrankungen auf insgesamt 59.900 für das Jahr 2020 (RKI, 2016). Zudem steigen, aufgrund der immer älter werdenden Menschen und der wachsenden Bevölkerungsdichte, die globalen Kosten für die Behandlung von Krebserkrankungen immer weiter an. Lungenkrebs ist die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung und besitzt mit weltweit 1,6 Millionen Todesfällen pro Jahr ebenfalls die höchste Mortalitätsrate (Jemal *et al.*, 2011; Bray *et al.*, 2013; Ferlay *et al.*, 2015). Obwohl in den letzten Jahren viel daran geforscht wurde die Krankheit früh zu diagnostizieren und effektive Therapien zu finden, beträgt die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit bei Lungenkrebs lediglich 15 % (Ettinger, 2012). Die zwei Hauptformen des Lungenkrebs sind das kleinzellige (SCLC, ca. 15 %) und das nichtkleinzellige Karzinom (NSCLC, ca. 85 %). Weiterhin werden im NSCLC drei histologische Subtypen unterschieden: das Plattenepithelkarzinom, das großzellige Karzinom sowie das Adenokarzinom. Letzteres kommt in 50 % der Lungenkrebspatienten vor und hat seinen Ursprung meist in der Peripherie der Lunge. Es ist der häufigste diagnostizierte Subtyp bei Patienten, die nie geraucht haben (Herbst *et al.*, 2008). Hingegen ist Rauchen, welches der wichtigste Risikofaktor für Lungenkrebs ist, besonders mit der Entstehung von SCLC und Plattenepithelkarzinomen assoziiert (Sun *et al.*, 2007; Herbst *et al.*, 2008). Diese zwei Formen entstehen meist in den zentralen Atemwegen. Die Behandlung von Lungenkrebs ist jeweils vom spezifischen Subtyp, dem Metastasierungsgrad und dem Zustand des Patienten abhängig und reicht von der Entnahme des Tumors über Chemotherapie sowie Strahlentherapie bis hin zur palliativen Pflege (Vansteenkiste *et al.*, 2013). Ein metastasierendes NSCLC im Stadium IV gilt jedoch, trotz verschiedenster Behandlungsstrategien, als eine unheilbare Erkrankung (Hanna *et al.*, 2017).

1.2 Zielgerichtete Therapien beim Lungenkrebs

In den letzten Jahren haben technologische Entwicklungen wie die Sequenzierung der nächsten Generation (NGS), genetisch modifizierte Mausmodelle und das Erstellen von

Datenbanken der molekularen Eigenschaften von Tumoren dazu beigetragen die molekulare Biologie des NSCLC besser zu verstehen (Zalcman *et al.*, 2010). So konnten in 62 % der Adenokarzinome onkogene Treiber identifiziert werden. Dies führte zur Rekrutierung der Patienten in klinische Studien für die Evaluierung neuer therapeutischer Ziele, vor allem in der palliativen Krebstherapie (Villaruz *et al.*, 2013). Daraus resultierend wurden, wie in Tabelle 1 gezeigt, zahlreiche Medikamente zur zielgerichteten Therapie von Patienten mit einem bestimmten Mutationshintergrund entwickelt und zugelassen (www.onkopedia.com). Einen Meilenstein stellt dabei die Therapie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI), welche gegen den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) gerichtet sind, dar. Der EGFR ist ein Mitglied der ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK)-Familie und ist bedeutend für die Aktivierung verschiedener Signalwege wie die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase B (Akt)-, die Januskinase (JAK)/*Signal transducers and activators of transcription* (STAT)- sowie die Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade (Yarden und Sliwkowski, 2001; Pao und Miller, 2005; Goffin und Zbuk, 2013). Über diese in Abbildung 1 dargestellten Signalwege werden wichtige Prozesse wie Wachstum, Proliferation, Apoptose und Zellmotilität gesteuert (Goffin und Zbuk, 2013). In vielen Tumoren epithelialen Ursprungs ist der EGFR hochreguliert (Hynes und Lane, 2005). So zeigen 40 bis 80 % der NSCLC-Patienten eine Überexpression dieses Rezeptors (Arteaga, 2003). Zudem kommen eine Reihe aktivierender Mutationen vor, die zu einer dauerhaften Signaltransduktion über den EGFR und somit zu einer Progression der Erkrankung führen (Gomez *et al.*, 2013). Im Jahr 2009 wurde in der *Iressa Pan-Asia*-Studie (IPASS) zum ersten Mal gezeigt, dass eine zielgerichtete Therapie mit dem EGFR-TKI Gefitinib einer konventionellen Chemotherapie in *EGFR*-mutierten Populationen überlegen ist (Mok *et al.*, 2009). Dabei lebten von den Patienten mit *EGFR*-Mutation diejenigen, die Gefitinib (Handelsname Iressa[®], N-(3-Chlor-4-fluorphenyl)-7-methoxy-6-[3-(morpholin-4-yl)propoxy]-chinazolin-4-amin) bekamen, durchschnittlich neuneinhalb Monate, ohne dass sich der Krankheitszustand verschlechterte, verglichen mit etwa sechs Monaten bei den Patienten der Carboplatin-Paclitaxel-Gruppe (Goffin und Zbuk, 2013). Im Gegensatz dazu verkürzte die Therapie mit dem TKI in den nicht-mutierten Patienten das progressionsfreie Überleben signifikant im Vergleich zur Kombinationstherapie (Mok *et al.*, 2009; Villaruz *et al.*, 2013).

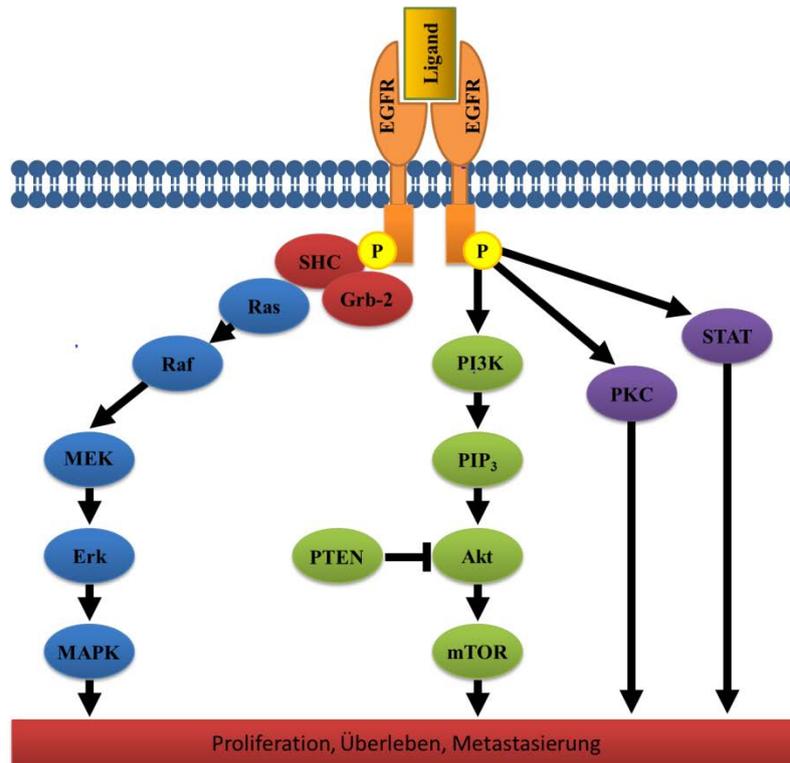


Abbildung 1: Schema des EGFR-Signalwegs

Die Bindung des Liganden führt zur Homo- oder Heterodimerisierung des Rezeptors mit anderen Vertretern der ErbB-Familie und anschließender Autophosphorylierung der zytosolischen Tyrosin-Kinase-Domäne. Diese vermittelt mit Hilfe sogenannter Adapterproteine wie SHC und Grb-2 die Signaltransduktion über nachgeschaltete Proteine und stimuliert so die Proliferation, inhibiert die Apoptose und fördert Metastasierungsprozesse. Akt: Proteinkinase B; EGFR: epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor; Erk: *extracellular-signal regulated kinases*; Grb-2: *growth factor receptor-bound protein 2*; MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase; MEK: MAPK/Erk Kinase; mTOR: *mechanistic target of rapamycin*; PKC: Proteinkinase C; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; PIP₃: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat; PTEN: *phosphatase and tensin homolog*; RAF: *rapidly accelerated fibrosarcoma*; RAS: *rat sarcoma*; SHC: *SHC transforming protein*; STAT: *signal transducers and activators of transcription*. Abbildung modifiziert nach Goffin und Zbuk, 2013.

Gefitinib und Erlotinib, ein weiterer TKI der ersten Generation, sind reversible Inhibitoren der Adenosintriphosphat (ATP)-Bindungsstelle des EGFR. Dabei resultiert eine bestimmte Mutation im Exon 18, 19 oder 21 der RTK-Domäne des EGFR in einer begünstigten Bindung von Gefitinib oder Erlotinib gegenüber ATP (Pao und Chmielecki, 2010; Jorge *et al.*, 2014). Da das Überleben von *EGFR*-mutierten NSCLC-Zellen von der Kinaseaktivität abhängig ist, führt die Inhibierung des Signalwegs mit TKI zum Zelltod, welcher durch den intrinsischen Apoptose-Signalweg vermittelt wird (Pao und Chmielecki, 2010). Neben Gefitinib und Erlotinib wurden weitere TKI gegen den

EGFR entwickelt, die eine verbesserte Wirkung bei den auftretenden Resistenzen zeigen, da sie zum Beispiel irreversibel in der ATP-Bindungsstelle binden (siehe auch Abschnitt 1.3 Resistenzentwicklung nach zielgerichteter Therapie; Goffin und Zbuk, 2013).

Auch für andere onkogene Treibermutationen und Genveränderungen wurden zielgerichtete Inhibitoren erfolgreich in den klinischen Alltag implementiert (Tabelle 1). Dieses Spektrum an zielgerichteten Therapien macht die Bedeutung der Notwendigkeit einer molekularbiologischen Charakterisierung von Tumoren sowie die Stratifizierung von Patienten anhand spezifischer Biomarker besonders deutlich. Punktmutationen im *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS)*-Gen, welche mit einer Wahrscheinlichkeit von 20 bis 30 % in NSCLC-Patienten auftreten, gelten jedoch bisher als nicht behandelbar (Hammerman *et al.*, 2009; Acquaviva *et al.*, 2012; de Castro Carpeno und Belda-Iniesta, 2013). Diese Mutationen beeinträchtigen die intrinsische Aktivität der Guanosin-Triphosphat-Hydrolase (GTPase) und verhindern damit die Hydrolyse von GTP, was zu einer dauerhaften Aktivierung der RAS-Effektorsignalwege führt (de Castro Carpeno und Belda-Iniesta, 2013). Aufgrund der Aktivierung werden das Überleben sowie die Proliferation von Krebszellen gefördert, sodass *KRAS*-Mutationen mit einer schlechten Prognose bezüglich der Lebenserwartung assoziiert sind. Zudem sprechen Patienten mit einer *KRAS*-Mutation nicht auf adjuvante Chemotherapie oder EGFR-TKI an (Eberhard *et al.*, 2005; Mascaux *et al.*, 2005).

In den letzten Jahren wurden Inhibitoren des Hitzeschockproteins 90 (HSP90) in verschiedenen präklinischen und klinischen Studien unter anderem zur Behandlung des NSCLC getestet und zeigten dort vielversprechende Ergebnisse (Chatterjee *et al.*, 2016). HSP90 ist für die Faltung, Stabilität und Aktivierung zahlreicher Substratproteine, darunter eine Reihe von Onkoproteinen, verantwortlich und stellt somit ein attraktives Zielmolekül in der Krebstherapie dar (Ferrarini *et al.*, 1992; Maloney und Workman, 2002; Chatterjee *et al.*, 2016). So sind einige nachgeschaltete Proteine von *KRAS* auf die Chaperonaktivität von HSP90 angewiesen, weshalb die Wirkung von HSP90-Inhibitoren auch in Tumoren mit *KRAS*-Mutationen untersucht wurde. Dabei zeigten *KRAS*-mutierte NSCLC-Zelllinien sowie *in vivo* Tumore in Mausmodellen ein Ansprechen auf den HSP90-Inhibitor 17-AAG (Sos *et al.*, 2009; De Raedt *et al.*, 2011; Acquaviva *et al.*, 2012). In einer klinischen Studie konnte die Wirkung eines anderen

HSP90-Inhibitors in *KRAS*-mutierten NSCLC jedoch nicht bestätigt werden (Bhattacharya *et al.*, 2015).

Tabelle 1: Treibermutationen und Genveränderungen im NSCLC¹

Ziel	Prävalenz	Zugelassene Medikamente	Referenzen
<i>EGFR</i>	15 % in kaukasischen, 30 bis 60 % in ostasiatischen Patienten	Gefitinib (Iressa [®]) Erlotinib (Tarceva [®]) Afatinib (Giotrif [®]) Osimertinib (Tagrisso [®] , bei T790M-Mutation)	Fukuoka <i>et al.</i> , 2011; Rosell <i>et al.</i> , 2012; Sequist <i>et al.</i> , 2013; Villaruz <i>et al.</i> , 2013; Miyachi <i>et al.</i> , 2017
<i>KRAS</i>	25 %	-	Villaruz <i>et al.</i> , 2013
<i>ALK</i> -Translokation	5 bis 8 %	Crizotinib (Xalkori [®]) Ceritinib (Zykadia [®]) oder Alectinib (Alecensa [®]) bei progredienter Erkrankung	Shaw <i>et al.</i> , 2013; Ceritinib gains FDA approval for lung cancer," 2014; McKeage, 2015
<i>Her2</i>	2 bis 4 %	-	Villaruz <i>et al.</i> , 2013
<i>BRAF</i> (<i>V600E</i>)	2 %	Dabrafenib (Tafinlar [®]) Trametinib (Mekinist [®])	Villaruz <i>et al.</i> , 2013; Planchard <i>et al.</i> , 2016; Stinchcombe, 2016
<i>ROS1</i> -Translokation	1 bis 3 %	Crizotinib (Xalkori [®]) Ceritinib (Zykadia [®]) bei progredienter Erkrankung	Villaruz <i>et al.</i> , 2013; Shaw <i>et al.</i> , 2014; Stinchcombe, 2016
<i>MET</i> -Amplifikation	1 %	-	Villaruz <i>et al.</i> , 2013
<i>PIK3CA</i>	1 %	-	Villaruz <i>et al.</i> , 2013
<i>MEK</i>	1 %	-	Villaruz <i>et al.</i> , 2013
<i>AKT</i>	0 bis 1 %	-	Villaruz <i>et al.</i> , 2013

¹*EGFR*: Gen für den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor; *KRAS*: Gen für das *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*; *ALK*: Gen für die anaplastische Lymphomkinase; *Her2*: Gen für den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor 2; *BRAF*: Gen für das *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*; *ROS1*: *c-ros oncogene 1*; *MET*: Gen für den hepatozytischen Wachstumsfaktorrezeptor (HGFR); *PIK3CA*: Gen für die *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*; *MEK*: Gen für die MAPK/ERK Kinase; *AKT*: Gen für die Proteinkinase B

1.3 Primäre und sekundäre Resistenzen der Therapie mit EGFR-TKI

Obwohl etwa 60 bis 80 % der Patienten mit einer sensibilisierenden Mutation ein Ansprechen auf TKI wie Gefitinib oder Erlotinib zeigen, ist die Wirksamkeit dieser Inhibitoren durch primäre oder erworbene sekundäre Resistenzen limitiert (Hammerman *et al.*, 2009). Dabei werden primäre Resistenzen häufig durch andere somatische Mutationen in Genen wie *KRAS* ausgelöst, die ebenfalls einen Einfluss auf den EGFR-Signalweg haben. Weiterhin sind auch Insertionen im Exon 20 der RTK-Domäne des *EGFR*-Gens mit einer primären Resistenz gegenüber TKI assoziiert (Abbildung 2; Pao und Miller, 2005). Patienten, die aufgrund einer sensibilisierenden Mutation auf Gefitinib oder Erlotinib ansprechen, zeigen jedoch nach neun bis 13 Monaten Behandlung mit dem TKI eine progressive Erkrankung (Hammerman *et al.*, 2009; Sequist *et al.*, 2011). Dies belegt, dass erworbene Resistenzen ein großes klinisches Problem darstellen, deren zugrundeliegende Mechanismen in zahlreichen Studien untersucht wurden. Als ursächlich für die erworbenen Resistenzen konnten dabei sekundäre Mutationen im *EGFR* oder die Aktivierung von zentralen Signalwegen für das Wachstum und Überleben, die EGFR-unabhängig sind, gefunden werden. Ein sehr gut charakterisierter Resistenzmechanismus ist der Erwerb einer T790M-Mutation im Exon 20 der *EGFR*-Kinase-Domäne, bei der das Threonin an Position 790 durch ein Methionin ersetzt wird (Abbildung 2; Kobayashi *et al.*, 2005; Pao, Miller, *et al.*, 2005; Oxnard *et al.*, 2011). Diese Mutation tritt in 50 % der Patienten, die eine Resistenz entwickeln, auf und erhöht die ATP-Bindungsaffinität des EGFR, sodass die TKI kompetitiv aus der Bindungsstelle verdrängt werden (Yun *et al.*, 2008). Zusätzlich können andere Resistenz auslösende Mutationen im *EGFR* auftreten, deren genauer Mechanismus jedoch noch nicht untersucht wurde (Balak *et al.*, 2006; Hammerman *et al.*, 2009). Zur Überwindung einer Sekundärresistenz, ausgelöst durch eine T790M-Mutation wurden TKI der zweiten und dritten Generation entwickelt. Dabei zeigten Inhibitoren wie Afatinib und Osimertinib, die irreversibel in der ATP-Bindungsstelle ansetzen, eine gute Wirksamkeit (Kwak *et al.*, 2005; Miyauchi *et al.*, 2017).

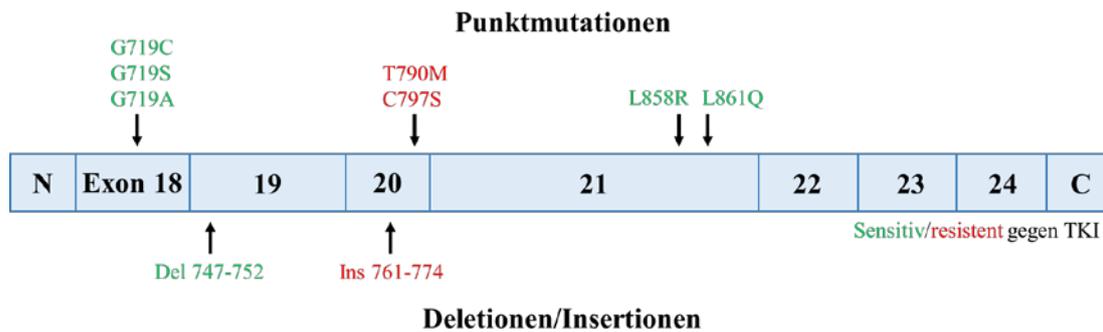


Abbildung 2: Klinisch relevante Mutationen in der Kinase-Domäne des *EGFR*

Die aktivierenden Punktmutationen G719X, L858R und L861Q sowie die Deletion im Exon 19 sind mit einer Sensitivität gegenüber anti-EGFR-TKI assoziiert. Hingegen sind Insertionen im Exon 20 mit einer primären Resistenz und die T790M- sowie die C797S-Punktmutationen mit einer sekundären Resistenz gegenüber Gefitinib und Erlotinib verbunden (modifiziert nach Hammermann *et al.*, 2009; zusätzliche Mutationen aus Irmer *et al.*, 2007 und Morgillo *et al.*, 2016).

Ein anderer Mechanismus, der zur Entstehung von Resistenzen führen kann, ist die Aktivierung paralleler Signalwege, in denen nachgeschaltete Proteine des EGFR, unabhängig von diesem, aktiviert werden (Hammerman *et al.*, 2009). Dabei sind verschiedene Möglichkeiten beschrieben, wie eine Tumorzelle unabhängig vom EGFR-Signalweg werden kann. Ein Beispiel für die EGFR-unabhängige Aktivierung der PI3K ist die Amplifikation des Gens für den hepatozytischen Wachstumsfaktor-Rezeptor (HGFR, Gen: *MET*) und die damit verbundene Weiterleitung anti-apoptotischer, proliferativer Signale. Diese *MET*-Amplifikation wird in ca. 20 % der Patienten gefunden, die eine Resistenz gegenüber TKI entwickeln (Engelman *et al.*, 2007; Oxnard *et al.*, 2011). Engelman und Kollegen beobachteten *in vitro*, dass die Amplifikation von *MET* zu einer ErbB3-vermittelten Aktivierung der PI3K führt (Engelman *et al.*, 2007) – ein Mechanismus, der analog zur EGFR-vermittelten Aktivierung der PI3K ist (Hammerman *et al.*, 2009). Aufgrund vielversprechender *in vitro* Versuche mit einer kombinierten Inhibition des EGFR und des HGFR (Engelman *et al.*, 2007), wird eine Therapie mit HGFR-Inhibitoren wie Crizotinib derzeit in mehreren klinischen Studien untersucht (www.clinicaltrials.gov).

Weitere Mechanismen, die zu einer Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs führen und somit eine Resistenz auslösen können, sind aktivierende Mutationen der PI3K selbst oder ein Verlust des *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN), einem Tumorsuppressor, der inhibitorisch auf den PI3K/Akt-Signalweg wirkt (Abbildung 1; Mellinghoff *et al.*,

2007). Ebenso ist die dauerhafte Aktivierung des insulinähnlichen Wachstumsfaktor-Rezeptors 1 (IGF1R) und damit nachfolgend des PI3K/Akt- sowie des MAPK-Signalwegs in präklinischen und klinischen Studien mit einer Resistenz assoziiert (Peled *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2016; Hussmann *et al.*, 2017). Zusätzlich konnte eine Korrelation des aktivierten IGF1R mit einer Epithelial-Mesenchymalen-Transition (EMT) nachgewiesen werden (Kim, Litzenburger, *et al.*, 2007). Dieser im Abschnitt 1.4 näher erläuterte Prozess wird häufig mit der Ausbildung von Resistenzen in Verbindung gebracht (Fischer *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2015; Rastogi *et al.*, 2016).

Ebenfalls mit der Entstehung von primären und sekundären Resistenzen verbunden ist eine Klasse von kurzen Ribonukleinsäuren (RNAs), genannt mikro-RNAs (miRNAs), die sowohl als Tumorsuppressor als auch als Tumorpromoter wirken können (Nelson und Weiss, 2008). Diese miRNAs sind kurze, nicht-kodierende RNAs mit einer Länge von ca. 22 Nukleotiden, welche die Genexpression im post-transkriptionalen Stadium beeinflussen können (Singh *et al.*, 2008). Sie werden aus längeren primären Transkripts durch zwei aufeinanderfolgende Prozessierungsschritte generiert, vermittelt durch eine nukleäre (Drosha) sowie eine zytoplasmatische (Dicer) RNase III Endonuklease (Jansson und Lund, 2012). Um einen Einfluss auf zelluläre Prozesse auszuüben, werden die reifen miRNAs in einen Ribonukleotidkomplex (RISC) aufgenommen und lagern sich an die komplementäre Nukleotidsequenz ihrer Ziel-messenger RNA (mRNA) an. In Abhängigkeit des Grades der Übereinstimmung zwischen miRNA und mRNA wird die Translation der mRNA bei teilweiser Übereinstimmung gehemmt oder die mRNA wird bei hoher Komplementarität degradiert (Kim und Nam, 2006; Wiemer, 2007). Neben der Involvierung in einer Reihe physiologischer Prozesse wie der Zelldifferenzierung, Zellproliferation oder des Metabolismus, zeigen viele Studien eine abnormale Regulierung bestimmter miRNAs in Krebserkrankungen (Kloosterman und Plasterk, 2006). Eine wichtige miRNA, die mit der Tumorprogression und Metastasierung verbunden ist, stellt die miRNA-21 dar (Saito *et al.*, 2011). Diese wird unter anderem durch den EGFR induziert und reguliert nachgeschaltete Proteine des EGFR-Signalwegs (Seike *et al.*, 2009). Zu den direkten Ziel-mRNAs der miRNA-21 gehören zum Beispiel das Tumorsuppressorgen PTEN (Zhang *et al.*, 2010), negative Regulatoren des RAS/MEK/Erk-Signalwegs und verschiedene pro-apoptotische Gene (Hatley *et al.*, 2010). Die miRNA-21 ist bei Lungenkrebspatienten häufig überexprimiert (Volinia *et al.*, 2006) und wird mit der Sensitivität gegenüber Chemotherapie von

NSCLC-Patienten in Verbindung gebracht (Dong *et al.*, 2015). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Konzentration an miRNA-21 in Tumoren von Nichtrauchern mit einer *EGFR*-Mutation höher war im Vergleich zu *EGFR*-wildtypischen Patienten (Seike *et al.*, 2009). Aufgrund der bisherigen Daten wird die miRNA-21 als prognostischer Marker für das Zellwachstum, die Tumortransformation und -progression diskutiert. So untersuchten Saito und Kollegen das Gewebe von Adenokarzinompatienten mittels qRT-PCR und beobachteten, dass eine erhöhte miRNA-21-Expression mit dem Voranschreiten der Erkrankung und einer schlechteren Prognose assoziiert war (Saito *et al.*, 2011). Die miRNA-21 ist ebenfalls mit Prozessen wie der in Abschnitt 1.4 beschriebenen EMT sowie der Ausbildung eines Stammzellphänotyps assoziiert. So wurde gezeigt, dass die Gabe eines Antagonisten der miRNA-21 in Brustkrebszellen zur Umkehr der EMT und des Stammzellphänotyps über die Inaktivierung von Akt/Erk1/2 durch PTEN führt (Han *et al.*, 2012). Zusätzlich konnten in NSCLC-Patienten hohe miRNA-21/niedrige PTEN-Konzentrationen mit einer schlechten Antwort auf TKIs und einem kürzeren Überleben assoziiert werden (Shen *et al.*, 2014). Anschließend durchgeführte *in vitro* Versuche ergaben, dass es während der Ausbildung einer Resistenz einer TKI-sensitiven NSCLC-Zelllinie gegenüber Gefitinib zu einer Hochregulierung der miRNA-21 bei gleichzeitiger Herunterregulierung von PTEN kommt und verdeutlicht somit die Rolle dieser miRNA bei dem Auftreten von Resistenzen (Shen *et al.*, 2014).

1.4 Epithelial-Mesenchymale Transition

Die Fähigkeit von Tumorzellen aus dem primären Tumor auszuwandern und Metastasen zu formen, ist eine der Hauptursachen für eine schlechte Prognose von Krebspatienten (Tse und Kalluri, 2007). Obwohl seit Jahren an diesem Prozess geforscht wird, sind die genauen biochemischen und genetischen Mechanismen von Invasion und Metastasierung immer noch kontrovers diskutiert. Das trifft besonders auf die EMT zu ein Prozess, der eine wichtige Funktion bei der Invasion spielen soll (Guarino *et al.*, 1999; Xue *et al.*, 2003), jedoch normalerweise einen essentiellen Schritt während der Embryogenese und der Wundheilung in vielen tierischen Spezies darstellt (Kalluri und Weinberg, 2009). Die ursprünglich epithelialen Zellen sind durch eine apikale *versus* basolaterale Polarisierung, starke Ankerverbindungen zwischen den Zellen und zur Basalmembran sowie *Tight Junctions* (TJ) charakterisiert (Albert, 2008). Dieser Verbund aus Epithel-

zellen hat eine Vielzahl an Funktionen, die vom mechanischem Schutz, dem Transport von Stoffen von apikal nach basal, über die Sekretion von Substanzen, bis hin zur Sinneswahrnehmung reichen (Kapsimali, 2017). Während der EMT durchlaufen die differenzierten, polarisierten Epithelzellen morphologische Veränderungen hin zu mesenchymalen, unpolarisierten Zellen, welche dafür geeignet sind in einer extrazellulären Umgebung zu wandern und an anderer Stelle Organe auszubilden (Thiery, 2002). Die Entstehung epithelialer Organe aus mesenchymalen Zellen wird dadurch ermöglicht, dass die EMT reversibel ist und der Phänotyp durch die sogenannte Mesenchymal-Epitheliale-Transition (MET) revertiert werden kann (Lee *et al.*, 2006). Diese Prozesse, EMT und MET, spielen jedoch nicht nur in der Embryogenese, sondern auch in der Progression von Krebserkrankungen eine entscheidende Rolle (Guarino *et al.*, 1999). Der Zusammenhang zwischen der EMT und der Metastasierung im Patienten wird in der Literatur diskutiert, da der Nachweis dieser Prozesse *in vivo* äußerst schwierig ist (Bastid, 2012). Einige Studien zeigen aber, dass sich auch während fortschreitender Krebserkrankungen, mesenchymale Tumorzellen mit lockeren Zell-Zell-Kontakten bilden, deren migratorisches und invasives Potenzial erhöht ist. Diese Zellen, die meist an der invasiven Front primärer Tumore zu finden sind, können durch Intravasation in Gefäße, Transport durch die Zirkulation und anschließende Extravasation zunächst Mikrometastasen bilden, die letztendlich zu größeren Metastasen heranwachsen (Thiery, 2002; Kalluri und Weinberg, 2009). Eine solche Invasions-Metastasierungs-Kaskade ist in Abbildung 3 dargestellt.

Derzeit wird immer noch untersucht, welche Faktoren genau für die Induktion einer EMT verantwortlich sind. Man geht aber davon aus, dass einige dieser Signale vom Tumorstroma, welches mit den primären Karzinomen assoziiert ist, sezerniert werden (Kalluri und Weinberg, 2009). Diese Faktoren, besonders der hepatozytische Wachstumsfaktor (HGF), der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), der *Platelet-derived growth factor* (PDGF) und der *Transforming growth factor beta* (TGF- β) werden für die funktionelle Aktivierung einer Reihe von EMT-induzierenden Transkriptionsfaktoren (z.B.: Snail, Slug, Twist, ZEB1) in den Tumorzellen als wichtig bewertet (Thiery, 2002; Shi und Massague, 2003; Gonzalez und Medici, 2014).

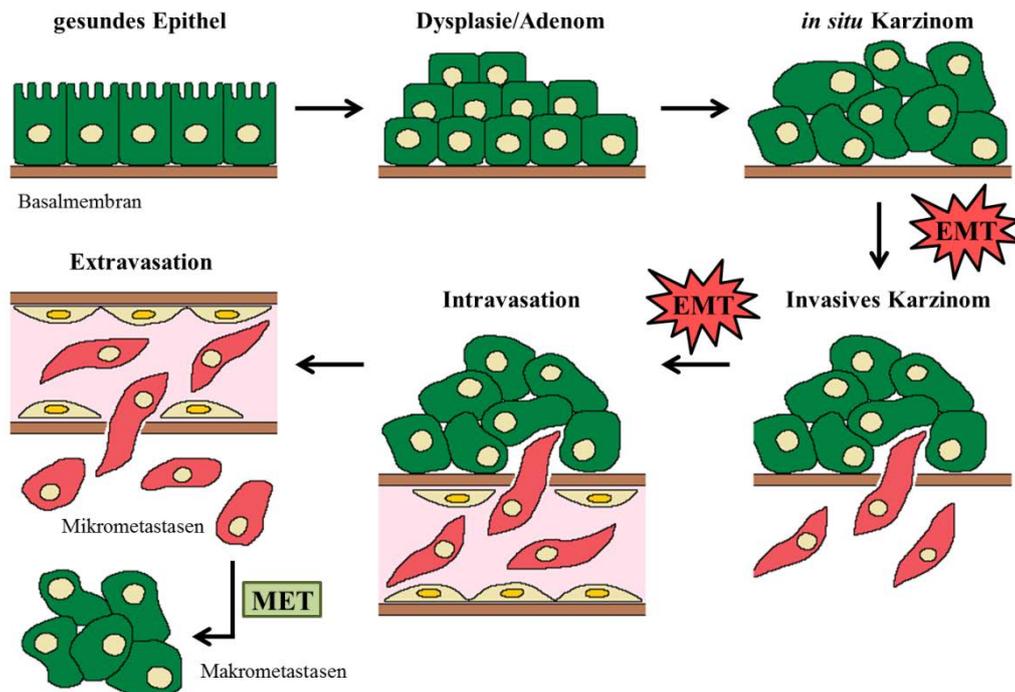


Abbildung 3: EMT und MET bei der Entstehung und Progression von Karzinomen

Ein gesundes Epithel, welches durch eine unterliegende Basalmembran gekennzeichnet ist, kann durch starke Proliferation zur Entstehung eines Adenoms führen. Weitere epigenetische und genetische Veränderungen führen zu einem *in situ* Karzinom, bei dem die Basalmembran noch intakt ist. Der nächste Schritt wird durch eine EMT induziert, wodurch es zur lokalen Dissemination der Tumorzellen kommt. Durch die Degradierung der unterliegenden Basalmembran, kann diese von den Krebszellen im Prozess der Invasion überquert werden. Dies ermöglicht es den Tumorzellen in Gefäße einzudringen (Intravasation), wo sie passiv zu entfernten Organen transportiert werden. An anderer Stelle können die Tumorzellen aus dem Gefäßsystem austreten (Extravasation) und als Einzelzellen verbleiben (Mikrometastase) oder neue Karzinome (Makrometastasen) durch den Prozess der MET bilden (modifiziert nach Thiery, 2002).

Während TGF- β initial als wichtiger Tumorsuppressor fungiert, spielt der Wachstumsfaktor ebenfalls in der Progression und Metastasierung von Krebserkrankungen eine bedeutende Rolle (Bierie und Moses, 2006; Tian und Schiemann, 2009). So gilt TGF- β 1, vor allem in *in vitro* Kulturen als der potenteste Induktor einer EMT (Jakobsen *et al.*, 2016), der diese über zwei verschiedene Signalwege auslösen kann (Kalluri und Weinberg, 2009): den SMAD-abhängigen und den SMAD-unabhängigen Signalweg (Abbildung 4). Zur Induktion beider Signalkaskaden, bindet aktiviertes TGF- β 1 als Ligand an den TGF- β -Rezeptor (T β R) Typ II, was zur Bildung eines heterotetrameren Komplexes mit dem T β R1 und dessen Phosphorylierung führt (Gonzalez und Medici, 2014; Papageorgis, 2015). Die aktivierte Kinase von T β R1 phosphoryliert im kanonischen SMAD-abhängigen Signalweg wiederum SMAD2- und SMAD3-Proteine, die im

Anschluss einen Transkriptionskomplex zusammen mit dem Koaktivator SMAD4 bilden (Massague *et al.*, 2005). Dieser Komplex transloziert in den Nukleus, wo er die Expression wichtiger EMT-fördernde Transkriptionsfaktoren induziert (Gonzalez und Medici, 2014). Einige Studien haben gezeigt, dass TGF- β ebenfalls SMAD-unabhängig wirken kann, indem es Proteine des MEK/Erk-, der Rho-ähnlichen GTPase-, des PI3K/Akt- und des p38/MAPK-Signalwegs aktiviert und so biologische Prozesse wie die EMT, Zelladhäsion, Migration und das Überleben reguliert (Zhang, 2009; Papageorgis, 2015). Diese SMAD-unabhängigen Signalwege können ebenfalls durch aktivierte RTKs induziert werden (Gonzalez und Medici, 2014).

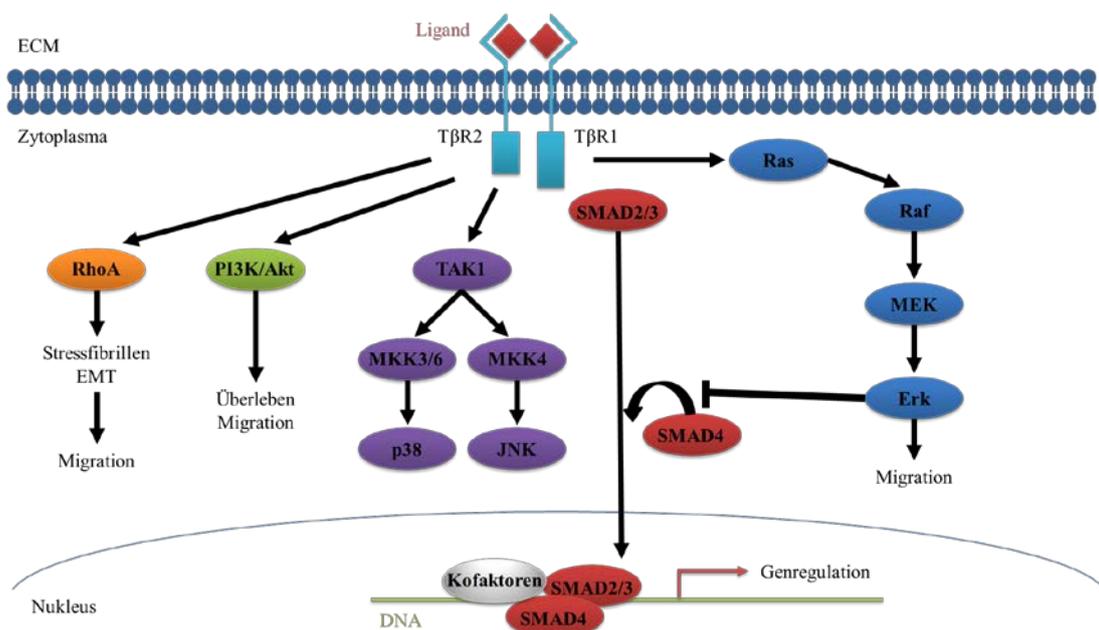


Abbildung 4: SMAD-abhängige und -unabhängige TGF- β -Signalwege

Aktiviert TGF- β Liganden induzieren die Signaltransduktion über die Bindung an T β R1 und T β R2. TGF- β -Rezeptoren weisen eine Kinaseaktivität auf, die für die Weiterleitung der Signale über den kanonischen SMAD-Weg notwendig ist. Dabei werden SMAD2 und 3 Proteine phosphoryliert, die dann einen heterotrimerischen Komplex mit SMAD4 bilden. Dieser Komplex wandert in den Zellkern und reguliert dort, zusammen mit anderen Kofaktoren, die Expression verschiedener TGF- β -Zielgene. Die dem TGF- β -Rezeptor nachgeschaltete Signaltransduktion kann ebenfalls über alternative Wege vermittelt werden, z.B. über die Rho-ähnliche GTPase oder MEK/Erk sowie über den PI3K/Akt- oder den p38/MAPK-Weg (modifiziert nach Papageorgis, 2015).

Während der EMT kommt es zu zahlreichen zellulären Veränderungen, wobei sich die Zellen im Grad der EMT durchaus unterscheiden. Einige Zellen behalten epitheliale Charakteristika, wohingegen andere Zellen alle epithelialen Merkmale unterdrücken und vollständig mesenchymal werden (Kalluri und Weinberg, 2009). Einer der ersten

und wichtigsten Schritte ist der Verlust von Zell-Zell-Adhäsionsproteinen wie epitheliales Cadherin (E-Cad). Ebenfalls werden auch *Tight junction* Proteine wie *Zonula occludens* (ZO-1) und Occludin herunterreguliert. Letztendlich trägt ein Verlust der apikalen-basolateralen Zellpolarität zu einem Verschwinden des epithelialen Phänotyps bei. Im Gegensatz dazu werden mesenchymale Marker wie Vimentin (Vim), Fibronectin und N-Cadherin hochreguliert und die Zelle bildet durch Veränderungen in der zytoskelettalen Zusammensetzung eine spindelförmige, Fibroblasten-ähnliche Morphologie aus (Papageorgis, 2015). Ein weiteres wichtiges Molekül, welches zu einem Fortschritt der EMT führt ist β -Catenin (β -Cat). Dieses ist in epithelialen Zellen mit E-Cad an den Zellgrenzen kolokalisiert. Durch den Verlust von E-Cad während einer EMT, kann β -Cat verstärkt im Zytoplasma akkumulieren und in den Nukleus translozieren, wo es die bereits oben genannten EMT-fördernde Transkriptionsfaktoren induziert (Gonzalez und Medici, 2014). Einige dieser Faktoren wie Snail erhöhen auch die Expression von Genen, die Matrix-Metalloproteinasen (MMP) kodieren (Miyoshi *et al.*, 2004). Diese Endopeptidasen, die in einer Vielzahl von Krebserkrankungen stärker aktiv sind, besitzen die Fähigkeit Komponenten der ECM zu degradieren und diese umzubauen (Egeblad und Werb, 2002). In humanen Tumoren werden MMPs von den Krebszellen, aber auch von den umgebenden Stromazellen synthetisiert und können in membrangebundene sowie sekretierte MMPs unterschieden werden. Letztere können jedoch ebenfalls über die Interaktion mit Integrinen, CD44 und anderen Proteinen an der Zelloberfläche lokalisiert sein (Brooks *et al.*, 1996; Yu und Stamenkovic, 1999). MMPs sind in vielen Schritten der Krebsentstehung involviert und können unter anderem das Wachstum von Tumorzellen sowie die Angiogenese regulieren (Bergers *et al.*, 2000; Egeblad und Werb, 2002). Im Kontext der EMT spielen vor allem MMP2 und MMP9 eine wichtige Rolle. Zum einen sind diese Typ IV-Kollagenasen in der Lage die Basalmembran zu degradieren und somit die Invasion der mesenchymalen Tumorzellen über diese Grenze hinweg in Gefäßstrukturen zu fördern (Kim *et al.*, 1998). Auf der anderen Seite wird die Verfügbarkeit von aktivem TGF- β durch die Freisetzung von einem inaktiven extrazellulären Komplex durch MMP2 und MMP9 ermöglicht und die EMT somit in einem Rückkopplungsmechanismus noch verstärkt (Yu und Stamenkovic, 2000).

Heutzutage geht man davon aus, dass die EMT ebenfalls in der Resistenzentwicklung (Fischer *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2015) involviert ist und diese mit dem Erwerb von Stammzellcharakteristika einhergeht (Mani *et al.*, 2008; Santisteban *et al.*, 2009). Ob-

wohl die Herkunft von Krebsstammzellen noch nicht eindeutig geklärt ist, gibt es viele Hinweise darauf, dass sie aus epithelialen Krebszellen durch eine EMT entstehen können. So wurde gezeigt, dass TGF- β -induzierte EMT Zellen generiert, welche Stammzellcharakteristika aufweisen (Mani *et al.*, 2008). Nach der „Krebsstammzellhypothese“ repräsentieren diese Zellen eine Subpopulation von pluripotenten Zellen, die sich selbst reproduzieren und ein hohes Potenzial haben, zu metastasieren und neue Tumore zu induzieren (Reya *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2009). Krebsstammzellen wurden bisher in vielen Entitäten nachgewiesen, darunter Brust-, Lungen-, Darm- und Prostatakrebs sowie Leukämie und Melanoma (Chen *et al.*, 2013; Chang, 2016). Darüber hinaus sind sie im Allgemeinen resistent gegenüber Chemo- und Radiotherapie, sodass trotz Behandlung tumorfördernde Zellen überleben und ein Rezidiv auslösen können (Chang, 2016). Aufgrund ihrer Rolle in der Tumorentstehung und -progression sowie in der Metastasierung, Resistenz und Rezidivausbildung stellen Krebsstammzellen ein attraktives Therapieziel dar, welches derzeit in zahlreichen präklinischen und klinischen Studien untersucht wird (Chen *et al.*, 2013).

1.5 Krebsimmuntherapie

Eines der von Hanahan und Weinberg postulierten Kennzeichen von Krebserkrankungen ist die Fähigkeit von Tumoren von dem Immunsystem nicht angegriffen zu werden (Hanahan und Weinberg, 2011). Dazu haben Krebszellen eine Reihe von wirkungsvollen Strategien entwickelt. So ist die Herunterregulierung von Haupthistokompatibilitätskomplexen des Typ 1 (MHC1) Molekülen auf der Zelloberfläche, welche die Antigene für die T-Zellen präsentieren, ein häufig beschriebener Mechanismus (Algarra *et al.*, 1997; Schreiber *et al.*, 2011). Zudem können Krebszellen immunsuppressive Faktoren wie TGF- β sezernieren, die infiltrierende zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) paralisieren (Yang *et al.*, 2010). Zytotoxische T-Lymphozyten werden ebenfalls durch von Krebszellen angelockten regulatorischen T-Zellen sowie myeloischen Suppressorzellen inhibiert (Ostrand-Rosenberg und Sinha, 2009; Mougiakakos *et al.*, 2010). Ein weiterer Mechanismus der Immunevasion ist die Expression bestimmter immunregulatorischer Proteine auf der Tumorzelloberfläche (Krummel und Allison, 1995; Okazaki und Honjo, 2007). Unter normalen physiologischen Bedingungen sind diese sogenannten Immuncheckpoints notwendig um die Auto-

immunität zu verhindern und das Immunsystem zu regulieren (Pardoll, 2012). Zwei der am besten untersuchten Immuncheckpoints, welche sich auch Tumorzellen zu Nutze machen, sind *Programmed cell death receptor/ligand 1* (PD-1/PDL-1) und *Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4* (CTLA-4) (Pardoll, 2012; Anagnostou und Brahmer, 2015). Die Blockierung dieser Signalwege im Rahmen einer Krebsimmuntherapie hat bemerkenswerte anti-tumor Effekte erzielt, mit dem Potenzial eine dauerhafte klinische Antwort zu induzieren (Pardoll, 2012). Für das NSCLC wurden deshalb PD-1-Inhibitoren (Nivolumab und Pembrolizumab) sowie PD-L1-Inhibitoren (Atezolizumab) von der FDA als Zweitlinientherapie anerkannt (Malhotra *et al.*, 2017).

Im Allgemeinen ist das Ziel der Krebsimmuntherapie die körpereigene Immunabwehr gegen die Tumorzellen zu induzieren bzw. immunsuppressive Mechanismen wie die oben beispielhaft beschriebenen aufzulösen. In den letzten zwei Jahrzehnten wurden dafür eine Reihe von vielversprechenden Strategien entwickelt, die neben den Immuncheckpoint-Inhibitoren auch die Vakzinierung gegen bestimmte Antigene der Krebszellen umfasst (Rafei *et al.*, 2017). Ein sehr aussichtsreicher Ansatz ist zudem der adoptive Transfer von T-Zellen. Hier werden T-Zellen aus dem Tumor oder dem peripheren Blut des Patienten entnommen, *in vitro* expandiert und in einer höheren Zahl zurück in den Patienten injiziert. Zusätzlich ist es möglich die im Patienten natürlich vorkommenden T-Zellen genetisch so zu verändern, sodass sie die Oberflächenproteine des Tumors besser erkennen. Diese T-Zellen exprimieren nach der Modifikation einen synthetischen tumor-reaktiven chimären Antigen-Rezeptor (CAR). Dieser Rezeptor besteht aus einer extrazellulären variablen Antigen-Bindungsdomäne, die von der VH- und VL-Kette eines monoklonalen Antikörpers stammt und die über einen Abstandshalter mit einer Transmembrandomäne und einem intrazellulären Signaltransduktionsmodul verbunden ist (Beatty und O'Hara, 2016). Letzteres kann je nach Generation des CARs ein oder mehrere kostimulatorische Domänen enthalten (Yu *et al.*, 2017). Ein großer Vorteil dieser chimären Rezeptoren ist, dass sie MHC-unabhängig sind und die Herunterregulierung von MHC-1 Molekülen durch Tumorzellen folglich keinen Effekt mehr hat. In hämatologischen Erkrankungen, vor allem der akuten und chronischen lymphatischen Leukämie, zeigte diese Strategie bereits vielversprechende Ergebnisse (Kalos *et al.*, 2011; Kochenderfer *et al.*, 2012; Brentjens *et al.*, 2013). Zur Übertragung dieser zukunftssträchtigen Therapie auf solide Tumore, müssen jedoch eine Reihe von Herausforderungen überwunden werden (Newick *et al.*, 2016; Zhang, Qin, *et al.*, 2016). Neben

der Evaluierung eines geeigneten Zielantigens auf den Tumorzellen, stellen dabei vor allem die schlechte Expansion und Persistenz der CAR T-Zellen *in vivo*, eine unzureichende Zielfindung der T-Zellen zum Tumor und verschiedene Mechanismen der Immunsuppression in der Tumormikroumgebung Limitierungen dar (Beatty und O'Hara, 2016). Zahlreiche derzeit laufende präklinische und klinische Studien zielen darauf ab, diese Hürden zu überwinden.

1.6 Modelle zur Testung von Therapiestrategien

Heutzutage scheitern in der klinischen Entwicklung 95 % der Wirkstoffe gegen Krebserkrankungen, obwohl sie in der Präklinik anti-Tumor Effekte zeigten (Hutchinson und Kirk, 2011; Bhattacharjee, 2012). Eine Ursache dafür ist, dass die in der präklinischen Phase verwendeten Modelle die komplexen Prozesse im Tumor nicht adäquat widerspiegeln. Der Bedarf an neuen, innovativen Tumortestsystemen, welche die Situation *in vivo* besser abbilden und anhand derer die zugrunde liegenden Wirkmechanismen erklärt werden können, ist dementsprechend sehr hoch.

Die konventionelle zweidimensionale (2D) Zellkultur von Tumorzelllinien hat wesentlich dazu beigetragen biochemische Signalwege, therapeutische Wirkstoffe sowie einige molekulare onkogene Treiber zu identifizieren (Gazdar, Girard, *et al.*, 2010; Unger *et al.*, 2014). Zudem bietet die relativ einfache Kultur von Tumorzellen auf einer harten Plastikoberfläche die Möglichkeit von Hochdurchsatzuntersuchungen der Wirkstoffkandidaten (McDermott *et al.*, 2007). Die 2D Kultur reflektiert jedoch nicht die komplexen und dynamischen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen sowie die mechanischen Eigenschaften und biochemischen Netzwerke, welche essentielle Eigenschaften von *in vivo* Tumoren sind (Xu *et al.*, 2014). So fehlen den 2D Modellen neben der räumlichen Tiefe unter anderem Fibroblasten, Blutgefäße, Immunmediatoren und die extrazelluläre Matrix (ECM), die einen erheblichen Einfluss auf das Wachstum, die Proliferation und Migration der Tumorzellen haben und die Antwort auf Medikamente entscheidend beeinflussen können (Caponigro und Sellers, 2011; Xu *et al.*, 2014; Santo *et al.*, 2017).

Neben der 2D Kultur spielen vor allem Mausmodelle eine wichtige Rolle in der präklinischen Entwicklung von Anti-Krebsmedikamenten (Kelland, 2004). So wurde die

Wirksamkeit vieler der noch heute verwendeten Chemotherapeutika in Mausmodellen bestätigt (Steel *et al.*, 1983; Caponigro und Sellers, 2011). Obwohl das Wachstum von humanen Tumorzelllinien in immunkomprimierten Mäusen (Xenograft) durch stromale Komponenten der Maus unterstützt wird, gibt es dennoch einige Unterschiede in der Ligand-Rezeptor-Interaktion zwischen den Spezies. So kann der murine HGF den entsprechenden humanen Rezeptor HGFR nicht aktivieren (Rong *et al.*, 1992; Caponigro und Sellers, 2011). Dies führt in der Folge zu Unterschieden in der Signaltransduktion zwischen den Mausmodellen und dem Menschen. Zudem gibt es weitere fundamentale Unterschiede zwischen der Entwicklung von Tumoren, die in die Maus injiziert oder durch chemische Karzinogene induziert wurden und den natürlichen, sich spontan entwickelnden Tumoren im Menschen (Khong und Restifo, 2002). Eine Studie belegt, dass sich bei über 4.000 Genen in Mensch und Maus die Bindungsstelle der Transkriptionsfaktoren zwischen den Spezies in 41 bis 89 % der Fälle unterscheidet (Mak *et al.*, 2014). Zudem ist es nur schwer möglich invasive Prozesse in den Mausmodellen darzustellen, da subkutan induzierte Xenografts nur sehr selten metastasieren (Kelland, 2004). In orthotopischen Mausmodellen ähnelt der Phänotyp bezüglich histologischer Erscheinung, Invasivität und Metastasierung schon eher dem im Menschen, sodass dort patientenrelevante Metastasen in entfernten Organen beobachtet werden können (Fidler, 1991).

Neben den zelllinienbasierten Xenograftmodellen, gibt es ebenso Mausmodelle, die nicht mit Zelllinien, sondern mit primären Tumoren aus Patienten generiert werden, sogenannte *Patient-derived xenografts* (PDX). Diese sind vorteilhaft, da sie verschiedene Zelltypen des ursprünglichen Tumors beinhalten und wahrscheinlich die genetische Heterogenität besser repräsentieren. Jedoch wurde gezeigt, dass nach der Implantation zwar sowohl humane Tumorzellen als auch humane stromale Komponenten vorhanden sind, letztere jedoch innerhalb kurzer Zeit vollständig durch murine ersetzt werden (Caponigro und Sellers, 2011). Zudem kommt es bei der Implantation des Tumors in die Maus zu einer Selektion der anwachsenden Zellen, sodass auch die PDX-Modelle den *in vivo* Tumor nicht vollständig repräsentieren und die prädiktive Fähigkeit dieser Modelle noch immer diskutiert wird (Unger *et al.*, 2014).

Ein weiterer Nachteil von Mausmodellen ist die häufige Verwendung immunkomprimierter Mäuse, die es nicht ermöglichen Modulatoren der Antitumor-Immunität zu un-

tersuchen (Caponigro und Sellers, 2011). Zudem ist die Testung an Mäusen technisch sehr aufwändig, zeit- und kostenintensiv sowie auch immer mit ethischen Aspekten verbunden. Letztendlich können die Ergebnisse häufig nur schlecht auf den Menschen übertragen werden, sodass in den letzten Jahrzehnten eine Vielzahl von verschiedenen dreidimensionalen (3D) *in vitro* Modellen entwickelt wurden (Kelland, 2004; Xu *et al.*, 2014). Diese sollen die Eigenschaften der nativen Tumormikroumgebung möglichst genau rekapitulieren und deshalb bessere Vorhersagen bezüglich der Wirksamkeit von Medikamenten liefern. In vielen Studien wurde bereits gezeigt, dass die 3D Kultur von Tumorzellen die *in vivo* Architektur von Tumoren besser widerspiegelt und dass die 3D Umgebung zu grundlegenden Unterschieden im Ansprechen auf Medikamente im Vergleich zu 2D führt (Takagi *et al.*, 2007; Pickl und Ries, 2009).

Eine relativ einfache und sehr häufig verwendete Methode der 3D Kultur ist die Generierung von Sphäroiden durch Verhinderung der Adhäsion der Zellen an die Plastikoberfläche (Breslin und O'Driscoll, 2013). Dabei gibt es für die Herstellung der kugelförmigen multizellulären Tumoraggregate eine Reihe verschiedener Protokolle wie die Kultur der Zellen auf Platten mit spezieller Adhärenz-verhindernder Beschichtung (Ivascu und Kubbies, 2006), in Spinnerflaschen (Kim, 2005), in rotierenden Bioreaktorbehältern (Goodwin *et al.*, 1993) oder die sogenannte Hängetropfen- (*Hanging Drop*-) Kultur (Kelm *et al.*, 2003). Sphäroide repräsentieren einige Eigenschaften von nicht-vaskularisierten *in vivo* Tumoren, wie Zell-Zell-Interaktionen sowie einen Gradienten der Sauerstoff- und Nährstoffkonzentration und damit auch der Proliferation der Tumorzellen von außen nach innen (Mehta *et al.*, 2012). Zudem wurde beobachtet, dass 3D Sphäroide ihre eigene ECM produzieren (Kelm *et al.*, 2003). Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass die Testungen im Hochdurchsatz durchgeführt werden können. Im Vergleich zum einschichtigen Zellrasen in 2D Kulturen, zeigen Zellen in der 3D Kultur im Allgemeinen eine reduzierte Sensitivität gegenüber einigen Chemotherapeutika (Fong *et al.*, 2013), was auch in mehreren Studien mit Tumorsphäroiden gezeigt wurde (Goodman *et al.*, 2008; Karlsson *et al.*, 2012).

Entgegen der zahlreichen Vorteile von 3D Sphäroid Kulturen, hat diese Technik auch einige Limitierungen, die sich zum Teil von den verschiedenen Methoden der Herstellung ableiten. Ein großes Problem bei der Produktion von Sphäroiden ist die zum Teil unterschiedliche Größe der Aggregate zwischen den Ansätzen, die eine manuelle Selektion

tierung erforderlich machen, wenn Sphäroide der gleichen Größe für Testungen erforderlich sind (Lin und Chang, 2008). Weiterhin führen die Sauerstoff- und Nährstoffgradienten ab einer kritischen Größe von 400 bis 600 μm zu einem erhöhten Zelltod im Inneren der Sphäroide und damit zur Ausbildung eines nekrotischen Kerns (Friedrich *et al.*, 2009), der nur teilweise *in vivo* relevant ist. Obwohl einige Studien zeigen, dass eine Kokultur von Stroma- und Tumorzellen in Sphäroiden zu einer parakrinen Interaktion zwischen den Zelltypen führt, wird die genaue Darstellung der ECM-Komponenten der Tumormikroumgebung in diesen Modellen häufig vernachlässigt. Die ECM unterstützt jedoch nicht nur das Anheften der Zellen an die Basalmembran und die umgebende Matrix, sondern verändert auch den Transport von Sauerstoff, Hormonen und Nährstoffen (Hutmacher *et al.*, 2010). Zudem hat sie einen Einfluss auf den Abtransport von Abfallprodukten sowie die Migration der Zellen und beeinflusst auch die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Medikamenten (Rintoul und Sethi, 2002; Kenny, 2007). Zur Abbildung dieser wichtigen Komponente, wurden eine Reihe von Modellen entwickelt, die auf verschiedenen Hydrogelen und Scaffolds basieren.

Ein Hydrogel, welches in der Krebsforschung häufig verwendet wird, ist eine Mischung aus natürlichen ECM-Bestandteilen, das sogenannte Matrigel™. Dieses wird von Engelbreth-Holm-Swarm Maussarkomen extrahiert und enthält Basalmembrankomponenten wie Laminin und Kollagen IV (Kol IV) sowie verschiedene Wachstumsfaktoren und Enzyme (Kleinman *et al.*, 1986; Benton *et al.*, 2009). Mina Bissell und Kollegen sowie andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass wenn man Tumorzellen epithelialer Herkunft in Matrigel™ kultiviert, diese ihre Form verändern, die Polarisation verlieren und unorganisierte proliferative Aggregate bilden, die denen während der Tumorprogression *in vivo* ähneln (Bissell und Radisky, 2001; Ingber, 2008). Während nicht-maligne Zellen auf der Oberfläche der Basalmembranmatrix verbleiben, wandern Tumorzellen in das Hydrogel ein (Kramer *et al.*, 1986). Diese Beobachtung führte zu der Entwicklung von Invasionsassays, um die Tumorigenität von Krebszellen zu untersuchen und verschiedene Stimulanzien und Inhibitoren der Invasion zu testen (Albini *et al.*, 1987). Obwohl Matrigel™ die biochemischen Komponenten der natürlichen Basalmembran enthält, spiegelt das Hydrogel jedoch nicht die sehr dünne extrazelluläre Struktur wider, die als Barriere *in vivo* vorkommt. So bestehen wesentliche Unterschiede in ultrastrukturellen Aufnahmen von Matrigel™ und einer natürlichen Basalmembran (Poincloux *et al.*, 2009; eigene nicht veröffentlichte Daten). Ein weiterer Nachteil von Matrigel™ ist

die herkunftsbedingte hohe Variabilität zwischen den einzelnen Chargen, welche zu einer schlechteren Reproduzierbarkeit führt und so Substanztests beeinflusst (Hutmacher *et al.*, 2010). Neben Matrigel™ gibt es auch alternative Hydrogele mit natürlicher Herkunft wie Kollagen I oder IV Gele, welche die *in vivo* Umgebung für migratorische Krebszellen darstellen soll (Jedezsko *et al.*, 2008; Sabeh *et al.*, 2009).

Trotz der vielen Vorteile, welche die Kultur von Zellen in natürlichen Hydrogelen mit sich bringen, gibt es auch einige Schwierigkeiten. So wirken sich kleinste Änderungen in den Herstellungsparametern zum Teil sehr stark auf die Eigenschaften des produzierten Gels aus und führen zu großen Abweichungen zwischen Versuchsergebnissen, besonders in verschiedenen Laboren (Sabeh *et al.*, 2009). Des Weiteren ist es schwieriger die Zellen für molekulare und biochemische Analysen aus den Hydrogelen zurück zu isolieren (Hutmacher *et al.*, 2010).

Für die bessere Kontrolle der biologischen Eigenschaften der Gele, wurden verschiedenste synthetische Gele entwickelt, welche an die Fragestellungen angepasst werden können und meist modular sind (Baker und Chen, 2012). Zudem bieten sie die Möglichkeit nicht nur die biochemische Zusammensetzung der ECM widerzuspiegeln, sondern auch die biophysikalischen Eigenschaften.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es eine Vielzahl verschiedenster Modelle zur Testung von Substanzen und zum Verständnis der physiologischen und pathophysiologischen Prozesse gibt. Die Auswahl des richtigen Modells ist entscheidend und vor allem abhängig von der Fragestellung die adressiert werden soll (Unger *et al.*, 2014). Zusätzlich gibt es einen hohen Bedarf an neuen Modellen, welche die 3D Organisation und die multizelluläre Komplexität der humanen Gewebe rekapitulieren, um die Ergebnisse der Grundlagenforschung in die klinische Anwendung zu übertragen und dabei die Limitierungen der vorhandenen Testsysteme überwinden zu können. Im Idealfall sollten sich die neuen Modelle bezüglich der zu untersuchenden Fragestellung so nah wie möglich an den Patienten annähern und daher vollkommen human sein. Weiterhin sollten sie zur Austestung von Kombinationstherapien geeignet sein, da dies bei der Testung in Mäusen zu einem raschen Anstieg der Versuchstierzahlen führt und so zahlreiche Tierversuche ersetzt werden können. Zudem ist es bei der Entwicklung von Testsystemen gleichzeitig wichtig, geeignete Parameter zur Analyse der Behandlungseffekte auf die

Tumorzellen zu etablieren und dabei auch die natürlichen Varianzen dieser Parameter zu kennen.

1.7 Tissue Engineering

Das Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Feld, das ingenieur- und lebenswissenschaftliche Prinzipien für die Entwicklung von biologischen Ersatzstrukturen zur Wiederherstellung, Erhaltung oder Verbesserung der Gewebefunktion anwendet (www.nsf.gov; Langer und Vacanti, 1993).

In den letzten Jahrzehnten hat das Tissue Engineering im Bereich der 3D Kultur eine entscheidende Rolle bei der Verbesserung der Regenerativen Medizin gespielt. Obwohl das Tissue Engineering vor allem auf die direkte klinische Anwendung fokussiert ist, stellt es auch für andere Gebiete der biomedizinischen Wissenschaften ein leistungsfähiges Instrument dar (Hutmacher *et al.*, 2010). Dazu gehört auch die Entwicklung von physiologischeren *in vitro* Modellen.

Der häufigste Ansatz im Tissue Engineering ist die Besiedelung verschiedener Matrices, die biokompatibel und nicht immunogen sind sowie das Anheften und Wachstum von Zellen unterstützen (Fuchs *et al.*, 2001; Walles *et al.*, 2007). Die Zellen für die Zell-Matrix-Konstrukte werden dabei direkt aus dem Patienten isoliert, *in vitro* expandiert und auf einem Scaffold angesiedelt (Abbildung 5). Dieser kann entweder synthetischen oder natürlichen Ursprungs sein. Die Differenzierung der Zellen und die Ausbildung eines Gewebes werden häufig durch Bioreaktoren unterstützt, bevor das Konstrukt wieder in den Patienten implantiert wird. Der große Vorteil des Tissue Engineerings liegt bei der Verwendung der patienteneigenen Zellen, die eine Abstoßungsreaktion des Transplantats vorbeugen und den Patienten unabhängig von Spenderorganen machen (Langer und Vacanti, 1993). In den letzten Jahren konnten bereits eine Reihe von Geweben, wie Haut (Burke *et al.*, 1981) und Knorpel (Lindahl *et al.*, 2003) sowie ein Stück einer Luftröhre (Steinke *et al.*, 2015), erfolgreich transplantiert werden. Neben der Entwicklung von Gewebestrukturen, die dem Ersatz im Menschen dienen, können die bioartifiziellen Gewebe auch als patienten-spezifische *in vitro* Modelle zur Medikamententestung verwendet werden. So dienen künstlich hergestellte Hautmodelle zur

routinemäßigen Testung von möglichen Irritationen in der Kosmetikindustrie und ersetzen damit eine Vielzahl von mittlerweile verbotenen Tierversuchen.

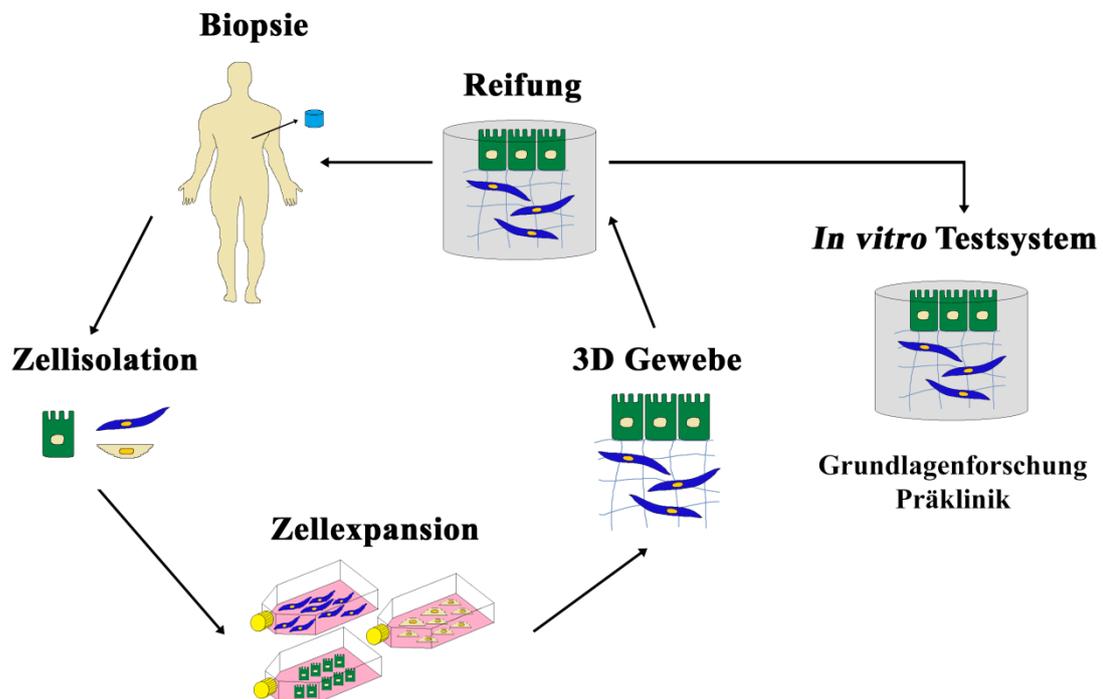


Abbildung 5: Das Prinzip des Tissue Engineering

Aus einem Biopsat, das einem Patienten entnommen wurde, werden zunächst Zellen isoliert und *in vitro* expandiert. Um ein 3D Gewebe zu generieren, erfolgt die weitere Kultivierung der Zellen auf einer Trägerstruktur. Die Reifung des Gewebes wird dabei durch Bioreaktoren unterstützt. Nach vollständiger Ausbildung des Gewebes, kann dieses entweder zurück in den Patienten transplantiert oder als humanes 3D *in vitro* Testsystem verwendet werden. Dabei finden diese Testsysteme sowohl in der Grundlagen- als auch in der präklinischen Forschung Anwendung (modifiziert nach Walles et al., 2007).

Zur erfolgreichen *in vitro* Züchtung der Gewebekonstrukte tragen eine Vielzahl von Parametern, wie die Auswahl einer geeigneten Trägerstruktur, bei. Neben den bereits weiter oben beschriebenen natürlichen Materialien, bieten die häufig verwendeten synthetisch hergestellten Scaffolds einige Vorteile. Dazu zählen die Kontrolle der Materialeigenschaften wie Porosität, Mikrostruktur, Stärke und Degradationszeit (Langer und Vacanti, 1993). Zudem kann die Adhärenz der Zellen durch chemische Modifikation verbessert und wachstumsfördernde Faktoren können in die Matrix integriert werden.

Eine andere Möglichkeit Trägerstrukturen für das Tissue Engineering herzustellen, ist die Dezellularisierung von Organen, die in einem Scaffold mit organspezifischer Architektur und ECM resultiert (Badylak et al., 2011). Das Ziel der Dezellularisierung ist es,

die ECM von den nativen Zellen und dem genetischen Material zu befreien und gleichzeitig die strukturellen, biochemischen und biomechanischen Eigenschaften zu erhalten (Gilpin und Yang, 2017). Dabei können die Zellen durch chemische, enzymatische, physische oder kombinierte Methoden entfernt werden. Die azelluläre ECM kann anschließend mit den gewünschten Zellen des Patienten wieder besiedelt werden. Ein Beispiel für solch eine Trägerstruktur ist die BioVaSc® (**B**iological **V**ascularized **S**caffold), welche intensive Anwendung am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin in Würzburg findet (Mertsching *et al.*, 2005; Schultheiss *et al.*, 2005). Dieser Scaffold stammt aus dem Schweinedünndarm und wird durch Resektion und anschließender Dezellularisierung mit Desoxycholsäure generiert (siehe Abschnitt 4.3.1) und dient zur Etablierung von Darm- (Schweinlin *et al.*, 2016) oder Tumormodellen (Moll *et al.*, 2013; Nietzer *et al.*, 2016).

Ein weiterer wichtiger Aspekt in der Ausbildung von Geweben *in vitro* ist die Verwendung von Bioreaktoren. Diese erlauben es dem Benutzer die Kulturbedingungen zu kontrollieren und verbessern den Stofftransport von Nährstoffen und Abfallprodukten (Vacanti und Langer, 1999). Zudem bietet die Kultur in einem dynamischen System auch mechanische Reize, die sich vorteilhaft auf die Entwicklung des Gewebes auswirken (Pollok *et al.*, 1998; Vunjak-Novakovic *et al.*, 1999).

Zusammenfassend stellt das Tissue Engineering eine geeignete Plattform für die Entwicklung von patientennahen 3D Tumormodellen dar. Diese Modelle können die *in vivo* Eigenschaften der Tumore besser widerspiegeln und damit zu einem besseren Verständnis der Tumorbiologie beitragen (Fischbach *et al.*, 2007). Darüber hinaus können diese 3D Modelle als Testsysteme in der Medikamentenentwicklung dienen und dadurch zahlreiche Tierversuche ersetzen.

2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein humanes 3D Lungentumor-Testsystem mit Hilfe des Tissue Engineering weiter zu entwickeln und für verschiedene klinisch relevante Fragestellungen zu validieren. Damit eine Vergleichbarkeit der 3D Modelle untereinander gewährleistet werden konnte, sollte zunächst eine SOP zur standardmäßigen Herstellung der Tumortestsysteme etabliert und das System hinsichtlich der Schwankungen bewertet werden. Anschließend sollte das 3D Modell anhand zweier biomarkergeleiteter Therapien mit bekannter klinischer Wirkung als Testsystem validiert werden. Dabei war es entscheidend, dass sowohl eine Therapie mit positivem Ansprechen als auch eine mit Nichtansprechen im Patienten in dem 3D Modell getestet wird. Diese Herangehensweise sollte es ermöglichen, einzuschätzen, inwieweit mittels des neuen Tumortestsystems wirksame von unwirksamen Substanzen unterschieden werden können. Die Analyse von Änderungen in der Signaltransduktion nach Therapie sollte weiterhin aufklären, welche Mechanismen sich in 3D von konventioneller 2D Kultur unterscheiden und die Grundlage für bioinformatische Vorhersagen für Zielstrukturen legen. Das Voranschreiten von Krebserkrankungen ist auch immer mit einer schlechteren Prognose für den Patienten verbunden. So stellen Invasionsprozesse und auftretende Resistenzen gegenüber Medikamenten große Probleme bei der Bekämpfung von Tumoren dar. Aus diesem Grund sollte das 3D Lungentumor-Testsystem in einem nächsten Schritt so erweitert werden, dass eine EMT und damit verbundene Invasionsprozesse untersucht werden können. Weiterhin sollten im Rahmen dieser Arbeit 3D Modelle mit resistenten Zellsubpopulationen etabliert und im Hinblick auf Mutationen, Signaltransduktionsänderungen, EMT-Status und miRNA-Expression charakterisiert werden. Da neben den zielgerichteten Therapien vor allem Immuntherapien in der Klinik Erfolge zeigen, sollte final eine neuartige Behandlung mit CAR T-Zellen in dem Modell ausgetestet werden. Dies sollte eine Einschätzung erlauben, ob das Testsystem für die Untersuchung und Optimierung solcher alternativer Strategien zur Bekämpfung von Krebs geeignet ist. Eine solche Untersuchung ist klinisch besonders relevant, da derzeit Tumormodelle für die Übertragung der CAR T-Zelltherapie von Leukämien auf solide Tumore benötigt werden. Beurteilt werden sollte hier, ob die T-Zellen in das künstliche Gewebe unter statischen sowie dynamischen Kulturbedingungen einwandern, ob sie proliferieren und ob sie ihre Effektorfunktionen ausüben.

3 Materialien

3.1 Biologisches Material

3.1.1 Zelllinien

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Lieferant
HCC827	Humane Adenokarzinomzelllinie, epithelial, adhären	DSMZ
A549	Humane Lungenkarzinom Zelllinie, epithelial, adhären	DSMZ
H441	Humane Adenokarzinomzelllinie (papillär), epithelial, adhären	ATCC
HCCres A1	Durch kontinuierliche Zugabe von 1 μ M Gefitinib aus HCC827-Zellen etabliert, nicht vollständig resistent	-
HCCres A2	Durch kontinuierliche Zugabe von 1 μ M Gefitinib aus HCC827-Zellen etabliert, resistent	-
HCCres A3	Durch kontinuierliche Zugabe von 1 μ M Gefitinib aus HCC827-Zellen etabliert, resistent	-

HCC827

Die humane NSCLC Zelllinie HCC827 wurde 1994 aus der Lunge einer 39 Jahre alten Frau mit NSCLC des Adenokarzinomtyps etabliert (Virmani *et al.*, 1998; Girard *et al.*, 2000). Die großen, adhären als Monolayer wachsenden Zellen sind vom epithelialen Phänotyp und besitzen eine aktivierende *EGFR*-Mutation. Im Datenblatt der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) ist folgende Markerexpression angegeben; Cytokeratin +, Cytokeratin 7 +, Cytokeratin 8 +, Cytokeratin 17 +, Cytokeratin 18 +, Desmin -, Endothel -, epitheliales Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) +, GFAP -, Neurofilament -, Vimentin +. Als Kulturmedium wurde 80 % *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-1640 Medium mit 20 % fetalem Kälberserum (FCS) verwendet.

A549

Die humane Lungenkarzinomzelllinie A549 wurde 1972 aus dem explantierten Lungentumor eines 58 Jahre alten Mannes etabliert (Giard *et al.*, 1973; Lieber *et al.*, 1976). Die adhärenz als Monolayer wachsenden Zellen werden als epithelial beschrieben und besitzen eine *KRAS*-Mutation. Im Datenblatt des DSMZ ist folgende Markerexpression angegeben: Cytokeratin +, Cytokeratin 7 +, Cytokeratin 8 +, Cytokeratin 17 -, Cytokeratin 18 +, Desmin -, Endothel -, EpCAM -, Saures Gliafaserprotein (GFAP) -, Neurofilament -, Vimentin +. Als Kulturmedium wurde 90 % RPMI-1640 Medium mit 10 % FCS verwendet.

H441

Die humane Adenokarzinomzelllinie wurde 1982 aus der Perikardflüssigkeit eines männlichen Patienten mit papillärem Adenokarzinom der Lunge etabliert (Brower *et al.*, 1986; Broers *et al.*, 1988). Es ist beschrieben, dass diese Zelllinie sowohl die mRNA als auch das Protein des *Major surfactant apoprotein* (SP-A) exprimiert (O'Reilly *et al.*, 1988). Die H441-Zellen besitzen ebenfalls eine aktivierende *KRAS*-Mutation, sind aber im Gegensatz zu den A549-Zellen von dieser abhängig und werden als differenzierter beschrieben. Als Kulturmedium wurde 90 % RPMI-1640 Medium mit 10 % FCS verwendet.

HCCres A1, HCCres A2 und HCCres A3

Die Subpopulationen HCCres A1, HCCres A2 und HCCres A3 wurden aus der Gefitinib-sensitiven Zelllinie HCC827 generiert (Abschnitt 4.4).

3.1.2 Tumorbiopsate

Alle in dieser Arbeit verwendeten Tumorbiopsate wurden von der Klinik und Poliklinik für Thorax-, Herz- und thorakale Gefäßchirurgie, Würzburg, durch Prof. Dr. med. Thorsten Walles zur Verfügung gestellt. Die Biopsien wurden nach schriftlicher Einwilligung der Patienten sowie der Zustimmung der Studie nach den Anforderungen der zuständigen Ethikkommission der Julius-Maximilians-Universität Würzburg durchgeführt (Referenz 182/10, 4. April 2011).

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Biopsate

Biopsat	Beschreibung
#195	Gut differenziertes, tubuläres Adenokarzinom der Lunge, überwiegend muzinöser Subtyp, lepidisch wachsender Randbereich, Lymphknotenmetastase
#432	Adenokarzinom der Lunge mit überwiegend azinärem Wachstumsmuster, keine Metastasen
#434	Wenig differenziertes Adenokarzinom der Lunge, überwiegend solider Aufbau, Lymphknotenmetastase
#436	Adenokarzinom der Lunge nach pulmonal metastasierendem Rektumkarzinom, gemischter Subtyp (ca. 50 % papillär, ca. 30 % azinär, ca. 20 % lipidär), Lymphknotenmetastase

3.1.3 Schweinematric: SISmuc

Die SISmuc, bestehend aus der *small intestinal submucosa* (SIS) und **Mucosa** (Muc) basiert auf dem biologischen vaskularisierten Scaffold, der BioVaSc[®] (Mertsching *et al.*, 2005). Die Matrix besteht aus einem dezellularisierten Teilstück des Dünndarms, welches aus einem 17 bis 20 kg schweren Schwein der Deutschen Landrasse entnommen wurde. Sie setzt sich aus einer dichten Schicht an quervernetzten Kollagen- und Elastinfasern zusammen. Experimentelle Protokolle für die Präparation der BioVaSc[®] wurden bereits veröffentlicht (Schultheiss *et al.*, 2005; Linke *et al.*, 2007). Für die Herstellung der SISmuc wird nach dem Dezellularisierungsprozess der Gefäßbaum entfernt, sodass die Mucosa mit den Villi, Krypten und Strukturen der Basalmembran bestehen bleibt (Stratmann *et al.*, 2014; Göttlich *et al.*, 2016; Nietzer *et al.*, 2016).

3.2 Xenograftmodelle

Die HCC827- und A549-Xenografts wurden von der Oncotest GmbH zur Verfügung gestellt und nach dort etablierten Protokollen hergestellt: Die Kultivierung der Tumorzellen erfolgte in RPMI-1640 mit 10 % FCS, bis die Zellen ca. 80 % Konfluenz erreicht hatten. Nach einem Waschschrift mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) wurden die Tumorzellen in PBS resuspendiert und auf eine Konzentration von $2,5 \cdot 10^7$ Zellen/ml eingestellt. Nach Hautdesinfektion und Kennzeichnung der Maus, erfolgte die Injektion von $5 \cdot 10^6$ Zellen in 200 μ l Volumen mit einer 1 ml Spritze mit aufgesetzter 26G Kanüle

subkutan in die rechte oder linke Flanke. Zur Entnahme des Tumors für nachfolgende Analysen, wurde das zuvor narkotisierte Tier durch Genickbruch getötet. Anschließend erfolgte ein Hautschnitt in der Nähe des Tumors und das Tumorgewebe konnte frei präpariert werden. Unmittelbar nach der Entnahme wurde der Tumor für 24 h in 4 % Formalin fixiert, anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und dann in Paraffin eingebettet.

3.3 Kits

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Kits

Kit	Beschreibung	Hersteller/Lieferant
CellTiter-Glo [®] Luminescent Cell Viability Assay	Bestimmung der Zellvitalität in 2D Kultur	Promega (D), Kat.-Nr. G7570
CellTiter-Glo [®] 3D Viability Assay	Bestimmung der Zellvitalität in 3D Sphäroid-Kultur	Promega (D), Kat.-Nr. G7570
cDNA-iScript [™] Kit	cDNA-Synthese für qRT-PCR	BioRad (D), Kat.-Nr. 1708890
DC Protein Assay	Bestimmung der totalen Proteinkonzentration in Zelllysaten (basierend auf Lowry)	BioRad (D), Kat.-Nr. PD000KIT
DNeasy [®] Blood and Tissue Kit	DNA-Isolation	QIAGEN (D), Kat.-Nr. 69506
M30 CytoDeath [™] ELISA	<i>In vitro</i> Immunoassay zur quantitativen Bestimmung der Apoptose in Epithelzellen der Spezies Mensch, Affe und Rind	Peviva (S), Kat.-Nr. 10900
ProteomeProfiler [™] Human Phospho-Kinase-Array	Detektion von 43 phosphorylierten humanen Kinasen und der Gesamtmenge von zwei Proteinen	R&D Systems, Inc. (USA), Kat.-Nr. ARY003B
ProteomeProfiler [™] Human Phospho-Receptor Tyrosine Kinase-Array	Detektion von 49 verschiedenen phosphorylierten humanen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs)	R&D Systems, Inc. (USA), Kat.-Nr. ARY001B
RealTime-Glo [™] MT Cell Viability Assay	Messung der Zellvitalität in Echtzeit	Promega (D), Kat.-Nr. G7570
RNeasy [®] Micro Kit	mRNA-Isolation aus 3D Proben	QIAGEN (D), Kat.-Nr. 74004

Kit	Beschreibung	Hersteller/Lieferant
RNeasy® Mini Kit	mRNA-Isolation aus 2D Proben	QIAGEN (D), Kat.-Nr. 74104
WesternBright™ Quantum Chemilumi- nescence Substrate	Detektion von HRP-basierter Chemilumineszenz zur Entwick- lung von Western Blot Membra- nen	Biozym Scientific GmbH (D), Kat.-Nr. 541015

3.4 Antikörper

Soweit nicht anders aufgeführt, waren alle verwendeten Antikörper gegen humane Antigene gerichtet. Tabelle 5 zeigt die verwendeten Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen (IF), Immunhistochemische Färbungen (IHC) und Western Blot (WB).

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Antikörper²

Antikörper	Klon	Host	Konz./ Verdünnung	Hersteller/Lieferant
Akt (pan)	C67E7	Kaninchen	1:1.000 (WB)	Cell Signaling Technolo- gy (USA), Kat.-Nr. 4691
Alexa Fluor® 555 anti-Mouse IgG (H+L)	-	Esel	2 mg/ml, 1:400 (IF)	Thermo Fisher Scientific (D), Kat.-Nr. A-31570
Alexa Fluor® 555 anti-Rabbit IgG (H+L)	-	Esel	2 mg/ml, 1:400 (IF)	Thermo Fisher Scientific (D), Kat.-Nr. A-31572
Alexa Fluor® 647 anti-Mouse IgG (H+L)	-	Esel	2 mg/ml, 1:400 (IF)	Thermo Fisher Scientific (D), Kat.-Nr. A-31571
Alexa Fluor® 647 anti-Rabbit IgG (H+L)	-	Esel	2 mg/ml, 1:400 (IF)	Thermo Fisher Scientific (D), Kat.-Nr. A-31573
α-Tubulin	DM1A	Maus	1:2.000 (WB)	Cell Signaling Technolo- gy (USA), Kat.-Nr. 3873
β-Catenin	E247	Kaninchen	1:100 (IF)	Abcam pcl (GB), Kat.-Nr. 32572
CD45	2B11, PD7/26	Maus	1:100 (IF)	Agilent Technologies Deutschland GmbH (D), Kat.-Nr. M0701

Antikörper	Klon	Host	Konz./ Verdünnung	Hersteller/Lieferant
CK 18	DC10 (6)	Maus	1:100 (IF)	Dako Denmark A/S (DK), Kat.-Nr. M7010
Col IV	Polyklonal	Kaninchen	1:100 (IF)	Abcam pcl (GB), Kat.-Nr. ab6586
Cytokeratin, pan	C-11, PCK-26, CY90, KS1A3, M20, A53B/A2	Maus	1:100 (IF)	Sigma-Aldrich (D), Kat.-Nr. C2562
E-Cadherin	36/E- Cadherin	Maus	250 µg/ml, 1:100 (IF)	Cell Signaling Technolo- gy (USA), Kat.-Nr. 610181
EGFR	D38B1	Kaninchen	1:1.000 (WB)	Cell Signaling Technolo- gy (USA), Kat.-Nr. 4267
EpCAM	B302	Maus (IgG1)	300 µg/ml, 1:300 (DAB)	Abcam pcl (GB), Kat.-Nr. 8601
Erk1/2 (p44/p42)	137F5	Kaninchen	1:1.000 (WB)	Cell Signaling Technolo- gy (USA), Kat.-Nr. 4695
HSP60	Polyklonal	Kaninchen	1:20.000 (WB)	Abcam pcl (GB), Kat.-Nr. ab46798
Ki67	SP6	Kaninchen	1:100 (IF)	Abcam pcl (GB), Kat.-Nr. 166667
Met/HGFR	D1C2	Kaninchen	1:1.000 (WB)	Cell Signaling Technolo- gy (USA), Kat.-Nr. 8198
Mucin-1	GP1.4	Maus	1:100 (IF)	Imgenex (USA), Kat.-Nr. IMG-80045
Phospho-Akt (Ser473)	D9E	Kaninchen	1:1.000 (WB)	Cell Signaling Technolo- gy (USA), Kat.-Nr. 4060
Phospho-EGFR (Tyr1068)	Y68	Kaninchen	1:10.000 (WB)	Abcam pcl (GB), Kat.-Nr. 32430
Phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204)	D13.14.4E	Kaninchen	1:2.000 (WB)	Cell Signaling Technolo- gy (USA), Kat.-Nr. 4370
Ph.-IGF1R-β (Tyr1135/1136; Tyr1150/1151)	19H7	Kaninchen	1:1.000 (WB)	Cell Signaling Technolo- gy (USA), Kat.-Nr. 3024

Antikörper	Klon	Host	Konz./ Verdünnung	Hersteller/Lieferant
Phospho-Met (Tyr1234/1235)	D26	Kaninchen	1:1.000 (WB)	Cell Signaling Technology (USA), Kat.-Nr. 3077
Phospho-p53 (S46)	EP42Y	Kaninchen	1:1.000 (WB)	Abcam pcl (GB), Kat.-Nr. ab76242
Vimentin	EPR3776	Kaninchen	150 µg/ml, 1:100 (IF)	Abcam pcl (GB), Kat.-Nr. 92547

²IF: Immunfluoreszenzfärbung, IHC: Immunhistochemische Färbungen, WB: Western Blot

3.5 Primer

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Primer

Primer	NCBI-Nummer	Primersequenz
AGR2	NM_006408	V: GTGTAGGAGAGGGCCACAAG R: CGACTCACACAAGGCAGGT
GAPDH	NM_002046.3	V: TGACGCTGGGGCTGGCATTG R: GCTCTTGCTGGGGCTGGTGG
HPRT1	NM_000194.2	V: TGACCTTGATTTATTTTGCATACC R: CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT
MMP9	NM_004994	V: GCACTGCAGGATGTCATAGG R: ACGACGTCTTCCAGTACCGA
SERPINE1	NM_000602	V: TGGTGCTGATCTCATCCTTG R: AGAAACCCAGCAGCAGATTC
SPINK1	NM_003122	V: GGTGACCTGATGGGATTTCA R: CTGTCTGTGGGACTGATGGA
TFPI2	NM_006528	V: CACAGTCCCTCATCTTTTGGGA R: CGGATTGAGAACAGGTTTCC

3.6 Chemikalien

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller/Lieferant	Kat.-Nr.
17-AAG (Tanespimycin)	Absource Diagnostics GmbH (D)	S1141

Chemikalie	Hersteller/Lieferant	Kat.-Nr.
4',6-Diamidino-2-phenyl-indoldihydrochloride (DAPI)	Sigma-Aldrich (D)	D9542
Acetone ($\geq 99,5\%$)	Carl Roth GmbH (D)	5025.5
Acrylamide/Bisacrylamide Roptiphorese [®] Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH (D)	3029.1
Albumine Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH (D)	90604-29-8
Ammonium Persulfate (APS) ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$)	Carl Roth GmbH (D)	9592.1
Antikörperverdünnungslösung	DCS Innovative Diagnostik-Systeme (D)	ALI20R500
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH (D)	4227.1
Bromphenolblau Na-Salz	Carl Roth GmbH (D)	A512.1
BSA Protein Standard (2 mg/ml)	Sigma-Aldrich (D)	P083410
Kalziumchlorid (CaCl_2)	VWR (D)	1.02391.1000
Chloralhydrat ($\text{Cl}_3\text{CCH}(\text{OH})_2$)	VWR (D)	22682.265
Chloroform (CHCl_3)	Sigma-Aldrich (D)	372978
Citronensäure Monohydrat	VWR (D)	1.00244.1000
DAPI Fluoromount-G [®]	Southern-Biotech (USA)	SBA-0100-20
Descosept [®] AF	Dr. Schumacher GmbH (D)	00-311-050
Desoxycholsäure Natriumsalz ($\geq 98\%$)	Carl Roth GmbH (D)	3484.2
Desoyribonuklease I (Dnase I)	Roche (D)	10104159001
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (D)	D2438
Entellan [®]	Merck Chemicals GmbH (D)	107960
Eosin Y	Sigma-Aldrich (D)	E4009-5G
Eosin 1 %, wässrig	Morphisto (D)	10177
Ethanol absolut	Carl Roth GmbH (D)	9056.4
Ethanol 96 % vergällt	Carl Roth GmbH (D)	T171.4
Ethylendiamintetraessigsäure ($\text{EDTA-Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich (D)	E5134

Chemikalie	Hersteller/Lieferant	Kat.-Nr.
Gefitinib (Iressa [®] , ZD1839)	Absource Diagnostics GmbH (D)	S1025
Glycerin	Carl Roth GmbH (D)	3783.1
Glycin	Carl Roth GmbH (D)	3908.3
Hämatoxylin	Carl Roth GmbH (D)	3816.1
Hämatoxylin	Morphisto (D)	10231
Incidin [®] Plus	Ecolab Healthcare (D)	3011520
Kalziumchlorid (KCl)	Merck Chemicals GmbH (D)	1049361000
Kaliumaluminiumsulfat Dodecahydrat	Carl Roth GmbH (D)	7784249
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl ₂ · 6H ₂ O)	Carl Roth GmbH (D)	HN03.3
Methanol	Sigma-Aldrich (D)	34860-2.5R
Milchpulver	Carl Roth GmbH (D)	T145.3
Mowiol [®] 4-88	Sigma-Aldrich (D)	81381
Natriumazid (NaN ₃)	Carl Roth GmbH (D)	4221.1
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH (D)	HX00.3
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH (D)	CN30.3
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich (D)	201154-5G
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth GmbH (D)	HX01.2
Natriumhydroxid (NaOH) Pellets	Carl Roth GmbH (D)	G771.3
NaOH 1 N Maßlösung	Carl Roth GmbH (D)	K021.1
NaOH 5 M Maßlösung	Carl Roth GmbH (D)	KK71.1
Natriumiodat (NaIO ₃)	AppliChem GmbH (D)	A5027
Natriumorthovanadat (NaVO ₄)	Sigma-Aldrich (D)	S6508-10G
Natriumpyruvat (100 mM)	Invitrogen (D)	11360-039
Nonidet [®] P40 (NP40)	AppliChem GmbH (D)	A1694
Paraffin	Carl Roth GmbH (D)	6642.6
Penicillin/Streptomycin (PenStrep, 100-fach konzentriert)	Sigma-Aldrich (D)	P4333

Chemikalie	Hersteller/Lieferant	Kat.-Nr.
PBS-Pulver (w/o Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Biochrom GmbH (D)	L182-50
PBS-Lösung (w/ Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Sigma-Aldrich (D)	D8662
PBS-Lösung (w/o Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Sigma-Aldrich (D)	D8537
ProSieve [®] QuadColor [™] Protein Marker (4,6 bis 300 kDa)	Lonza (D)	193837
Protease Inhibitor Cocktail (Tabletten)	Roche (D)	04693116001
RPMI-1640 + GlutaMax [™] -I	Gibco [®] Life Technologies [™] (D)	61870-010
Roticlear [®]	Carl Roth GmbH (D)	A538.5
Roti [®] -Histofix 4 % (phosphatgepufferte Formaldehydlösung, pH 7)	Carl Roth GmbH (D)	P087.3
Salzsäure (HCl) rauchend 37 %	Carl Roth GmbH (D)	4625.2
Salzsäure 1 N Maßlösung	Carl Roth GmbH (D)	K025.1
Salzsäure 6 N Maßlösung	Carl Roth GmbH (D)	0281.1
Serum, Esel	BIOZOL Diagnostics Vertrieb GmbH (D)	ECL-ECS0217D
Serum, fetales Kälberserum (FCS)	Lonza (D)	Lot.-Nr. 8SB016
Serum, fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich (D)	Lot.-Nr. 022M3395
Serum, fetales Kälberserum (FCS)	Bio'N'Sell (D)	Lot.-Nr. BS196368 Lot.-Nr. BS196369 Lot.-Nr. BS196368 Lot.-Nr. BS210601
SsoFast [™] EvaGreen [®] Supermix (RT-qPCR)	BioRad Laboratories GmbH (D)	172-5202
TEMED (N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin)	Carl Roth GmbH (D)	2367.2
TGF-β1 (mit Carrier)	Cell Signaling (D)	8915LC
Trizma [®] Base (Tris)	Sigma-Aldrich (D)	T6066

Chemikalie	Hersteller/Lieferant	Kat.-Nr.
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich (D)	X100
Trypanblau 0,4 %	Sigma-Aldrich (D)	P7949
Trypsin/EDTA-Stammlösung, 0,5 % (10-fach Konzentrat)	Invitrogen (D)	15400-054
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) (30 %)	Sigma-Aldrich (D)	216763
Xylol	Carl Roth GmbH (D)	9713.3

3.7 Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 8: Medien und Lösungen für die Zellkultur und zur Dezellularisierung

Puffer/Lösung	Zusammensetzung/Bemerkungen	
0,05 % Trypsin/EDTA	10 ml 90 ml	Trypsin/EDTA 0,5 % (10-fach) PBS ⁻ -Lösung bei 4 °C gelagert
17-AAG-Stammlösung 1 mM	500 µg 853,7 µl	17-AAG DMSO aliquotiert, bei -20 °C gelagert
Citratpuffer 20 mM	76,85 mg in 20 ml	Citronensäure Monohydrat Reinstwasser pH 3,0; sterilfiltriert, bei 4 °C gelagert
DNase-Lösung	100 mg 1 % (v/v) in 300 ml	DNase Pen/Strep PBS ⁺
Gefitinib-Stammlösung (100 mM)	10 mg 224 µl	Gefitinib DMSO aliquotiert, bei -20 °C gelagert
Kulturmedium A549- und H441- Zellen	10 % (v/v) in	FCS RPMI-1640
Kulturmedium HCC827- und Gefitinib-resistente Zellen	20 % (v/v) in	FCS RPMI-1640
Natriumdesoxycholsäure- Lösung	45 g in 5 l	Desoxycholsäure Natriumsalz Reinstwasser bei 4 °C gelagert

Puffer/Lösung	Zusammensetzung/Bemerkungen	
PBS ⁻	9,55 g in 1 l	PBS Pulver (w/o Ca ²⁺ und Mg ²⁺) Reinstwasser pH 7,2; autoklaviert, bei 4 °C gelagert oder PBS-Lösung (w/o Ca ²⁺ und Mg ²⁺)
PBS ⁻ /EDTA	1 l 0,2 g 500 ml 500 µl	PBS ⁻ Na ₂ -EDTA · 2H ₂ O pH 7,2; autoklaviert, bei 4 °C gelagert oder PBS-Lösung (w/o Ca ²⁺ und Mg ²⁺) 0,5 M Na ₂ -EDTA · 2H ₂ O
PBS ⁺	1 l 0,1 g 0,1 g	PBS ⁻ MgCl ₂ · 6H ₂ O CaCl ₂ oder PBS-Lösung (w/ Ca ²⁺ und Mg ²⁺)
TGF-β1-Stammlösung 62,5 µg/ml	10 µg 160 µl	TGF-β1 20 mM Citratpuffer, steril, pH 3,0; aliquotiert, bei -20 °C gelagert

Tabelle 9: Puffer und Lösungen für die Histologie und Immunhistologie

Puffer/Lösung	Zusammensetzung/Bemerkungen	
Blockierlösung	5 % (v/v) in	Eselserum Antikörperverdünnungslösung frisch angesetzt
Citratpuffer-Stammlösung (10-fach Konzentrat)	42 g/l 17,6 g/l in	Citronensäure Monohydrat NaOH Pellets Reinstwasser pH 6,0; bei 4 °C gelagert
Citratpuffer-Arbeitslösung	10 % (v/v) in	Citratpuffer-Stammlösung Reinstwasser
Einbettmittel (wasserlöslich)	0,1 % in	DAPI Mowiol [®] 4-88 bei -20 °C gelagert
Eosin	10 mg/ml in	Eosin Y Reinstwasser bei Raumtemperatur (Rt) gelagert oder Eosin von Morphisto

Puffer/Lösung	Zusammensetzung/Bemerkungen	
Hämalaun	1,2 g/l 0,2 g/l 20 g/l 20 g/l 1 g/l in	Hämatoxylin NaIO ₃ Kaliumaluminiumsulfat Chloralhydrat Citronensäure Monohydrat Reinstwasser nach 4 Wochen Reifung benutzt, bei Rt gelagert oder Hämalaun von Morphisto
HCl-Ethanol	6,85 % (v/v) in	HCl, 1M Ethanol, 50 % bei Rt gelagert
H ₂ O ₂ 3 %	10 % (v/v) in	H ₂ O ₂ 30 % Reinstwasser frisch angesetzt
Permeabilisierungslösung	0,2 % (v/v) in	Triton™ X-100 PBS ⁻ bei Rt gelagert
Waschpuffer (PBS-T)	10 % (v/v) 0,5 % (v/v) in	Waschpuffer-Stammlösung Tween®-20 Reinstwasser bei Rt gelagert
Waschpuffer-Stammlösung (PBS, 10-fach Konzentrat)	1.370 mM 26,8 mM 14,5 mM 64,6 mM in	NaCl KCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ PO ₄ · 2H ₂ O Reinstwasser pH 7,2, autoklaviert, bei Rt gelagert

Tabelle 10: Puffer und Lösungen für die Proteinbiochemie

Puffer/Lösung	Zusammensetzung/Bemerkungen	
Antikörperverdünnungslösung	5 % (w/v) 0,1 % (v/v) in	Milchpulver NaN ₃ , 10 % Waschpuffer (TBS-T) bei 4 °C gelagert oder
	5 % (w/v) 0,1 % (v/v) in	Albumine Fraktion V (BSA) NaN ₃ , 10 % Waschpuffer (TBS-T) bei 4 °C gelagert

Puffer/Lösung	Zusammensetzung/Bemerkungen	
Blotpuffer	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	20 % (v/v)	Methanol
	in	Reinstwasser
		bei 4 °C gelagert
Blockierlösung	5 % (w/v)	Milchpulver
	in	Waschpuffer (TBS-T)
		bei 4 °C gelagert
Elektrophoresepuffer	10 % (v/v)	Elektrophoresepuffer-Stammlösung
	in	Reinstwasser
		bei Rt gelagert
Elektrophoresepuffer-Stammlösung (10-fach Konzentrat)	1.920 mM	Glycin
	250 mM	Tris Base
	1,5 % (w/v)	SDS
	in	Reinstwasser
		bei Rt gelagert
Laemmli-Puffer	1,5 M	Tris Base, pH 6,8
	10 % (v/v)	Glycerin
	5 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	2 % (w/v)	SDS
	0,01 % (w/v)	Bromphenolblau Na-Salz
		bei -20 °C gelagert
Lysepuffer: modifizierter RIPA-Puffer	137 mM	NaCl
	50 mM	NaF
	20 mM	Tris Base, pH 8,0
	2 mM	EDTA
	10 % (v/v)	Glycerin
	1,0 % (v/v)	Nonidet® P40
	0,5 % (w/v)	Desoxycholsäure Natriumsalz
	0,1 % (w/v)	SDS
	in	Reinstwasser
		bei 4 °C gelagert
		vor Gebrauch zugeben:
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	1 Tablette	Protease Inhibitor Cocktail auf 10 ml Lysepuffer
Sammelgel, 5 % (für 2 Gele)	1,25 ml	Sammelgelpuffer (4-fach Konzentrat)
	0,5 ml	Acrylamid/Bisacrylamid
	3,2 ml	Reinstwasser
	12 µl	APS, 40 %
	12 µl	TEMED
		direkt vor Gebrauch herstellen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung/Bemerkungen	
Sammelgelpuffer (4-fach Konzentrat)	0,5 M 0,4 % (w/v)	Tris Base, pH 6,8 SDS bei Rt gelagert
Stripping-Puffer	1,5 % (w/v) 0,1 % (w/v) 1,0 % (v/v) in	Glycin SDS Tween®-20 Reinstwasser pH 2,2; bei Rt gelagert
Trenngel, 10 % (für zwei Gele)	2,5 ml 3,3 ml 2,2 ml 2 ml 14 µl 14 µl	Trenngelpuffer (4-fach Konzentrat) Acrylamid/Bisacrylamid Reinstwasser Glycerol APS, 40 % TEMED direkt vor Gebrauch herstellen
Trenngelpuffer (4-fach Konzentrat)	1,5 M 0,4 % (w/v)	Tris Base, pH 8,8 SDS bei Rt gelagert
Waschpuffer (TBS-T)	10 % 0,5 % in	Waschpuffer-Stammlösung Tween®-20 Reinstwasser bei Rt gelagert
Waschpuffer-Stammlösung	1,5 M 500 mM in	NaCl Tris Base Reinstwasser pH 7,6; bei Rt gelagert

3.8 Verbrauchs- und Labormaterialien

Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller/Lieferant
Autoklavierbeutel	Hartenstein (D)
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH (D)
Deckgläschen für Objektträger (24 · 60 mm)	Menzel-Gläser (D)
Deckgläschen rund Ø 12 mm	Marienfeld GmbH & Co KG (D)
Dichtungsringe (O-Ringe)	Dichtelemente arcus GmbH (D)

Verbrauchsmaterial	Hersteller/Lieferant
Druckdom (844-28)	Memscap AS (N)
Eimalpipetten: 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Greiner Bio-One (D)
Einbettkassetten	Klinipath (NL)
Fettstift	Dako (D)
Filterpapier zum Einbetten	Labonord (D)
Frischhaltefolie	Toppits (D)
Fusselneie Tücher	Hartenstein (D)
Handschuhe:	
Latex	Cardinal Health (D)
Nitril	Medline International Germany GmbH (D)
Kryoröhrchen (1,8 ml), Nunc™	VWR (D)
Luftfilter, steril (16596-HYK)	Sartorius AG (D)
Mikrotomklingen Typ A35	pfm Medical (D)
Nitrozellulose (Protran) Blotmembran	Whatman (GB)
Objektträger:	
Unbeschichtet (26 · 16 · 1 mm)	Menzel (D)
Polysine™ (25 · 75 · 1 mm)	Langenbrinck (D)
Parafilm® M	Carl Roth GmbH (D)
Pasteurpipetten	Brand (D)
PCR-ReaktionsgefäÙe	Hartenstein
Petrischalen 60 · 15 mm	TPP Techno Plastik Products AG (CH)
Petrischalen 145 · 20 mm	nerbe plus GmbH (D)
Pipettenspitzen: 0,5–10 µl, 10–100 µl, 100–1.000 µl	Eppendorf (D)
Filterspitzen: 0,1–10 µl, 10–100 µl, 100–1.250 µl	nerbe plus GmbH (D)
Pumpschlauch (SC0746)	Ismatec (D)
QIAshredder Mini Spin Column	QIAGEN (D)
qRT-PCR Folien	BioRad (D)
qRT-PCR Platten	BioRad (D)

Verbrauchsmaterial	Hersteller/Lieferant
Reaktionsgefäße: 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG (D)
Skalpellklingen, abgerundet	Bayha (D)
Silikonschläuche (9531.1)	Carl Roth GmbH (D)
Sicherheitskanülen Vasofix®	B.Braun Melsungen AG (D)
Spritzen: 5 ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml	BD Bioscience (D)
Sterilfilter Ø 50 mm, Porengröße 0,2 µm	Sartorius Stedium Biotech (D)
Teflonband (12 m · 12 mm · 0,075 mm)	Hydrasun Ltd (GB)
Wägeschalen	Hartenstein (D)
Whatman Filterpapier	Hartenstein (D)
Zellkulturflaschen: 25 cm ² , 75 cm ² , 150 cm ²	TPP Techno Plastik Products AG (CH)
Zellkultur MultiWellplatten: 6-, 12-, 24-, 96-Well	TPP Techno Plastik Products AG (CH)
Zellkultur-MultiWellplatten, 96-Well, weiß	Greiner Bio-One (D)
Zellschaber	Sarstedt (D)
Zentrifugenröhrchen: 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One (D)

Tabelle 12: Übersicht der verwendeten Labormaterialien

Labormaterial	Hersteller/Lieferant
Bechergläser: 250 ml, 500 ml, 1 l, 5 l	
Glas	Schott (D)
Plastik	Bürkle GmbH (D)
Flussreaktoren	GT-Labortechnik (D), Design Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, Würzburg
Gestell für Reaktionsgefäße	neoLab (D)
Gestell für Zentrifugenröhrchen	neoLab (D)
Glasflaschen: 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1.000 ml, 2.000 ml	Brand (D)
Glaspipetten: 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Brand (D)
Handstückzähler	neoLab (D)

Labormaterial	Hersteller/Lieferant
Kälteschutzhandschuhe	VWR (D)
Kühlblock für qRT-PCR Iso Freeze®	Hartenstein (D)
Löffelspatel	Hartenstein
Luer-Lock Adapter	Nordson Medical (USA)
Magnetrührstäbchen	Hartenstein
Magnetständer	Invitrogen (D)
Mehrkanalpipette	Eppendorf (D)
Messkolben: 250 ml, 500 ml, 1 l, 2 l, 5 l	Hirschmann Laborgeräte GmbH (D)
Messzylinder: 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1.000 ml	
Glas	Brand (D)
Plastik	Vitlab GmbH (D)
Metallwanne mit Deckel	Carl Roth GmbH (D)
Multistep Pipette	Brand (D)
Mr. Frosty™ Einfrierhilfe	VWR (D)
Nanodrop-Messplatte	Tecan Deutschland GmbH (D)
Neubauer Zählkammer	Marienfeld GmbH & Co KG (D)
Objektträgerhalter (Glas, Edelstahl)	Mercateo (D)
Paraffin-Ausgießform (24 · 37 · 9 mm)	Labonord (D)
Pinzetten	Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co KG (D)
Pipetten: 0,5–10 µl, 10–100 µl, 100–1.000 µl	Eppendorf (D)
Pipettierhilfe Accu-jet® pro	Brand (D)
Pumpschlauchkassette	Ismatec (D)
Schutzbrille	neoLab (D)
Skalpellklingenhalter	Bayha (D)
Spatel	Hartenstein (D)
Sprühflaschen	Hartenstein (D)
Trichter	Hartenstein (D)

Labormaterial	Hersteller/Lieferant
Zellkronen aus A4 und PEEK	GT-Labortechnik (D), Design Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regen. Medizin, WÜ

3.9 Laborgeräte

Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Laborgeräte

Laborgerät	Hersteller
Analysenwaagen: Kern ABJ 220-4M und EG 2200-2NM	Kern & Sohn GmbH (D)
Absaugsystem Vacusafe	NTEGRA Biosciences GmbH(D)
Abzug	Prutscher Laboratory Systems GmbH (A)
Autoklaven: Systec DX-45, Systec VX-150 Technoclav	Systec GmbH (D) Integra Biosciences AG (CH)
Blot-Kammern: Biometra Fastblot B44 Peqlab PerfectBlue™ Sedec M	Biometra GmbH (D) VWR Life Science Competence Center (D) VWR Life Science Competence Center (D)
Brutschrank	Heraeus Holding GmbH (D)
CFX96 (RT-PCR)	BioRad (D)
Dampfgarer MultiGourmet	Braun (D)
Digitalkamera	Canon (D)
Drucksensor	HJK Sensoren/Syst. GmbH & Co. KG (D)
Einbettautomat Microm STP120	Thermo Fisher Scientific (D)
Einbettkassettenbeschriftungsgerät VCP-5001	Vogel Medizintechnik (D)
Eismaschine AF-80 Scotsman	HIBU Eismaschinen GmbH & Co. KG (D)
FluorChem™ Q Bildaufnahme Gerät	CellBiosciences (D)
Flüssigstickstofftank MVE 815 P190	German-cryo (D)
Gefrierschränke: -80 °C HFU586 Basic -20 °C Comfort	Heraeus Holding GmbH (D) Liebherr (D)

Laborgerät	Hersteller
Gelkammern: Peqlab PerfectBlue™ Dual, Twin S	VWR Life Science Competence Center (D)
Heißluftsterilisator	Memmert GmbH + Co KG (D)
Inkubatoren für Bioreaktoren	Lehrstuhl für Tissue Engineering und regenerative Medizin, Würzburg (D)
Kühlplatte Leica EG1150 C	Leica (D)
Kühlraum (4 °C)	Genheimer (D)
Kühlschrank MediLine	Liebherr (D)
Laborspülmaschine	Miele (D)
Magnetrührer 720-HPS	VWR (D)
Magnetrührer topolino	SuboLab GmbH (D)
Mikroplattenleser Tecan Infinite® M200	Tecan Deutschland GmbH (D)
Mikroskope: Hellfeld: Axio Lab.A1 Konfokalmikroskop TCS-SP8 Digitalmikroskop BZ-9000	Carl Zeiss Microscopy GmbH (D) Leica (D) Keyence (D)
Objektträgerbeschriftungsgerät VSP-5001	Vogel Medizintechnik (D)
Orbitalschüttler KM-2 Akku	Edmund Bühler GmbH (D)
Paraffineinbettstation EG1150H	Leica (D)
Paraffinstreckbad GFL1052	Gesellschaft für Labortechnik mbH (D)
PCR Thermocycler, SensQuest	BioRad (D)
pH-Meter	Mettler Toledo (D)
Schlauchpumpe	Ismatec (D)
Schlittenmikrotom Leica SM2010 R	Leica (D)
Sicherheitswerkbank Klasse II	ThermoScientific (D)
Stromversorgungsgeräte: Peqlab EV202 (Blotten) Peqlab EV243 (Elektrophorese)	VWR Life Science Competence Center (D)
ThermoMixer® Heizblock Comfort	Eppendorf (D)
Thermostat für das Wasserbad	Lauda (D)

Laborgerät	Hersteller
Tissue Lyser	QIAGEN (D)
Trockenschrank TDO66	Medite GmbH (D)
Vortexer Genie	Carl Roth GmbH (D)
Wasseraufbereitungssystem Milli-Q®	Merck-Millipore (D)
Wasserbad	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG (D)
Wippschüttler	VWR (D)
Zentrifugen:	
Zentrifuge 5417R	Eppendorf (D)
Multifuge X12	Thermo Fisher Scientific (D)
Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific (D)
Rotilabo	Carl Roth GmbH (D)

3.10 Software

Tabelle 14: Übersicht der verwendeten Software

Software	Beschreibung	Entwickler/Vertrieb
BioRad CFX Manager 3	qRT-PCR (CFX96)	BioRad (D)
BZ Analyzer	Bildbearbeitung am Keyence Mikroskop	KEYENCE Deutschland GmbH (D)
AlphaView FluorChem™ Q 3.2.2	Bildverarbeitungs- und Analysesoftware für Proteingele	ProteinSimple (USA)
Image J (Fiji)	Bildbearbeitungs- und Analysesoftware	Wayne Rasband, Nat. Inst. of Mental Health (USA)
Microsoft Excel 2013	Tabellenkalkulation	Microsoft® (USA)
Microsoft Word 2013	Textverarbeitung	Microsoft® (USA)
Microsoft Power Point 2013	Zusammenstellung der Abbildungen	Microsoft® (USA)
OriginPro 8.6	Datenanalyse und graphische Darstellung	OriginLab® (USA)
Paint	Design der Grafiken	Microsoft® (USA)
Photoshop Elements 14	Zusammenstellen der Abbildungen, Bildbearbeitung	Adobe Systems Software Ireland Limited (IRE)
R 3.3.0	Statistische Auswertung	R Foundation (A)

4 Methoden

4.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle sterilen Arbeiten erfolgten an Sicherheitswerkbänken der Klasse II. Zusätzlich mussten alle mehrfach verwendbaren Labormaterialien vor deren Verwendung autoklaviert oder heißluftsterilisiert sowie alle insterilen Lösungen sterilfiltriert werden. Alle verwendeten Medien und Lösungen wurden vor deren Gebrauch auf 37 °C im Wasserbad erwärmt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Brutschränken, welche eine konstante Temperatur von 37 °C, eine relative Luftfeuchte von 95 % und einen Kohlenstoffdioxidgehalt von 5 % gewährleisteten.

4.1.1 Kultivierung der Zelllinien HCC827, A549 und H441

Die adhärent wachsenden Zelllinien HCC827, A549 und H441 wurden in unbeschichteten Zellkulturflaschen in RPMI mit jeweils 20 % oder 10 % FCS kultiviert (Abschnitt 3.1.1). Ein Medienwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Das Passagieren der Zellen fand alle drei bis vier Tage bei einer Konfluenz von ca. 80 % wie in Abschnitt 4.1.4 beschrieben statt. In regelmäßigen Abständen wurde eine PCR zum Ausschluss einer Mycoplasmen-Kontamination durchgeführt.

4.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Auftauen der Zellen:

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen mit den Zellen dem Stickstofftank entnommen und in einem 37 °C warmen Wasserbad leicht geschwenkt bis nur noch ein kleiner Eiskristall zu erkennen war. Die Röhrchen mussten anschließend gründlich von außen desinfiziert werden. Anschließend konnte die Zellsuspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt werden, das mit 9 ml zellspezifischem, vorgewärmten Medium gefüllt war. Nach 5 min zentrifugieren bei 300 x g, erfolgte das Absaugen des Überstandes und Resuspendieren des Zellpellets in 10 ml Medium. Die Zellsuspension wur-

de anschließend sofort in eine T75-Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank bei 37 °C kultiviert.

Einfrieren der Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese wie in Abschnitt 4.1.4 beschrieben abgelöst, gezählt (Abschnitt 4.1.5) und in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Einfriermedium resuspendiert. Dieses bestand zu 10 % aus DMSO, 20 % (A549, H441) oder 40 % FCS (HCC827, HCCres) und dementsprechend 70 % oder 50 % RPMI-1640 Medium. Nach Überführen von jeweils 1 ml Zellsuspension in vorbereitete Kryoröhrchen wurden diese für 24 h bei -80 °C in einer Einfrierhilfe (Mr. Frosty™) gelagert und anschließend in den Flüssigstickstofftank überführt.

4.1.3 Medienwechsel der Zelllinien

Nach der mikroskopischen Kontrolle der Zellen, zum Ausschluss von Kontaminationen und der Notwendigkeit des Passagierens, erfolgte das Absaugen des verbrauchten Mediums mit einer Pasteurpipette. Anschließend wurden die Zellen mit frischem zellspezifischem Medium versorgt (T75-Zellkulturflasche: 10 ml, T150-Zellkulturflasche: 20 ml).

4.1.4 Passagieren der Zelllinien

Das Passagieren der Zelllinien, welches nötig war, um deren Zelldichte zu begrenzen, erfolgte regelmäßig am Montag und Freitag. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit Waschpuffer (PBS-/EDTA) gespült (T75: 10 ml, T175: 15 ml), um Ionen wie Ca^{2+} zu entfernen und dadurch die Zell-Zell-Kontakte zu lösen. Nach dem Überschichten der Zellen mit Trypsin/EDTA (T75: 4 ml, T150: 8 ml), inkubierten diese für 3 min bei 37 °C. Das Ablöseverhalten der Zellen wurde anschließend unter dem Mikroskop kontrolliert und zusätzlich durch vorsichtiges Klopfen unterstützt. Sobald die Zellen vollständig abgelöst waren, konnte die Enzymreaktion durch Zugabe von 1 ml (T75), bzw. 2 ml (T150) FCS abgestoppt werden. Nach dem Überführen der Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen und 5 min Zentrifugation bei 300 x g wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 5 bis 10 ml zellspezifischem Me-

dium resuspendiert. Das Aussäen der Zellen in der gewünschten Zelldichte (Tabelle 15) erfolgte nach Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (Abschnitt 4.1.5).

Tabelle 15: Aussaatdichte der Zelllinien

Zelllinie	Kulturdauer [d]	Aussaatdichte
HCC827, HCCres	4	1·10 ⁶ Zellen/T150
	3	1,2·10 ⁶ Zellen/T150
A549	4	8·10 ⁵ Zellen/T75
	3	1·10 ⁶ Zellen/T75
H441	3	2·10 ⁶ Zellen/T75
	7	1·10 ⁶ Zellen/T75

4.1.5 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Neubauer-Zählkammer und Trypanblau-Färbung dienen zur Bestimmung der Zellzahl während des Passagierens von Zellen sowie zum Ansetzen von 2D und 3D Versuchen. Nach dem Ablösen und der Zentrifugation der Zellen wurde die Zellsuspension dafür 1:2 (Verdünnungsfaktor VF = 2) mit Trypanblau-Lösung verdünnt und ca. 10 µl des Probengemisches in eine vorbereitete Neubauer-Zählkammer überführt. Anschließend erfolgte das Auszählen der Zellen in allen Großquadraten einer Kammer. Durch das Trypanblau erschienen tote Zellen im Mikroskop blau, während lebende Zellen durch ihre intakte Membran vor dem Eindringen des Farbstoffes geschützt und deshalb weiß zu sehen waren. Die Lebendzellzahl und die Vitalität wurden wie in Formel 1 und 2 dargestellt bestimmt.

Formel 1:

$$\frac{\text{Lebendzellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{4} \cdot 10.000 (\text{Volumen der Zählkammer}) \cdot 2 (\text{VF})$$

Formel 2:

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{Lebendzellzahl}}{\text{Gesamtzellzahl}} \cdot 100 \%$$

4.2 2D Zellkultur

Zum Vergleich der 3D Tumormodelle mit konventionellen Modellen, wurden parallel Versuche in 2D durchgeführt. Dafür erfolgte die Aussaat der Zellen wie in Tabelle 16 dargestellt an Tag 0. Die Kultivierungsdauer betrug in den Behandlungsversuchen vier Tage, wobei ab Tag 1 das jeweils relevante Medikament (Gefitinib oder 17-AAG) zugegeben wurde. Bei der Stimulation mit TGF- β verlängerte sich die Kulturdauer um drei Tage, wobei ab Tag 1 stimuliert wurde. Die Aussaatdichte war in diesen Versuchen um ca. 20 bis 50 % geringer.

Tabelle 16: Aussaatdichten der Zellen in 2D Kultur

Analyse	Zellkulturgefäß	Aussaatdichte [Zellen/Well, Schale]	Medienvolumen [ml]
Immunfluoreszenz	24-Well Platte	$2,5 \cdot 10^4$	0,5
CellTiter-Glo®	96-Well Platte	$3 \cdot 10^3$ bis $6 \cdot 10^3$	0,1
M30 CytoDeath™/ Proliferation	12-Well Platte	$5 \cdot 10^4$ bis $1 \cdot 10^5$	0,8
Western Blot, Phospho-RTK- Array, PK-Array	60 mm Petrischalen	$3 \cdot 10^5$ bis $6 \cdot 10^5$	5,0

4.3 Aufbau von einem humanen 3D Tumortestsystem

4.3.1 Herstellung des Scaffolds SISmuc

Das humane 3D Tumortestsystem wurde auf Basis der SISmuc aufgebaut. Für die Herstellung des biologischen Scaffold musste zunächst ein Dünndarmabschnitt aus 8 bis 11 Wochen alten, 17 bis 20 kg schweren Schweinen entnommen werden. Dies geschah am Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin (ZEMM, Würzburg), indem in die Arterie des Dünndarmsegments eine 20G Kanüle gelegt und gründlich mit Ringerlösung gespült wurde, welche mit 10 U/ml Heparin versetzt war. Nach der Explantation des 1,5 bis 2 m langen Darmabschnittes, erfolgte die Dezellularisierung am Lehrstuhl für Tissue Engineering nach bereits publizierten und angepassten Protokollen (Schultheiss *et al.*, 2005; Linke *et al.*, 2007). Dafür wurden das Lumen sowie das vaskuläre System zunächst gründlich mit PBS⁻ gewaschen, bis das Gefäß blutleer und das

Lumen Faeces-frei war. Das mit PBS⁻ (mit 1 % Pen/Strep) befüllte Darmsegment inkubierte anschließend über Nacht bei 4 °C auf einem Wippschüttler. Am nächsten Tag wurde das Lumen sowie das Gefäßsystem durch Spülen mit 500 ml PBS⁻ (w/o Pen/Strep) von Antibiotika befreit. Anschließend erfolgte das Befüllen des Lumens mit einer 2,25 %igen Natriumdesoxycholsäure-Lösung, während gleichzeitig 2 l dieser Lösung durch die Gefäße gespült wurden. Jedes Mal, wenn 500 ml der Dezellularisierungslösung durch die Gefäße gespült worden waren, wurde die Lösung aus dem Darm-lumen ausgestrichen und frische Lösung eingefüllt. In den Gefäßen durfte bis zu diesem Zeitpunkt ein Druck von 50 mmHG nicht überschritten werden. Die Regulation der entsprechenden Pumpgeschwindigkeit erfolgte dabei über einen Drucksensor. Im Anschluss wurden das Lumen und das Gefäßsystem bei einem maximalen Druck von 80 mmHG erneut mit 2 l PBS⁻ gespült, danach mit Natriumdesoxycholsäure-Lösung befüllt und über Nacht in dieser Lösung bei 4 °C auf einem Wippschüttler inkubiert. Bevor am nächsten Tag die *Serosa* mit Gefäßbaum von der *Submucosa* mit *Mucosa* getrennt wurde, musste erneut mit 3 l PBS⁻ bei maximalem Druck von 80 mmHG gespült werden. Abschließend konnte der Darm in 8 bis 10 cm lange Stücke geschnitten, dreimal in PBS⁻ mit 1 % Pen/Strep gewaschen und über Nacht bei 4 °C in DNase (333 mg/l in PBS⁺ mit Pen/Strep) inkubiert werden. Vor der Gamma-Sterilisation (25 kGy, BBF Sterilisationsservice GmbH) am nächsten Tag erfolgten nochmals drei Waschschrte mit PBS⁻.

Die Qualität der SISmuc wurde wie folgt sichergestellt: Der Nachweis der erfolgreichen Azellularisierung erfolgte über eine H&E-Färbung sowie eine DNA-Färbung nach Feulgen. Die Entfernung des Tensids Natriumdesoxycholol wurde über einen Gallsäuretest sichergestellt.

4.3.2 Aufbau des Tumormodells

Der Aufbau sowie die Behandlung des Tumormodells wurden im Rahmen dieser Arbeit als *Standard operation procedure* (SOP) festgelegt (siehe Anhang). Um die Tumorzellen in 3D auf der SISmuc kultivieren zu können, musste diese zwischen zwei ineinander passende Metallringe, der sogenannten Zellkrone, fixiert werden. Dafür wurde die SISmuc zunächst an einer Seite aufgeschnitten und so aufgeklappt, dass die luminale Seite nach oben zeigte. Nach dem Zurechtschneiden in kleinere Stücke, konnte die Matrix

über den inneren Ring der autoklavierten Zellkrone gezogen werden, sodass das Lumen nach unten zeigte. Die SISmuc wurde durch Aufsetzen des zweiten äußeren Ringes fixiert und anschließend umgedreht in eine 12-Well Platte überführt. Die mukosale Seite befand sich nun apikal und konnte mit den Tumorzellen besiedelt werden. Dafür wurde, nach zweistündiger Inkubation der Matrix im zellspezifischen Medium, dieses abgesaugt und die Tumorzellen in einer Zelldichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen/Krone in 500 μ l Medium in die Zellkrone pipettiert. Nach einer Adhärenzzeit von 2 h, erfolgte das Auffüllen mit Medium, sodass sich schließlich 1 ml Medium im Inneren der Zellkrone und 1,5 ml außerhalb befanden. Die Tumormodelle konnten im Anschluss entweder statisch (Abschnitt 4.3.3) oder nach dreitägiger Anwachsphase dynamisch (Abschnitt 4.3.4) bei 37 °C kultiviert werden.

4.3.3 Statische Kultivierung

Nach der in Abschnitt 4.3.2 beschriebenen Herstellung der Tumormodelle erfolgte die Inkubation bei statischer Kultivierung im Brutschrank für 14 Tage. Dabei wurde im Abstand von zwei bis drei Tagen das Medium innerhalb und außerhalb der Zellkrone vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und durch 2,5 ml frisches zellspezifisches Medium ersetzt. Dabei war stets darauf zu achten, dass sich nach dem Medienwechsel keine Luftblasen unterhalb der Matrix befanden. Gegebenenfalls mussten diese durch vorsichtiges Kippen der Platte in verschiedene Richtungen entfernt werden.

4.3.4 Dynamische Kultivierung

Zur besseren Abbildung der physiologischen Bedingungen, konnten die Tumormodelle zusätzlich im dynamischen System in einem Flussreaktor kultiviert werden, dessen Aufbau in Abbildung 6 dargestellt ist. Im Anschluss an die dreitägige statische Kultur im Brutschrank, wurden die Tumormodelle unter sterilen Bedingungen in den zuvor autoklavierten Bioreaktor eingebracht. Nach dem Anschließen des Schlauchsystems und dem Befüllen mit zellspezifischem Medium, versetzt mit 1 % Pen/Strep, inkubierten die Modelle für weitere 14 Tage im dynamischen System bei 3 rpm (ca. 3 ml/min) im Inkubator bei 37 °C. Nach einer Woche erfolgte ein Medienwechsel.

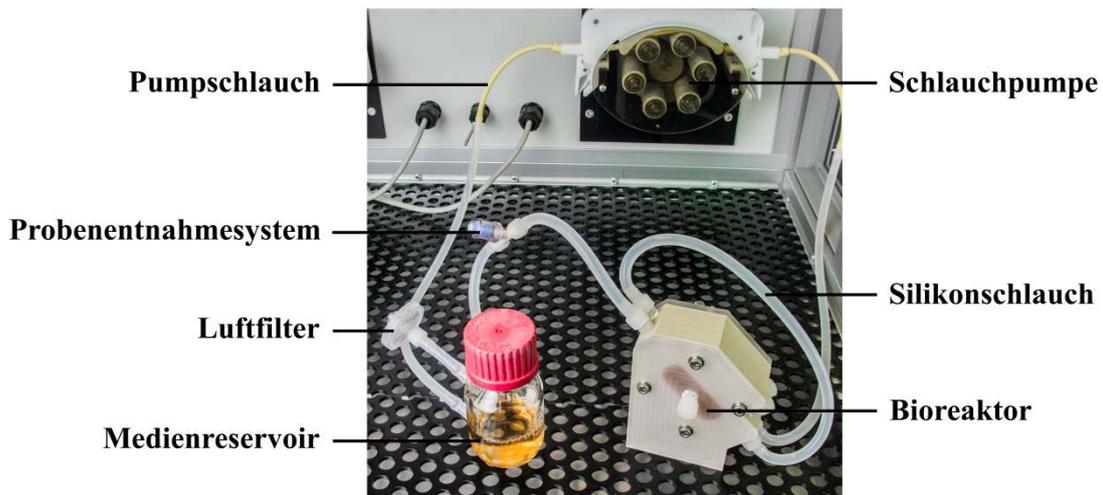


Abbildung 6: Flussreaktoraufbau für die dynamische 3D Kultur

Die in den Bioreaktor eingebrachten Tumormodelle wurden über das Schlauchsystem mit Medium aus dem Medienreservoir versorgt. Dabei konnte die Fließgeschwindigkeit über eine Schlauchpumpe geregelt werden. Das Probenentnahmesystem erlaubte es, während der Kultur Medium aus dem System zu entnehmen, ohne den Bioreaktor aus dem Inkubator entfernen zu müssen.

4.3.5 Stimulation mit TGF- β 1

In weiteren Versuchen sollte der Einfluss von TGF- β 1 auf eine EMT und Invasion untersucht werden. Dafür erfolgte die Herstellung und Kultivierung der Modelle zunächst wie in Abschnitt 4.3.2 bis 4.3.4 beschrieben. Unter statischen Bedingungen wurden nach einer dreitägigen Anwuchsphase der Zellen 2 ng/ml TGF- β 1 in das Kulturmedium zugegeben, im dynamischen Modell beim Überführen der Matrix in den Bioreaktor. Bei jedem Medienwechsel wurde frisches TGF- β 1 zugesetzt.

4.3.6 Behandlung mit zielgerichteten Inhibitoren

Für die Validierung des Tumormodells anhand bekannter zielgerichteter Therapien, erfolgte in den letzten drei Tagen der 14-tägigen Kultur die Behandlung mit 1 μ M Gefitinib oder 0,25 μ M 17-AAG nach einem standardisierten Schema (Abbildung 7). Unmittelbar vor Beginn und während der Behandlungsphase wurden 100 μ l Probe aus dem Überstand für die Bestimmung der Apoptose im M30 Cytodeath™ ELISA genommen und bis zur Messung bei -80 °C gelagert. Das Gewebe konnte an Tag 14 entweder fi-

xiert und in Paraffin eingebettet werden oder es erfolgte die Lyse der Zellen mit anschließender Untersuchung der Signaltransduktion.

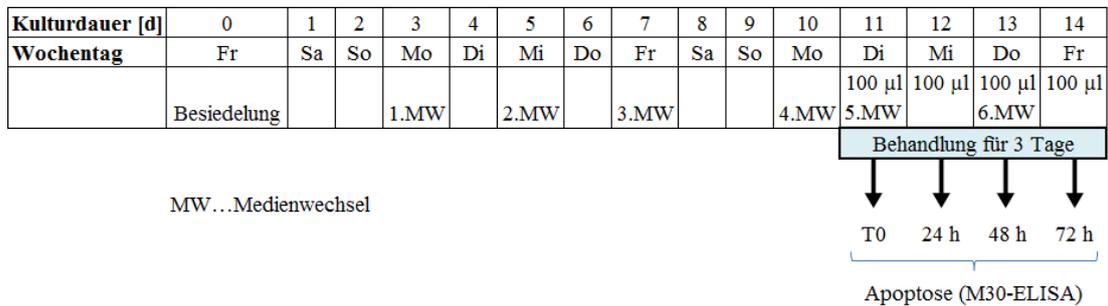


Abbildung 7: Schema für die Behandlung des 3D Tumormodells

In den letzten drei Tagen der 14-tägigen Kultur wurden die Tumormodelle mit Gefitinib oder 17-AAG behandelt. Während der Behandlungsphase erfolgte die Probenahme für die Bestimmung der Apoptose im M30 Cytodeath™ ELISA.

4.3.7 Behandlung mit ROR1-spezifischen CAR T-Zellen

Statische und dynamische Tumormodelle, bestehend aus A549-Tumorzellen wurden mit *Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1* (ROR1)-spezifischen CAR CD8⁺ oder einer Kombination aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen behandelt. Diese wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. Michael Hudecek (Medizinische Klinik und Polyklinik II, Universitätsklinikum Würzburg) generiert und zur Verfügung gestellt. Dazu mussten aufgereinigte CD8⁺, CD45RO⁺, CD62⁺ Gedächtnis- und CD4⁺ Zellen, die aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) gesunder Spender isoliert wurden, mit anti-CD3/CD28 *Beads* aktiviert werden. Nach einem Tag erfolgte die lentivirale Transduktion mit einem CAR-Konstrukt, das basierend auf dem monoklonalen Antikörper R12 mit einem T2A-Element und verkürztem EGFR (EGFRt) ausgestattet war. Zehn bis 14 Tage nach der Transduktion konnten die EGFRt-positiven Zellen angereichert und für die Anwendung im 3D Tumormodell expandiert werden. Im statischen Modell erfolgte die Therapie mit unterschiedlichen Konzentrationen an ROR1-spezifischen CAR CD8⁺ T-Zellen ab Tag 11 für 72 h. Proben zur Apoptosemessung wurden vor Zugabe der T-Zellen sowie 6, 24, 48 und 72 h nach Zugabe der T-Zellen aus dem Überstand entnommen.

Dynamische Tumormodelle wurden zunächst 14 Tage im Bioreaktor kultiviert und anschließend für fünf Tage mit jeweils $5 \cdot 10^5$ CD8⁺ und CD4⁺ ROR1-CAR spezifischen

T-Zellen behandelt. Dabei erfolgte die Zugabe der T-Zellen in das Medienreservoir (Abbildung 6). Durch kontinuierliches Rühren mittels eines Magnetrührstäbchens im Medienreservoir und eines kleinen Magnetrührers unterhalb wurde sichergestellt, dass die T-Zellen in das Schlauchsystem gelangten und nicht auf den Boden der Glasflasche absanken. Über das Probenentnahmesystem des Bioreaktors konnten unmittelbar vor und während der Behandlung im Abstand von 24 h Proben aus dem Überstand zur Bestimmung der Apoptose und Zytokinausschüttung genommen werden.

Jeweils am letzten Tag der statischen und dynamischen Kultur wurde der komplette restliche Überstand abgenommen und die T-Zellen durch die AG Hudecek mittels Durchflusszytometrie auf ihre Aktivierung untersucht. Das Gewebe wurde fixiert, in Paraffin eingebettet und anschließend histologisch und immunfluoreszenz gefärbt.

Zum Vergleich dienten in allen Ansätzen untransduzierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.

4.4 Etablierung von Gefitinib-resistenten Subpopulationen

Die Etablierung Gefitinib-resistenter Subpopulationen erfolgte auf der Basis der Gefitinib-sensitiven Zelllinie HCC827. Dazu wurde die ursprüngliche Zelllinie bis zu einer Konfluenz von 70 % kultiviert und im Anschluss mit 1 μ M Gefitinib behandelt. Medienwechsel erfolgten im Abstand von zwei bis drei Tagen, wobei die Behandlung mit 1 μ M Gefitinib dauerhaft fortgesetzt wurde. Bei einer Konfluenz von 80 bis 90 % konnten die Zellen passagiert und mittels CellTiter-Glo[®] auf ihre Resistenz gegenüber Gefitinib getestet werden (Abschnitt 4.5.1).

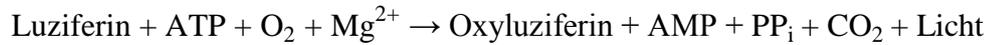
4.5 Zellvitalitätsassays

4.5.1 CellTiter-Glo[®] Assay

Der CellTiter-Glo[®] Zellvitalitätsassay beruht auf der Umsetzung von Luziferin zu Oxyluziferin durch eine Ultra-Glo[™] rekombinante Luziferase (siehe Formel 3). Das CellTiter-Glo[®] Reagenz führt zur Lyse der Zellen, Freisetzung des in den Zellen enthaltenen ATP und durch die stattfindende Reaktion zu einem Lichtsignal. Dieses ist pro-

portional zu der Menge an umgesetztem Luziferin, der benötigten Menge ATP und damit auch zur Anzahl an vitalen Zellen in der Kultur.

Formel 3:



Enzym: Ultra-Glo™ rekombinante Luziferase

Der CellTiter-Glo® Vitalitätsassay diente zur Testung auf Resistenz der HCC827-Subpopulationen sowie zur Ermittlung der Vitalität nach Behandlung der Tumorzelllinien mit 17-AAG in 2D. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben, die Kultur und Behandlung wie in Abschnitt 4.2 und 4.4 beschrieben. Am Tag der Messung wurde das CellTiter-Glo® Substrat in 10 ml CellTiter-Glo® Puffer resuspendiert. Nach dem Waschen der Zellen mit 200 µl PBS⁺, mussten 100 µl zellspezifisches Medium und dann 100 µl vorbereitetes CellTiter-Glo® Reagenz auf die Zellen gegeben werden. Die Platte wurde anschließend in den Tecan Infinite M200 Plattenleser überführt und das in Tabelle 17 dargestellte Messprogramm gestartet.

Tabelle 17: Messprogramm für den CellTiter-Glo® Assay

Prozess/Einstellung	Parameter
Platte	Greiner 96 Flat Bottom White Polystyrene [GRE96fw_µClear_TC.pdfx]
Schütteln	Zeit: 120 s, Amplitude: 3,5 mm
Inkubation	Zeit: 10 min
Lumineszenzmessung	Modus: Lumineszenz Abschwächung: keine Integrationszeit: 1.000 ms

4.5.2 CellTiter-Glo® 3D Assay

Das Prinzip des CellTiter-Glo® 3D Vitalitätsassays ist vergleichbar mit dem des CellTiter-Glo®, jedoch besitzt das für 3D Sphäroidkulturen angepasste Reagenz eine höhere lytische Aktivität. Zusätzlich wird das Reagenz, das im Vergleich zum CellTiter-Glo® nicht vorbereitet, sondern nur auf Rt erwärmt werden muss, 30 min mit den Kulturen inkubiert.

Tabelle 18: Messprogramm für den CellTiter-Glo® 3D Assay

Prozess/Einstellung	Parameter
Platte	TPP 12 Flat Bottom Transparent TPP 12 Flat Transparent [TPP12ft.pdfx]
Schütteln	-
Inkubation	-
Lumineszenzmessung	Modus: Lumineszenz Abschwächung: OD1 Integrationszeit: 300 ms

Da der Assay für 96-Well Platten optimiert ist, musste das Protokoll auf das 12-Well Format in den Zellkronen angepasst werden. Dafür wurde am letzten Tag der Kultur das Medium der Zellkronen abgesaugt und diese mit einer Pinzette in eine neue 12-Well Platte überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1,3 ml Medium ohne Reagenz zwischen die Zellkrone und den Rand des Wells. Innen wurden 300 µl Medium und 300 µl Reagenz zugegeben, bevor die Platte für 45 min auf einem Schüttler bei Rt inkubierte. Die Messung im Tecan Infinite M200 Plattenleser erfolgte mit den in Tabelle 18 dargestellten Einstellungen.

4.5.3 RealTime-Glo™ MT Assay

Der RealTime-Glo™ ermöglicht im Gegensatz zum CellTiter-Glo® 3D die Bestimmung der Vitalität in Echtzeit, da die Zellen vor der Luziferase-Reaktion nicht lysiert werden müssen. Stattdessen beinhaltet der Assay die Zugabe einer NanoLuc®-Luziferase und eines Pro-Substrates, welches in die Zellen permeieren kann. Vitale Zellen reduzieren das Pro-Substrat und generieren dadurch ein Substrat für die NanoLuc®-Luziferase, das wieder in das Medium diffundiert und dort umgesetzt wird. Dabei entsteht ein zur Zellzahl proportionales Lumineszenzsignal.

Da auch der RealTime-Glo™ für das 96-Well Format und Sphäroidkulturen optimiert ist, musste auch dieser Assay an die Messung der Vitalität in den 3D Tumormodellen angepasst werden. Dafür erfolgte am Tag des Behandlungsbeginns die Zugabe von je 1 µl Substrat und 1 µl Enzym zu dem 1 ml Medium im Inneren der Zellkrone. Außerhalb der Zellkrone wurde kein Substrat oder Enzym zugegeben. Nach 1 h Inkubation

konnte der T0-Wert am Tecan Infinite M200 Plattenleser mit den in Tabelle 18 gezeigten Parametern, jedoch ohne Abschwächung, gemessen werden. Um zu testen, ob im RealTime-Glo™ Behandlungserfolge sichtbar waren, erfolgte die Behandlung mit dem HSP90-Inhibitor durch Zugabe von 0,25 µM 17-AAG in das Medium der Zellkronen. Die Lumineszenz wurde anschließend im Stundentakt gemessen.

4.6 Apoptosemessung

Die Apoptose in 2D und 3D Proben wurde mit Hilfe des M30 CytoDeath™ *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) gemessen. Die enthaltene 96-Well Platte ist mit dem sogenannten M6 Antikörper beschichtet, welcher epithelzellspezifisches Zytokeratin 18 in den Zellkulturüberständen bindet. Ein zweiter Antikörper erkennt das bei der Caspase-abhängigen Spaltung von Zytokeratin 18 entstehende Neoepitop K18Asp396, das sogenannte M30. Da an den sekundären Antikörper eine Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist, kann das Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in ein blaues Produkt umgesetzt werden. Über eine pH-Änderung durch Zugabe von Schwefelsäure entsteht aus dem blauen ein gelbes Produkt, dessen Absorption im Anschluss gemessen wird.

Die Durchführung des M30 CytoDeath™ ELISA erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zunächst wurden die aus den Überständen genommenen Proben aufgetaut und wenn notwendig, in zellspezifischem Medium verdünnt. Je 25 µl der Standardlösungen und der verdünnten Proben wurden im Duplikat in die 96-Well Platte pipettiert. Anschließend mussten 75 µl des HRP-gekoppelten M30-Antikörper zugegeben werden. Die Platte inkubierte 4 h bei Rt auf einem Orbitalschüttler, bevor jedes Well fünfmal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen wurde, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend erfolgten die Zugabe von 200 µl TMB und die Inkubation der Platte für 20 min bei Rt im Dunkeln. Schließlich wurde die Enzymreaktion durch 50 µl Stopplösung (1 M Schwefelsäure) abgestoppt und die Absorption am Tecan Infinite M200 mit den in Tabelle 19 gezeigten Parametern gemessen.

Zur Analyse der Daten wurde zunächst eine sigmoidale Standardkurve in OriginPro 8.6 erstellt. Die Konzentrationen an M30 konnten anschließend über die Standardkurve bestimmt werden. Die Berechnung des Apoptoseanstiegs erfolgte, indem zunächst die

Apoptosewerte während der Behandlung auf den T0-Wert vor der Behandlung normalisiert und dieser Wert anschließend auf die unbehandelte Kontrolle bezogen wurde.

Tabelle 19: Messprogramm für den M30 CytoDeath™ ELISA

Prozess/Einstellung	Parameter
Platte	Costar 96 Flat Bottom Transparent Polystyrene [COS96ft.pdfx]
Schütteln	Zeit: 10 s, Amplitude: 3,5 mm
Inkubation	5 min
Lumineszenzmessung	Modus: Absorption Wellenlänge: 450 nm Bandbreite: 9 nm Anzahl der Blitze: 10

4.7 Histologische und immunhistologische Charakterisierung

4.7.1 Fixieren von Zellen und Gewebe

Die in 2D auf Glasplättchen kultivierten Zellen wurden mit vorgewärmten PBS⁺ gewaschen und anschließend für 10 min in 4 % phosphatgepufferter Formaldehydlösung (PFA, Roti[®]-Histofix, pH 7,0) fixiert, bevor sie bis zum Färben in PBS⁺ bei 4 °C gelagert werden konnten.

Die Fixierung der 3D Tumormodelle erfolgte ebenfalls nach einem PBS⁺-Waschschritt in 4 % PFA für 2 h bei Rt. Dabei wurde die gesamte Zellkrone mit PFA bedeckt und die Matrix erst nach der Inkubationszeit aus der Krone entfernt. Nach dem Abschneiden der zellfreien Ränder mit einem Skalpell, wurde das Modell in eine mit Filterpapier ausgelegte Einbettkassette überführt und zunächst in vollentsalztem (VE) Wasser inkubiert.

Tumorbiopsate wurden mindestens 4 h in 4 % PFA fixiert und anschließend in Einbettkassetten überführt.

4.7.2 Paraffineinbettung und Anfertigung von Paraffinschnitten

Die Paraffineinbettung erfolgte automatisch mit Hilfe des Einbettautomaten Microm STP120. Die vorbereiteten Einbettkassetten mussten dafür in den VE Wasserbehälter des Automaten überführt und das in Tabelle 20 dargestellte Programm gestartet werden.

Tabelle 20: Programm zur Paraffineinbettung

Schritt	Lösung	Zeit [h]
Auswaschen der Fixierlösung	VE Wasser	1
Aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung	Ethanol 50 %	1
	Ethanol 70 %	1
	Ethanol 80 %	1
	Ethanol 96 %	1
	Isopropanol I	1
	Isopropanol II	1
Entfernen des Alkohols	Isopropanol/Xylol 1:2	1
	Xylol I	1
	Xylol II	1
Paraffinieren	Paraffin I	1,5
	Paraffin II	1,5

Im Anschluss an das Programm, konnten die Proben aus dem Einbettautomaten entnommen und an der Paraffineinbettstation EG1150H zunächst in zwei bis drei Streifen geschnitten werden. Nach Befüllen einer Edelstahl-Ausgießform mit flüssigem Paraffin, wurden die Streifen in diese überführt. Dabei war darauf zu achten, dass die Schnittflächen nach unten zeigten und die Streifen parallel angeordnet waren. Nachdem die Paraffinblöcke abgekühlt waren, konnten am Schlittenmikrotom 3 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Poly-L-Lysin beschichtete (für Immunfluoreszenzfärbungen) oder unbeschichtete Objektträger (für H&E-Färbung) aufgezogen werden. Die Schnitte trockneten anschließend bei 37 °C über Nacht.

4.7.3 Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte

Unmittelbar vor Beginn der histologischen Färbungen, mussten alle Paraffinschnitte entparaffiniert und rehydriert werden. Dafür wurden die Schnitte zunächst für 1 h bei

60 °C inkubiert und nachdem das Paraffin geschmolzen war, wie in Tabelle 21 dargestellt weiter behandelt.

Tabelle 21: Entparaffinieren und Rehydrieren von Gewebeschnitten

Schritt	Lösung	Zeit/Bedingungen
Entparaffinieren	Xylol I	10 min
	Xylol II	10 min
Rehydrieren	Ethanol 96 %	Zwei- bis dreimal eintauchen
	Ethanol 96 %	Zwei- bis dreimal eintauchen
	Ethanol 70 %	Zwei- bis dreimal eintauchen
	Ethanol 50 %	Zwei- bis dreimal eintauchen
	VE Wasser	Schwenken, bis keine Schlieren mehr zu sehen sind

4.7.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Tabelle 22: Protokoll zur H&E-Färbung

Schritt	Lösung	Zeit/Bedingungen
Anfärben von basophilen Strukturen (Zellkern)	Hämatoxylin	6 min
Spülen	VE Wasser	Schwach fließend, bis keine Farbe mehr auswäscht
Differenzierung der Hämatoxylin Färbung (optional)	HCl/Ethanol VE Wasser	Zweimal eintauchen Schwenken, bis keine Schlieren mehr zu sehen sind
Bläuen	Leitungswasser	5 min
Anfärben von Zytoplasma und ECM	Eosin	1 min
Spülen	VE Wasser	Schwach fließend, bis keine Farbe mehr auswäscht
Aufsteigende Reihe zum Entwässern	Ethanol 70 %	Zweimal eintauchen
	Ethanol 96 %	2 min
	Isopropanol I	5 min
	Isopropanol II	5 min
Entfernen des Alkohols	Xylol I	5 min
	Xylol II	5 min

Die Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung diente als Übersichtsfärbung der 3D Tumormodelle. Dabei färbte Hämatoxylin anionische Strukturen wie die Zellkerne blau und Eosin kationische Strukturen, z.B. das Zytoplasma sowie die ECM rot. Nach dem Entparaffinieren und Rehydrieren (Abschnitt 4.7.3) wurde die H&E-Färbung nach dem Protokoll in Tabelle 22 durchgeführt und die Schnitte anschließend mit Entellan eingedeckt.

4.7.5 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung mussten die Schnitte wie in Abschnitt 4.7.3 beschrieben entparaffiniert und dehydriert werden. Anschließend erfolgte eine hitzeinduzierte Antigenmaskierung durch Kochen der Schnitte in Citratpuffer pH 6,0 für 20 min. Danach wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet und von VE Wasser in Waschpuffer (PBS-T) überführt.

Zellen auf Glasplättchen mussten zur Detektion intrazellulärer Antigene vor der Immunfluoreszenzfärbung für 5 min mit 0,2 % Triton-X100 behandelt werden, um die Zellen permeabel zu machen. Anschließend wurden die Glasplättchen für 5 min mit PBS-T gewaschen.

Das Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung ist in Tabelle 23 gezeigt.

Tabelle 23: Protokoll zur Immunfluoreszenzfärbung

Schritt	Reagenz/Lösung	Zeit/Bedingungen
Blocken	Blockierlösung	20 min
Primärantikörper	Verdünnung in Antikörperverdünnungslösung entsprechend Tabelle 5	Über Nacht bei 4 °C
Waschen	PBS-T	Dreimal 5 min
Sekundärantikörper	Verdünnung in Antikörperverdünnungslösung entsprechend Tabelle 5	60 min bei Rt
Waschen	PBS-T	Dreimal 5 min
Eindecken	DAPI Fluoromount-G™ oder Mowiol/DAPI	

Die Inkubation des Sekundärantikörpers sowie alle nachfolgenden Schritte wurden lichtgeschützt durchgeführt. Für Doppelfärbungen stammten die primären Antikörper stets aus verschiedenen Spezies. Zusätzlich mussten von jeder Probe Negativkontrollen mitgeführt werden, um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers auszuschließen. Dafür wurde der primäre Antikörper durch Antikörperverdünnungslösung ersetzt.

4.8 Bestimmung der Proliferationsrate

Zur Beurteilung der Wirksamkeit eines Medikamentes wurde neben der Apoptoserate auch die Proliferationsrate der Tumorzellen bestimmt. Dafür erfolgte die Durchführung einer Immunfluoreszenzfärbung gegen Ki67 und anschließend die Aufnahme von jeweils fünf Bildern jeder 2D Probe, sechs Bildern jedes Biopsats, Xenografts und jeder 3D dynamischer Probe sowie zehn Bildern jeder 3D statischen Probe. Dabei war darauf zu achten, dass sich die Bildausschnitte nicht überlappten. Tumorbiopsate sowie Xenografts wurden analog zu einer Publikation von Dauphin und Kollegen zusätzlich gegen Pan-Zytokeratin (PCK) gefärbt, um Tumorzellen vom Stroma unterscheiden zu können (Dauphin *et al.*, 2013). Die Auszählung der Proben erfolgte wie in Tabelle 24 dargestellt entweder automatisch oder per Hand. Die jeweils verwendeten Makros zur automatischen Auszählung sind im Anhang gezeigt.

Tabelle 24: Bestimmung der Proliferationsrate

Probe	DAPI-positive Zellen	Ki67-positive Zellen
2D Glasplättchen	Automatisch	Manuelles Zählen der Ki67-negativen und Berechnung der Ki67-positiven Zellen
3D statisch	Manuell	Manuell
3D dynamisch	Automatisch	Automatisch
Tumorbiopsat	Automatisch	Automatisch

Die Berechnung der Proliferationsrate erfolgte nach Formel 4.

Formel 4:

$$\text{Proliferationsrate} = \frac{\text{Ki67-positive Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \cdot 100 \%$$

4.9 Quantifizierung der in die Matrix eingewanderten Zellen

Die Quantifizierung der in die Matrix eingewanderten Tumorzellen erfolgte mit Hilfe einer Kol IV-Färbung. Diese färbte Basalmembranstrukturen und ermöglichte die Unterscheidung von Zellen, die diese Membran überquert hatten, von Zellen, die sich in den erhaltenen Kryptenstrukturen befanden. Der Einfachheit halber werden die eingewanderten Zellen im Folgenden als invasiv bezeichnet, auch wenn der genaue Mechanismus der Einwanderung in dieser Arbeit nicht geklärt wurde. Die Gesamtzahl der Zellen (DAPI-positiv) wurde wie in Tabelle 24 dargestellt bestimmt. Die Zählung der eingewanderten Zellen erfolgte hingegen manuell. Der Anteil an invasiven Zellen konnte nach Formel 5 berechnet werden.

Formel 5:

$$\text{Anteil invasiver Zellen} = \frac{\text{gezählte Zellen in der Matrix}}{\text{Gesamtzellzahl}} \cdot 100 \%$$

4.10 Ultrastrukturelle Analyse

Für die Untersuchung des Wachstums der resistenten HCC im Vergleich zur HCC827-Zelllinie wurden in der Abteilung für Elektronenmikroskopie im Biozentrum der Universität Würzburg unter der Leitung von Prof. Dr. Krohne Raster- (REM) und Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen angefertigt. Dafür mussten die in 3D kultivierten Zellen in vorgewärmten PBS⁺ gewaschen und die zellfreien Ränder der Matrix anschließend abgeschnitten werden. Die Fixierung erfolgte entweder mit 6,25 % (REM) oder 2,5 % (TEM) Glutaraldehydlösung über Nacht bei 4 °C. Die weitere Probenaufarbeitung wurde in der Abteilung für Elektronenmikroskopie durchgeführt und ist jeweils im Anhang dargestellt (Tabelle S 1, Tabelle S 2, Tabelle S 3).

4.11 Proteinanalyse

4.11.1 Herstellung von Tumorzelllysaten

Für die im Folgenden beschriebenen Analysen der Signaltransduktion mittels Western Blot, Phospho-Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) bzw. Phospho-Kinase (PK) Array mussten die in 2D und 3D kultivierten Zellen lysiert werden. Um dabei die Aktivität von Proteinasen und Phosphatasen minimal zu halten, wurden nur eiskalte Lösungen verwendet und alle Schritte der Zelllyse auf Eis durchgeführt. Zellen in 2D Kultur wurden vor der Zugabe von 800 µl Lysepuffer zweimal mit 5 ml PBS⁺ gewaschen. Für die Lyse der 3D kultivierten Zellen mussten die Modelle nach dem zweimaligen Waschen mit PBS⁺ aus den Zellkronen entnommen und die zellfreien Ränder abgeschnitten werden. Danach konnten sie in jeweils 500 µl Lysepuffer, die in einer 12-Well Platte vorgelegt worden waren, überführt werden. Die Lyseproben inkubierten anschließend für 30 min bei 4 °C auf einem Wippschüttler. Die Zellrümpfer der 2D Kulturen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert, während die 3D Proben zusätzlich mit einem Zellschaber bearbeitet werden mussten. Die Suspensionen konnten anschließend in Reaktionsgefäße überführt und für 20 min bei 14.000 x g und 4 °C zentrifugiert werden. Nach Überführen des Überstandes in neue Reaktionsgefäße, lagerten die Proben bis zur Proteinkonzentrationsbestimmung bei -80 °C.

4.11.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem *DC Protein Assay Kit*, basierend auf Lowry (Lowry *et al.*, 1951), mussten die Proben auf Eis aufgetaut und anschließend 1:2 oder 1:3 verdünnt werden. Als Standardlösung diente BSA, welches in Reinstwasser auf 50 bis 1.000 µg/ml verdünnt wurde. Anschließend konnten 5 µl der jeweiligen Standardlösungen und der Probenverdünnungen in Duplikaten in eine 96-Well Platte pipettiert und mit 25 µl einer frisch angesetzten alkalischen Kupferlösung gemischt werden. Nach weiterer Zugabe von 200 µl Folinlösung inkubierte die Platte für 15 min bei Rt im Dunkeln. Während dieser Zeit reduzierte Folin das an die Proteine gebundene Kupfer, wobei ein blauer Farbumschlag zu sehen war (Lowry *et al.*, 1951). Dieser Umschlag konnte anschließend photometrisch am Tecan Infinite M200 Plattenleser bei 750 nm

(Bandbreite: 9 nm, Anzahl der Blitze: 25) gemessen werden. Die Berechnung der Proteinkonzentration in der Probe erfolgte über das Erstellen einer Standardkurve in MS Excel. Von der Proteinkonzentration in den Proben wurde in 2D die Proteinkonzentration des Lysepuffers und in 3D die Proteinkonzentration einer Leermatrix abgezogen.

4.11.3 Proteinfällung

Die Aufkonzentrierung der Proteinlösungen erfolgte über eine Fällung mittels eines definierten Methanol-Chloroform-Wasser-Gemisches (Wessel und Flugge, 1984). Dafür wurden nach der Proteinkonzentrationsbestimmung die gewünschten Mengen, z.B. 30 µg, an Proteinen abgenommen und mit Wasser auf ein gleiches Volumen gebracht. Hierbei war zu beachten, dass in ein 2 ml Reaktionsgefäß maximal 200 µl Lysat gegeben werden konnten. Zu 200 µl Lysat wurde das 4-fache Volumen (800 µl) Methanol pipettiert und sorgfältig gemischt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des gleichen Volumens (200 µl) Chloroform und erneutes Mischen. Nachdem das 3-fache Volumen an VE Wasser (600 µl) zugegeben und die Proben wiederum gemischt wurden, zentrifugierten sie 5 min bei 14.000 rpm. Die gefällten Proteine befanden sich nun an der Phasengrenze und erlaubten somit die vorsichtige Abnahme der wässrigen Phase mit einer Pipette. Anschließend wurde erneut das 4-fache Volumen Methanol zugegeben und nach Mischen der Proben, zentrifugierten diese für 10 min bei 14.000 rpm. Nach dem Abnehmen der Überstände trockneten die pelletierten Proteine im Inkubator bei 37 °C. Die gefällten Proteine wurden anschließend wie folgt resuspendiert: 30 µg Protein in 15 µl Wasser und 5 µl 5-fach Laemmli-Puffer. Nach dem Mischen, Denaturieren der Proteine bei 95 °C für 5 min und anschließendem abzentrifugieren, konnten die Proben bis zur Untersuchung im Western Blot bei -20 °C gelagert werden.

4.11.4 Phospho-Protein-Arrays

Die Phospho-Protein Arrays konnten ohne den Schritt der Aufkonzentrierung sofort nach der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Angaben des Herstellers durchgeführt werden.

4.11.4.1 Phospho-Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Array

Der *ProteomeProfiler™ Human Phospho-Receptor Tyrosine Kinase-Array* detektiert gleichzeitig 49 verschiedene phosphorylierte humane RTK. Somit konnte er zur Untersuchung der Änderungen in der Signaltransduktion nach Behandlungen genutzt werden. Zunächst wurden dafür die benötigten Membranen für 1 h in *Array Buffer 1* äquilibriert, bevor sie mit 100 bis 300 µg Proteinen (in *Array Buffer 1* verdünnt, Gesamtvolumen: 1,5 ml) über Nacht bei 4 °C auf dem Wippschüttler inkubierten. Während dieser Zeit konnten alle phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Proteine an die auf die Membran gespotteten Antikörper binden. Nach drei Waschschritten am nächsten Tag mit je 3 ml Waschpuffer fand für 2 h die Inkubation mit 2 ml verdünntem pan anti-phospho-Tyrosin Detektionsantikörper, der mit einer Meerrettichperoxidase konjugiert war, bei Rt statt. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Membranen erfolgte die Detektion der gebundenen Phospho-Proteine nach Zugabe des Chemilumineszenz-Reagenz am FluorChem™ Q Bildaufnahme Gerät mit einer Belichtungszeit von 3 min, 5 min und 10 min.

4.11.4.2 Phospho-Kinase-Array

Der *ProteomeProfiler™ Human Phospho-Kinase-Array* detektiert Phosphorylierungen von 43 verschiedenen Kinase Phosphorylierungsstellen sowie zwei zugehörige Proteine. Die Durchführung war zu der des Phospho-RTK-Array vergleichbar. Die Membranen, für jede Probe zwei: Teil A und Teil B, wurden zunächst für eine 1 h in *Array Buffer 1* äquilibriert und anschließend mit je 1 ml in *Array Buffer 1* verdünnter Probe mit 100 bis 300 µg Proteinen über Nacht bei 4 °C auf dem Wippschüttler inkubiert. Nach dreimal 10 min Waschen der Membranen, erfolgte die Inkubation mit den biotinylierten Detektionsantikörpern A für Membran Teil A und B für Membran Teil B für 2 h bei Rt. Anschließend wurden die Membranen erneut dreimal 10 min gewaschen und dann 30 min in einer Streptavidin-HRP-Lösung inkubiert. Die Membranen mussten im Anschluss noch dreimal 10 min gewaschen werden, bevor die Proteine durch Zugabe des Chemilumineszenz-Reagenz am FluorChem™ Q Bildaufnahme Gerät mit einer Belichtungszeit von 3 min, 5 min und 10 min detektiert werden konnten.

4.11.4.3 Semi-quantitative Auswertung der Array Signale

Die Intensität der Grauwerte wurde mit dem Programm Alpha View bestimmt und anschließend die jeweilige Differenz der Grauwerte der behandelten minus der unbehandelten Proben gebildet. Um die durch die Behandlung induzierten Änderungen im Anteil phosphorylierter Kinasen von Schwankungen des Arrays zu unterscheiden, wurde für jeden Array ein Cut-Off-Wert ermittelt: Die Intensität der Kontrollspots der unbehandelten Proben wurde jeweils von der Intensität der Kontrollspots der behandelten Proben abgezogen. Anschließend wurde daraus der Mittelwert gebildet und die Schwankung um diesen Mittelwert zu diesem dazu addiert, um den Cut-Off Wert zu erhalten. Diese Cut-Off-Werte dienten zur Orientierung, welche Änderungen in der Signaltransduktion besonders relevant zu sein schienen. Zusätzlich wurden Änderungen betrachtet, die in den Arrays optisch zu erkennen waren, die jedoch aufgrund stärkerer Schwankungen der Kontrollspots den Cut-Off-Wert nicht erreichten.

4.11.5 Western Blot

Für die Verifizierung der Ergebnisse der Phospho-Arrays, wurden Western Blots durchgeführt. Dazu erfolgte zunächst die Auftrennung der Proteine (27 µg/Tasche) durch Elektrophorese in einem 10 %igen SDS-Gel mit einer elektrischen Stromstärke von 25 A/Gel für 1 h. Anschließend wurden die Proteine im Semitrockenblotverfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, wobei die Stromstärke 50 mA/Gel und die Blotzeit 2 h betrug. Nach der Übertragung der Proteine mussten die Membranen in 5 % (w/v) Milchpulver geblockt werden, bevor sie mit den entsprechend verdünnten Primärantikörpern (Tabelle 5) in 50 ml Zentrifugenröhrchen über Nacht bei 4 °C auf einem Rollschüttler inkubierten. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal für 10 min in TBS-T gewaschen und in 10 ml Sekundärantikörperlösung für 1 h bei Rt auf einem Rollschüttler inkubiert. Anschließend erfolgten erneut drei Waschschrte von je 10 min in TBS-T, bevor die Membranen mit dem *WesternBright™ Quantum Chemiluminescence Substrate* für 1 min entwickelt werden konnten. Die Aufnahme der Bilder erfolgte am FluorChem Q Bildaufnahme Gerät, wobei die Belichtungszeit automatisch jeweils auf die stärkste Bandenintensität angepasst wurde.

Die Semi-quantitative Auswertung erfolgte mit dem Programm Alpha View bzw. anschließend mit Excel. Nachdem die Intensität der Grauwerte für alle Banden bestimmt

und der jeweilige Hintergrund abgezogen worden war, erfolgte die Normalisierung auf die entsprechende β -Aktin oder α -Tubulin Bande derselben Spur.

4.12 Genexpressionsanalyse

4.12.1 Expression der miRNA-21

4.12.1.1 miRNA-Isolation

Die miRNA-Isolation der Gefitinib-resistenten und -sensitiven Zellen erfolgte mit Hilfe des *TaqMan[®] miRNA ABC Purification Kit* nach Angaben des Herstellers. Zunächst mussten dafür die Zellen aus der Kulturflasche abgelöst, gezählt und auf $1 \cdot 10^6$ Zellen in 50 μ l PBS eingestellt werden. Zu den Zellsuspensionen wurden 150 μ l des im Kit enthaltenen Lysepuffers gegeben, bevor sie 30 s gevortext, kurz zentrifugiert und anschließend auf Eis gelagert wurden. In der Zwischenzeit erfolgte die Vorbereitung der *Human Panel B Beads*, die 377 verschiedene miRNA-Moleküle inklusive Kontroll-miRNAs binden können. Dazu wurden zunächst 80 μ l der vorher gut gemischten, kurz zentrifugierten Beads in jeweils ein Reaktionsgefäß überführt und diese in einen Magnetständer zum Abnehmen der Überstände gestellt. Nachdem die Lysate zu den *Beads* pipettiert, die Lösungen gemischt und kurz zentrifugiert worden waren, inkubierten die *Bead/Lysat*-Gemische für 40 min im ThermoMixer[®] Heizblock bei 30 °C und 1.200 rpm. Anschließend erfolgten mehrere Waschschriffe, wobei die Reaktionsgefäße jedes Mal in den Magnetständer gestellt, nach 1 min Ruhezeit die Überstände abgenommen und die Beads mit der gebundenen miRNA wieder resuspendiert wurden. Nach dem letzten Waschschriff erfolgte die Elution der miRNA mit 50 μ l Elutions-Puffer und 3 min Inkubation bei 70 °C im Heizblock bei 1.200 rpm. Nach erneuter Ruhezeit im Magnetständer, konnten die Überstände in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C zwischengelagert werden.

4.12.1.2 RT und qRT-PCR zur miRNA-Quantifizierung

Die Durchführung der Reversen Transkription (RT) sowie die qRT-PCR zur Analyse der isolierten miRNA erfolgte mit Hilfe des *TaqMan[®] MicroRNA Assays* nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde bereits im ersten Schritt jeweils nur eine spezifische miRNA durch entsprechende RT-Primer (*stem loop Primer*) umgeschrieben, weshalb

von jeder Probe drei verschiedene Ansätze in der RT pipettiert werden mussten: für die miRNA-21 sowie die Kontroll-miRNAs RNU44 und U6. Für die RT wurden die in Tabelle 25 angegebenen Volumina pipettiert und nach kurzem zentrifugieren der Reaktionsgefäße das in Tabelle 26 gezeigte Programm im Thermocycler gestartet. Die Produkte konnten anschließend bei -20 °C bis zur Durchführung der qRT-PCR zwischengelagert werden.

Tabelle 25: Reaktionsansatz zum Umschreiben der miRNA

Reagenz	Volumen [μl]/Reaktion	
Mastermix	10-fach RT-Puffer	1,5
	100 mM dNTP-Mix	0,15
	MultiScribe™ RT, 50 U/ μ l	1
	RNase-Inhibitor, 20 U/ μ l	0,19
	Nuclease-freies Wasser	4,16
Anschließend zugeben	5-fach RT-Primer	3
	Isolierte miRNA	5

Tabelle 26: Thermocycler Einstellungen zum Umschreiben der miRNA

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Anlagerung der Primer	16	30
Elongation	42	30
Trennung der Doppelstränge	85	5
Lagerung des Produktes (optional)	4	∞

Tabelle 27: Einstellungen für die qRT-PCR zur miRNA Quantifizierung

Schritt	Temperatur [°C]	Laufzeit [min]
Konstant	95	10
40 Zyklen	95	0,25
	60	1
Konstant	4	∞

Für die qRT-PCR wurden pro Ansatz 17,67 μl Master-Mix bestehend aus 10 μl 2-fach *TaqMan[®] Universal Master Mix II* und 7,67 μl Nuklease-freies Wasser in eine 96-Well Platte vorgelegt und anschließend je 1 μl des jeweiligen 20-fach *TaqMan[®] MicroRNA Assays* sowie 1,33 μl der entsprechenden RT-Produkte zugegeben. Nach Überführen der Platte in den Cycler CFX96 wurde das in Tabelle 27 gezeigte Programm gestartet.

Die RT wurde in Duplikaten und die qRT-PCR in Triplikaten durchgeführt, sodass für die Berechnung der Mittelwert aus sechs CT-Werten gebildet werden konnte. Die weitere Quantifizierung erfolgte auf Basis der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode, wobei RNU44 und U6 als stabile Kontroll-miRNA verwendet wurden.

4.12.2 Genexpressionsanalyse

4.12.2.1 RNA-Isolation mit dem RNeasy[®] Mini Kit

Für die RNA-Isolation aus 2D Kulturen, wurden die Zellen in 60 mm Petrischalen kultiviert (Tabelle 16), anschließend mit eiskaltem PBS⁻ gewaschen und mit 600 μl RLT-Lysepuffer und 1 % β -Mercaptoethanol je Petrischale überschichtet. Nach dem gründlichen Abspülen der Zelltrümmer und Überführen in ein Reaktionsgefäß, lagerten diese zunächst auf Eis, bis alle Proben entsprechend vorbereitet waren. Die Lysate wurden anschließend in eine *QIAshredder* Säule pipettiert, durch Zentrifugation (2 min, maximale Geschwindigkeit) homogenisiert und dann bis zur RNA-Isolation in einem neuen Reaktionsgefäß bei -80 °C gelagert. Die RNA-Isolation erfolgte mit dem RNeasy[®] Mini Kit der Firma QIAGEN entsprechend der Herstellerangaben. Die Lysate wurden aufgetaut, 600 μl 70 %iger Ethanol zugegeben, die gesamte Probe auf eine RNeasy[®] Trennsäule mit Auffanggefäß pipettiert und anschließend zentrifugiert (15 s, 8.000 x g). Nach dem Verwerfen des Eluats, waren mehrere Waschschriffe entsprechend des Protokolls des Herstellers notwendig. Dabei diente ein 15 min Desoxyribonuklease (DNase)-Verdau bei Rt zum Entfernen von Verunreinigungen mit Desoxyribonukleinsäure (DNA). Nach dem letzten Waschschriff wurde die RNA mit 30 μl RNase-freiem Wasser und zentrifugieren (1 min, 8.000 x g) eluiert.

4.12.2.2 RNA-Isolation mit dem RNeasy® Micro Kit

Zur RNA-Isolation aus den 3D Tumormodellen, wurden diese zunächst zweimal mit eiskaltem PBS⁻ gewaschen, von zellfreien Rändern befreit und die besiedelte Matrix sofort auf Trockeneis eingefroren und bis zur RNA-Isolation bei -80 °C gelagert.

Die Isolation erfolgte anschließend mit dem RNeasy® Micro Kit der Firma QIAGEN nach Herstellerangaben. Dazu mussten die Modelle zunächst langsam auf Eis aufgetaut, mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und zusammen mit einer Stahlkugel und 350 µl RLT-Puffer, der 1 % β-Mercaptoethanol enthielt, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte mit einem *Tissue Lyser* für 3 min und 50 Hz, bevor die Proben 3 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugierten. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, mit 350 µl 70 %igem Ethanol gemischt und auf eine *RNeasy® MinElute®* Trennsäule pipettiert. Nach der Zentrifugation bei 8.000 x g für 15 s und Verwerfen des Eluats, war ein Waschschrift mit 350 µl RW1-Puffer nötig. Anschließend diente ein DNase-Verdau zum Entfernen von Verunreinigungen mit DNA. Dafür wurden 10 µl DNase I Stamm-lösung mit 70 µl RDD-Puffer gemischt, mittig auf die Säule gegeben und für 15 min bei Rt inkubiert. Bevor die RNA mit 20 µl RNase-freiem Wasser eluiert werden konnte, waren mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte nach Vorgaben des Herstellers notwendig (500 µl RPE-Puffer, 500 µl 80 % Ethanol, trocknen durch zentrifugieren bei max. Geschwindigkeit). Die RNA lagerte bis zur komplementären DNA (cDNA)-Synthese bei -80 °C.

4.12.2.3 cDNA-Synthese

Vor der cDNA-Synthese war die Bestimmung der RNA-Konzentration der Proben mit Hilfe des TECAN Infinite M200 und einer Nanodrop-Messplatte nötig. Dazu musste zunächst das sogenannte *Blanking* der benötigten Messpunkte auf der Platte mit je 2 µl Reinstwasser durchgeführt werden. Anschließend erfolgte die Messung der RNA-Proben bei 260 und 280 nm, um neben der Konzentration auch den Grad der Verunreinigung der Probe mit Proteinen und DNA beurteilen zu können.

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem iScript™ cDNA Synthese Kit. Hierzu musste die RNA so verdünnt werden, dass sich 1 µg RNA in 15 µl RNase-freiem Wasser befanden. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 4 µl 5-fach *iScript™ Reaction Mix* und 1 µl

iScript™ Reverse Transkriptase, um ein Endvolumen von 20 µl zu erhalten. Der Gesamtansatz wurde danach im Thermocycler wie in Tabelle 28 dargestellt behandelt. Als Negativkontrolle diente RNase-freies Wasser anstatt der RNA-Probe. Die cDNA wurde anschließend kurz zentrifugiert und bis zur qRT-PCR bei -20 °C gelagert.

Tabelle 28: Temperaturprotokoll der cDNA-Synthese im Thermocycler

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Anlagerung der Primer	25	5
Elongation der cDNA	42	30
Trennung der Doppelstränge	85	5
Lagerung der cDNA (optional)	4	∞

4.12.2.4 qRT-PCR zur mRNA-Quantifizierung

Die qRT-PCR diente der Vervielfältigung und fluoreszenzbasierten Quantifizierung der zu analysierenden Gensequenzen auf der cDNA. Dafür wurde je Probe der folgende Mastermix angesetzt und in einer 96-Well Platte vorgelegt: 10 µl SsoFast™ EvaGreen® Supermix, 2 µl Vorwärts-Primer (4 pg/µl), 2 µl Rückwärts-Primer (4 pg/µl), 4 µl DNase-freies Wasser. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 µl cDNA; welche so verdünnt war, dass sich im PCR-Ansatz jeweils 10 bis 17 ng befanden.

Tabelle 29: Temperaturprotokoll für die qRT-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Wiederholungen
Aktivierung der Polymerase	95	180	-
Aufspaltung der Doppelstränge	95	10	39-mal
Anlagerung der Primer	60	30	
Stabilisierung, Elongation, Fluoreszenzdetektion	72	30	
	95	10	-
Schmelzkurvenanalyse	65 bis 95 Temperaturerhöhung: 0,1 K/s		-

Als Negativkontrolle diente DNase-freies Wasser anstatt der cDNA. Zur Normalisierung der PCR-Ergebnisse wurden die *Housekeeping*-Gene Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Die Effizienzbestimmungen von allen Primern wurde über Verdünnungsreihen der qRT-PCR Produkte bestimmt. Die Messung erfolgte im Thermocycler CFX96 mit dem in Tabelle 29 dargestellten Temperaturverlaufsprotokoll.

4.13 DNA-Sequenzierung

Um bekannte Genmutationen in den Gefitinib-resistenten HCC untersuchen zu können, wurde DNA aus HCCres A2-, HCCres A3- sowie den HCC827-Zellen als Referenz isoliert und anschließend sequenziert.

Die Isolation erfolgte mit dem *DNeasy[®] Blood and Tissue Kit* nach dem Protokoll von QIAGEN. Zunächst mussten die Zellen wie in Abschnitt 4.1.4 und 4.1.5 abgelöst, gezählt und je $2 \cdot 10^6$ Zellen in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Nach erneuter Zentrifugation und dem Resuspendieren in 200 μ l PBS⁺, erfolgte die Zugabe von 20 μ l Proteinase K sowie 4 μ l RNase A (100 mg/ml). Im Anschluss an eine 2 min Inkubation bei Rt, folgte die Zugabe von 200 μ l AL-Puffer, eine Inkubation bei 56 °C im Heizblock für 10 min, sowie das gründliche Mischen mit 200 μ l 96 %igen Ethanol. Das Gemisch wurde anschließend auf eine *DNeasy[®] Mini Trennsäule*, die sich in einem 2 ml Auffanggefäß befand, pipettiert und für 1 min bei 6.000 x g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchflusses, folgte ein Waschschrift mit AW1-Puffer und 1 min zentrifugieren mit 6.000 x g sowie ein weiterer Waschschrift mit AW2-Puffer und 3 min zentrifugieren mit 20.000 x g, um die Membran der Säule zu trocknen. Anschließend wurde die DNA mit 100 μ l AE-Puffer und 1 min zentrifugieren mit 6.000 x g in ein frisches Reaktionsgefäß eluiert.

Um zu überprüfen, ob genug DNA für die Sequenzierung isoliert wurde, erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration mit Hilfe des TECAN Infinite M200 und einer Nanodrop-Messplatte. Für die DNA-Sequenzierung wurden jeweils 50 ng (5 ng/ μ l) genomische DNA (gDNA) eingesetzt.

Die Probenvorbereitung sowie die Durchführung der Sequenzierung erfolgte in der Arbeitsgruppe von Dr. Simone Rost in der Abteilung der Humangenetik, Universität

Würzburg. Dafür mussten mit dem *TruSight One Sequencing Cancer-Panel Kit* zunächst indizierte, *paired-end* Bibliotheken erstellt werden, in der die Nukleinsäurefragmente an beiden Enden mit Adaptermolekülen ausgestattet waren. Anschließend wurden diese Bibliotheken angereichert und schließlich am MiSeq-Sequenziergerät (Illumina®) sequenziert. Die notwendigen Schritte zur Probenvorbereitung sind als Übersicht in Tabelle S 4 dargestellt.

4.14 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung aller Versuche erfolgte mit Hilfe der OpenSource Software R 3.3.0. Zum Vergleich von allen Proben wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis Test verwendet und anschließend eine post-hoc Analyse mit dem Wilcoxon-Rangsummen-Test durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde $p < 0,05$ angenommen.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung des humanen 3D Lungentumor-Testsystems

5.1.1 Aufbau des 3D Tumortestsystems

Zur Darstellung von physiologischen Gewebebedingungen, erfolgte der Aufbau des im Folgenden vorgestellten humanen 3D Lungentumor-Testsystems auf einem biologischen Scaffold, der SISmuc. Diese aus *Small Intestinal Submucosa* (SIS) und *Mucosa* (Muc) bestehende Matrix wurde mit verschiedenen humanen Lungentumor-Zelllinien besiedelt. Dabei wuchsen die Tumorzellen zum Teil mehrschichtig auf der Matrix und besiedelten auch die erhaltenen Kryptenstrukturen wieder (Abbildung 8, A).

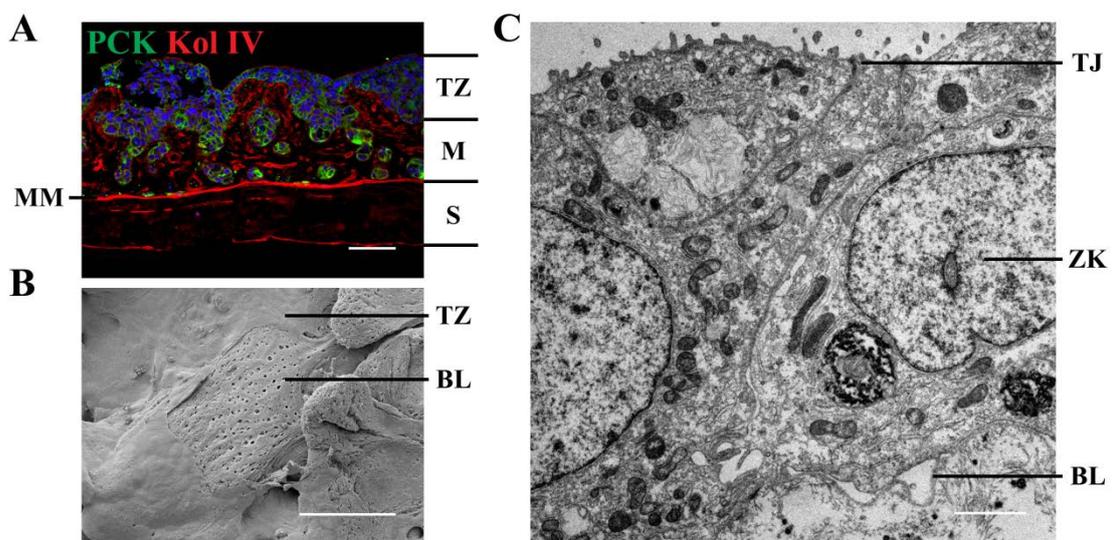


Abbildung 8: Epitheliales Wachstum der Tumorzellen auf der SISmuc

A) Pan-Zytokeratin (PCK)/Kollagen IV (Kol IV)-Färbung des 3D Tumortestsystems, das 14 Tage im Flussreaktor kultiviert wurde. Kol IV färbt Strukturen der Basalmembran der SISmuc, die aus der *Mucosa* (M) und der *Submucosa* (S) besteht. Dazwischen befindet sich die *Muscularis mucosae* (MM). Die Tumorzellen (TZ) wuchsen auf der *Submucosa* und in die erhaltenen Kryptenstrukturen ein. Maßstabsbalken: 100 μm . B) REM-Aufnahme des 3D Tumormodells. In Bereichen, an denen die Tumorzellen (TZ) weniger dicht wuchsen, wird die darunter liegende Basallamina (BL) sichtbar. Maßstabsbalken: 50 μm . C) TEM-Aufnahme des 3D Tumortestsystems. Die Tumorzellen hatten engen Kontakt zur Basallamina (BL) und bildeten Zell-Zellkontakte, wie z.B. *Tight junctions* (TJ) aus. ZK: Zellkern. Maßstabsbalken: 2 μm .

In REM- (Abbildung 8, B) und TEM-Aufnahmen (Abbildung 8, C) der SISmuc konnten Strukturen der Basalmembran nachgewiesen werden, die eine Barriere für die epithelial

wachsenden Tumorzellen darstellte. Die Überquerung dieser Barriere war nur durch zusätzliche Stimulation mit einem Wachstumsfaktor möglich (siehe Abschnitt 5.3.1). Die *Muscularis mucosae*, welche die *Mucosa* von der *Submucosa* trennt, bildete für alle verwendeten Zelllinien eine unüberwindbare Barriere, sodass in keinem Modell Zellen in der *Submucosa*-Schicht nachweisbar waren.

Für die Ermittlung der optimalen Kulturdauer der Tumormodelle, wurden die Zelllinien HCC827, A549 und H441 sowohl im statischen als auch im dynamischen System für sieben, elf und 14 Tage kultiviert. Dabei konnte beobachtet werden, dass sich die Morphologie zwischen Tag 7 und Tag 11 zum Teil noch stark änderte (Abbildung S 1). Bei weiterer Kultivierung bis Tag 14 konnten anhand der H&E-Färbung jedoch kaum noch morphologische Veränderungen festgestellt werden. Deshalb wurde das Behandlungsschema so angepasst, dass die Gesamtkulturdauer 14 Tage betrug und Behandlungen an Tag 11 gestartet wurden. Dieses Schema wurde in einer SOP (siehe Anhang) festgelegt.

5.1.2 Untersuchung von Markern der Tumorbiologie sowie der Proliferation in Patientenmaterial, Xenografts und 2D im Vergleich mit dem 3D Tumormodell

Markeranalyse von Adenokarzinomen aus Lungenkrebspatienten

Daten belegen, dass mit dem Fortschreiten der Krebserkrankung häufig ein mesenchymales Erscheinungsbild sowie der Verlust der Differenzierung und der Polarität der Tumorzellen einhergehen. Die Tumormodelle wurden daher hinsichtlich ihrer Morphologie (H&E-Färbung), ihres EMT-Status (PCK/Vim), ihrer Differenzierung (E-Cad/ β -Cat) und ihrer Polarität (Mucin-1, MUC-1) charakterisiert. Zur Vergleichbarkeit mit klinischem Patientenmaterial, wurden diese, oft in der Tumorbiologie analysierten Marker, zunächst in Patientenproben angefärbt.

Die untersuchten Tumore waren ausschließlich Adenokarzinome der Lunge, die unterschiedliche Subtypen aufwiesen. In Abbildung 9 sind beispielhaft Färbungen von zwei Adenokarzinomen dargestellt. Bei Biopsat #195 handelt es sich um ein sehr gut differenziertes Adenokarzinom (Abbildung 9, Tabelle 3) vom lepidischen Subtyp. Die zum Teil hochprismatischen Zellen sind durch eine homogene E-Cad/ β -Cat-Expression (Abbildung 9, I–J) gekennzeichnet. Zusätzlich zeigt die MUC-1-Färbung durch die apikale Lokalisation des Markers eine Polarisation der Tumorzellen (Abbildung 9, M–N).

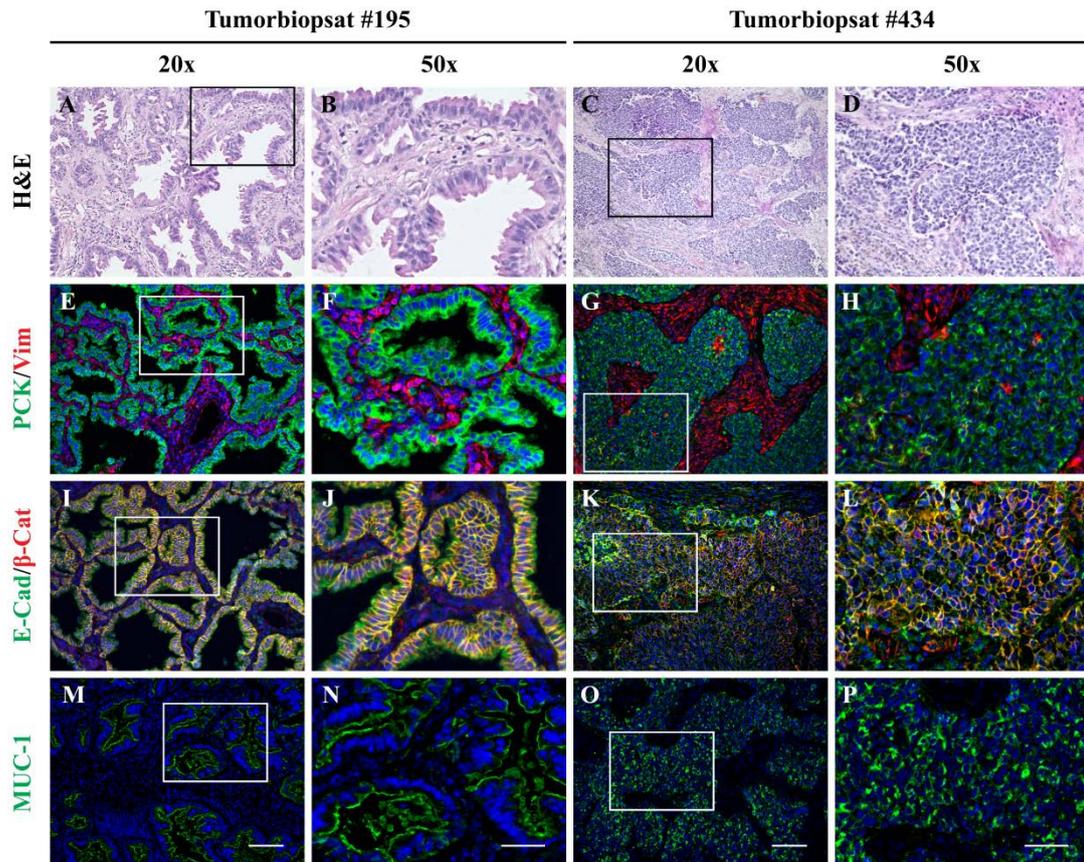


Abbildung 9: Markeranalyse von Tumorbiopsaten

H&E-Färbung (A–D) sowie Immunfluoreszenzfärbungen in 20x und 50x Vergrößerung von Tumorbiopsaten, die von der Herz-Thoraxchirurgie des Universitätsklinikum Würzburg zur Verfügung gestellt wurden. Die Tumorzellen exprimierten die epithelialen Marker PCK (E–H), E-Cad und β -Cat (I–L). In einigen Tumorzellen und in den Stromazellen konnte das mesenchymale Protein Vim (E–H) detektiert werden. Der transmembranständige Tumormarker MUC-1 (M–P) wurde ebenfalls durch einen spezifischen Antikörper nachgewiesen. Dabei zeigt die Färbung MUC-1 in dem Biopsat #195 an der apikalen Seite und in dem Biopsat #343 im gesamten Zytoplasma. Es ist jeweils die Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbung mit DAPI als Gegenfärbung dargestellt. Der Ausschnitt der 50x Vergrößerung ist jeweils mit einem Rechteck in der 20x Vergrößerung gekennzeichnet. Maßstabsbalken: 100 μ m (20x) bzw. 75 μ m (50x).

Im Vergleich dazu besitzt das Biopsat #434 vom soliden Typ weniger differenzierte Merkmale: E-Cad und β -Cat wurden heterogen angefärbt (Abbildung 9, K–L) und anhand der diffusen Lokalisation von MUC-1 ist keine Polarisierung erkennbar (Abbildung 9, O–P). Der Stromaanteil, dargestellt durch ausschließlich Vim-positive Zellen in Abbildung 9 E–H, ist im Biopsat #434 im Vergleich zu dem Biopsat #195 höher. Bei beiden Subtypen ist dieser mesenchymale Marker nur in wenigen Tumorzellen heterogen exprimiert. Die Tumorzellen weisen alle einen epithelialen Phänotyp auf,

der auch durch die PCK-Färbung (Abbildung 9, E–H) bestätigt wurde. Die Biopsate #432 und #436 ähnelten im Subtyp Biopsat #434 und sind daher nur als Überblick in Tabelle 30 dargestellt. Die Zusammenstellung zeigt, dass die Tumorzellen in den untersuchten Biopsaten ihren epithelialen Charakter größtenteils bewahrten, da PCK und E-Cad in allen Proben positiv sind. Die Kolokalisation von E-Cad und β -Cat an den Zellgrenzen belegt, dass die Tumorzellen differenzierte Zellverbindungen aufbauten. Zudem exprimierten nur vereinzelt Tumorzellen den mesenchymalen Marker Vim.

Tabelle 30: Nachweis von epithelialen und mesenchymalen Markern in Biopsaten³

	PCK	Vim	E-Cad	β-Cat
Biopsat #195	+++ , homogen	+ , heterogen	+++ , homogen	+++ , homogen
Biopsat #434	+++ , homogen	+ , heterogen	+++ , heterogen	+++ , heterogen
Biopsat #432	++(+), heterogen	++ , heterogen	++ , heterogen	++ , heterogen
Biopsat #436	+++ , homogen	+ , heterogen	+++ , heterogen	+++ , heterogen

³Beurteilung: + in wenigen Zellen, ++ in einigen Zellen, +++ in allen Zellen; heterogen: die Intensität der Färbung variiert in den Zellen, homogen: die Intensität ist in allen Zellen ähnlich

Markeranalyse in Xenografts von HCC827- und A549-Zellen

Die 3D Tumormodelle sollten neben den Patientenbiopsaten auch mit bereits in der Präklinik verwendeten Modellen verglichen werden. Dafür wurden die von der Firma Oncotest zur Verfügung gestellten Xenografts der Zelllinien A549 und HCC827 ebenfalls auf die Marker PCK/Vim, E-Cad/ β -Cat sowie MUC-1 gefärbt. In Abbildung 10 sind beispielhaft die Färbungen von zwei Xenografts dargestellt. Die Induktion des Xenograft #297135 erfolgte durch subkutane Injektion von HCC827-Zellen. Der Tumor ist durch eine homogene Expression der Marker PCK (E, F), E-Cad und β -Cat (I, J) gekennzeichnet und spiegelt damit den epithelialen Phänotyp der HCC827-Zelllinie wider. Nur einzelne Vim-positive Zellen sind vorhanden (E, F). In einigen Bereichen weisen die Zellen eine Polarisierung mit apikaler MUC-1-Lokalisation auf (M, N, weißer Pfeil), jedoch ist größtenteils keine Polarisierung zu erkennen.

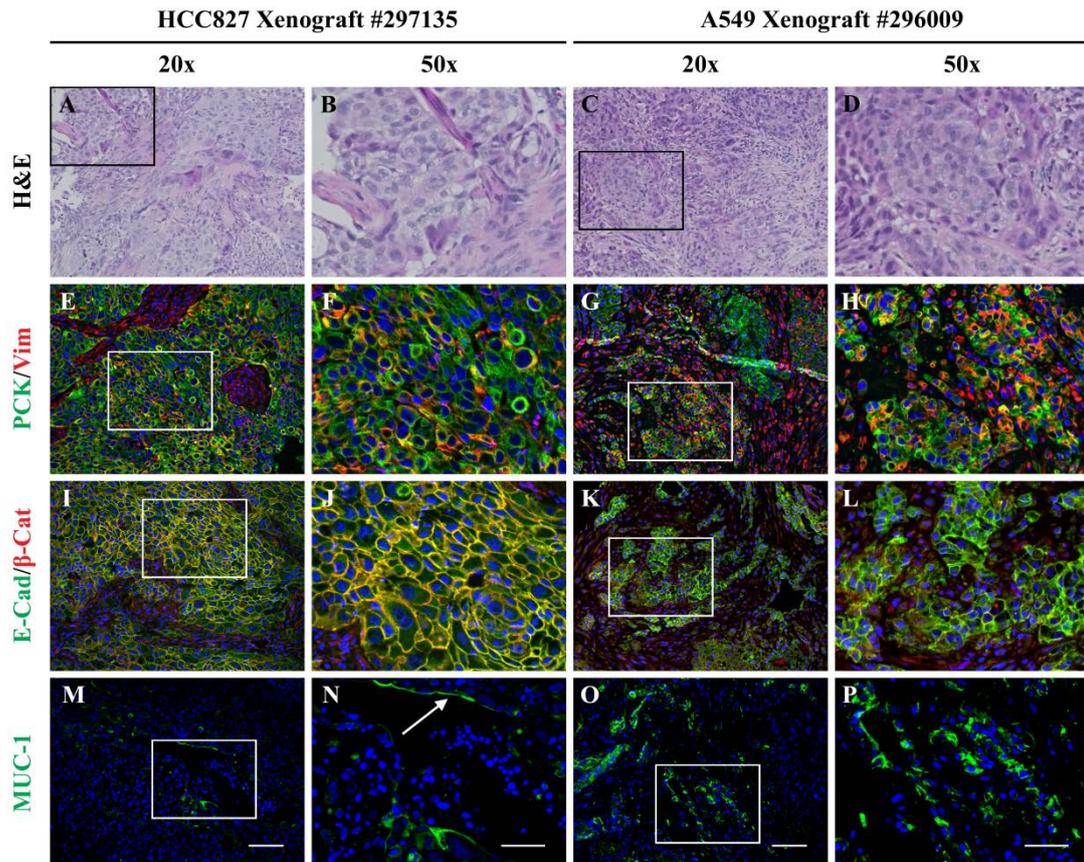


Abbildung 10: Analyse von tumorrelevanten Markern in Xenografts

H&E-Färbung (A–D) sowie Immunfluoreszenzfärbungen in 20x und 50x Vergrößerung von Xenografts der Zelllinien HCC827 und A549, die von der Firma Oncotest generiert und zur Verfügung gestellt wurden. Die Tumorzellen exprimierten die epithelialen Marker PCK (E–H), E-Cad und β -Cat (I–L). In einigen Tumorzellen und in den Stromazellen konnte das mesenchymale Protein Vim (E–H) detektiert werden. Der transmembrane Tumormarker MUC-1 (M–P) wurde ebenfalls durch einen spezifischen Antikörper nachgewiesen. In den HCC827-Xenografts besitzt der Marker in einigen Bereichen eine apikale Lokalisation, in den A549-Xenografts ist er im gesamten Zytoplasma nachweisbar. Es ist jeweils die Überlagerung der Immunfluoreszenzfärbung mit DAPI als Gegenfärbung dargestellt. Der Ausschnitt der 50x Vergrößerung ist jeweils mit einem Rechteck in der 20x Vergrößerung gekennzeichnet. Maßstabskalen: 100 μ m (20x) bzw. 75 μ m (50x).

Bei Xenograft #296009, welches durch die Injektion von A549-Zellen in eine Maus generiert wurde, waren die Zellen hingegen nicht polarisiert (O, P). Neben einer einheitlichen Färbung der Marker PCK, E-Cad und β -Cat, wie zuvor beim HCC827-Xenograft beobachtet, ist hier der Anteil an Vim-positiven Tumorzellen höher. Weiterhin durchziehen größere Stromabereiche (Vim-positiv, PCK-negativ) den Tumor.

In Tabelle 31 ist die Expression der epithelialen und mesenchymalen Marker von allen untersuchten Xenografts dargestellt. Im Wesentlichen unterscheiden sich diese nicht von den in Abbildung 10 gezeigten Modellen. Deutlich wird jedoch, dass die HCC827-Xenografts eine einheitlichere Expression der untersuchten Marker zwischen den fünf Ansätzen zeigten als die A549-Xenograftmodelle.

Tabelle 31: Nachweis von epithelialen und mesenchymalen Markern in Xenografts⁴

	PCK	Vim	E-Cad	β-Cat
HCC827				
#296550	+++ , homogen	++ , heterogen	+++ , homogen	+++ , homogen
#297135	+++ , homogen	++ , heterogen	+++ , homogen	+++ , homogen
#297371	+++ , homogen	++ , heterogen	+++ , homogen	+++ , homogen
#297703	+++ , homogen	++ , heterogen	+++ , homogen	+++ , homogen
#304781	+++ , homogen	++ , heterogen	+++ , homogen	+++ , homogen
A549				
#296004	+++ , heterogen	+++ , homogen	+ , heterogen	+ , heterogen
#296009	+++ , homogen	++ , heterogen	+++ , homogen	++ , homogen
#296664	+++ , homogen	+++ , heterogen	+++ , homogen	+++ , heterogen
#297184	+++ , homogen	+++ , homogen	+++ , homogen	+++ , heterogen
#298017	+++ , homogen	++ , homogen	+++ , homogen	+++ , heterogen

⁴Beurteilung: + in wenigen Zellen, ++ in einigen Zellen, +++ in allen Zellen; heterogen: die Intensität der Färbung variiert in den Zellen, homogen: die Intensität ist in allen Zellen ähnlich

Vergleich der Markerexpression zwischen 2D und dem 3D Tumormodell

Für den Aufbau des 3D Tumortestsystems wurden drei verschiedene Tumorzelllinien verwendet, die alle als epithelial und adhärent beschrieben wurden (Lieber *et al.*, 1976; Brower *et al.*, 1986; Virmani *et al.*, 1998). In der statischen 3D Kultur wuchsen die HCC827-, A549-, und H441-Zellen auf der Matrixoberfläche und besiedelten erhaltene Kryptenstrukturen, wie bereits in Abbildung 8 gezeigt. Während die HCC827-Zellen eine geschlossene einlagige Schicht bildeten und nur in den Krypten mehrschichtig auftraten (Abbildung 11), wuchsen die H441-Zellen auch auf der Oberfläche an vielen Stellen in zwei bis drei Zelllagen (Abbildung 13). Die A549-Zellen bildeten ebenfalls einen einschichtigen, jedoch nicht vollständig geschlossenen Zellrasen (Abbildung 12).

Die dynamische Kultur in einem Flussreaktor führte in allen Modellen zu einem stark verbesserten Zellwachstum, sodass gewebeartige Strukturen aus über zehn Zellschichten entstehen konnten.

Im Folgenden sind die Immunfluoreszenzfärbungen der Tumormodelle beschrieben. Diese sollten zeigen, ob die Kultur unter 3D Bedingungen zu einer veränderten Expression der zuvor eingeführten Proteinmarker führt und ob die Tumormodelle, besser als die 2D Kultur, mit Biopsaten aus Patienten bzw. Xenograft-Modellen vergleichbar sind.

Die HCC827-Zellen sind in herkömmlicher 2D Kultur durch einen überwiegend epithelialen Phänotyp gekennzeichnet, nachgewiesen durch die Markierung von PCK (Abbildung 11; A, D) und E-Cad sowie der Kolokalisation von E-Cad mit β -Cat (Abbildung 11; G, J). Dabei sind die Marker unterschiedlich stark exprimiert und auch nicht in allen Zellen zu finden. Die 3D Kultur der HCC827-Zellen führte hingegen zu einer homogenen Expression dieser Epithel- und Differenzierungsmarker in allen Zellen. Der mesenchymale Marker Vim konnte sowohl in 2D als auch in 3D nur in einigen Zellen detektiert werden (Abbildung 11, A–F), wobei sich die Vim-positiven Zellen in 3D ausschließlich in tieferen Strukturen der Matrix befinden (weiße Pfeile in Abbildung 11, E und F). Die HCC827-Zellen weisen auf der Matrix eine Polarisierung auf, die anhand der apikalen Expression von MUC-1 in Abbildung 11, N–O und Q–R sichtbar ist. Unter dynamischen Bedingungen exprimierten nur die medienexponierten Zellen den Marker MUC-1 auf der apikalen Seite, wohingegen in tieferen Schichten vereinzelt unpolarisierte Zellen detektiert werden konnten (Abbildung 11, Q–R, weißer Pfeil). In 2D ist eine Einschätzung der Polarisierung der Zellen anhand der MUC-1 Färbung nicht möglich, da die Zellen nicht von der Seite betrachtet werden können.

Die A549- weisen im Vergleich zu den HCC827-Zellen einen mesenchymaleren Phänotyp auf. Dieser ist gekennzeichnet durch eine höhere Expression von Vim (Abbildung 12, A–F). Auch in dieser Zelllinie führte die 3D Kultur zu einer homogeneren Färbung der Marker als die 2D Zellkultur. Zusätzlich wurde der epitheliale Marker E-Cad nur unter 3D Bedingungen exprimiert und ist dort, wie bei den HCC827- und den H441-Zellen, mit β -Cat an den Zellgrenzen kolokalisiert.

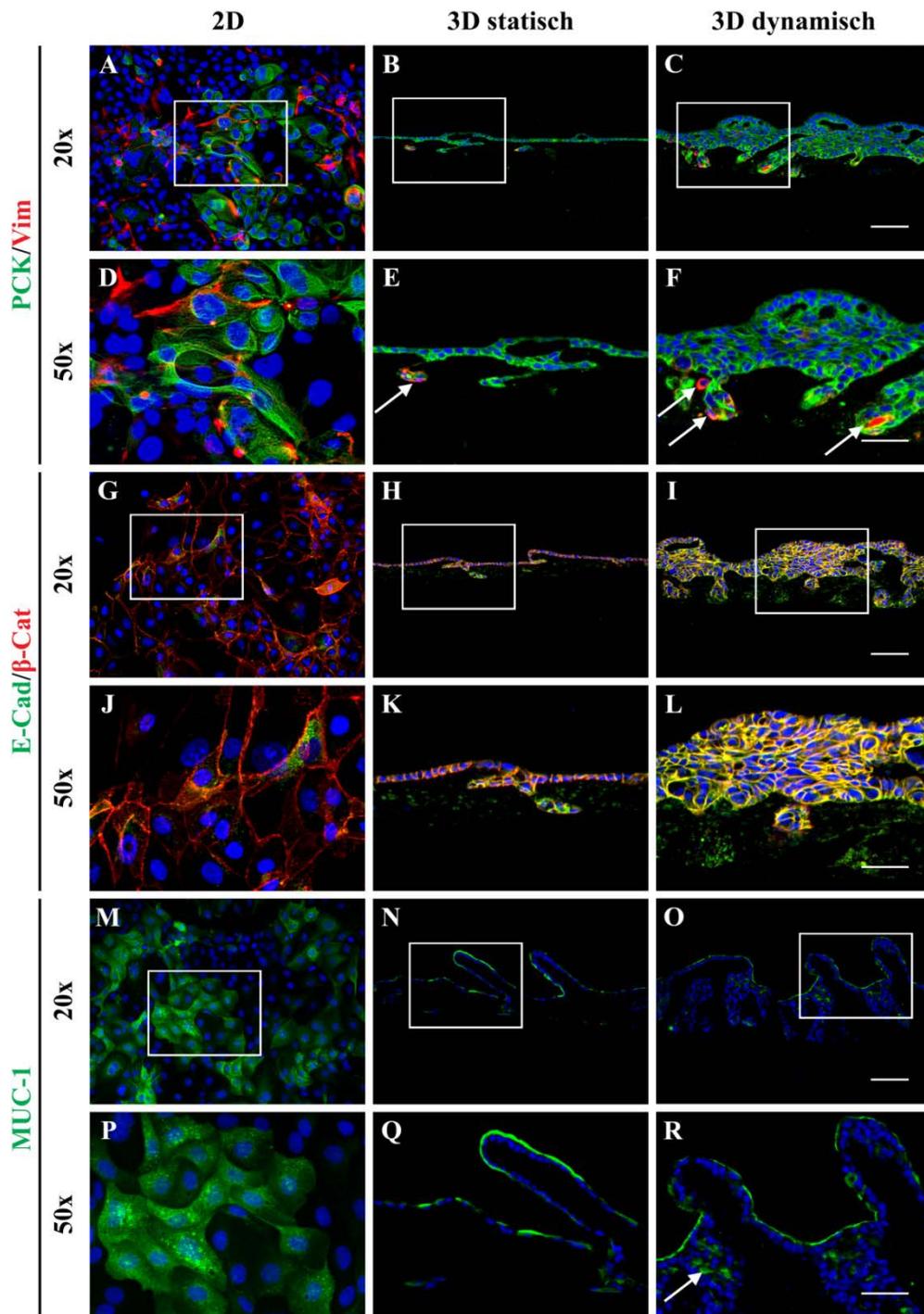


Abbildung 11: HCC827-Zellen in 2D, im 3D statischen und dynamischen System

Die 3D Kultur von HCC827-Zellen führte zu einer homogenen Expression der Marker PCK (A–F), E-Cad und β -Cat (G–L). Vim konnte in einigen Tumorzellen detektiert werden (A–F, weiße Pfeile). In 3D zeigen die Zellen auf der Oberfläche der Matrix eine apikale Lokalisation von MUC-1, wohingegen diese in tiefer in der Matrix gelegenen Zellen zum Teil diffus ist (weißer Pfeil). Eine Einschätzung der Polarisierung in 2D ist nicht möglich (M–R). Dargestellt ist jeweils die Überlagerung der beiden Kanäle sowie der Gegenfärbung mit DAPI. Der Ausschnitt der 50x Vergrößerung ist jeweils mit einem Rechteck in der 20x Vergrößerung gekennzeichnet. Maßstabsbalken: 100 μ m (20x) bzw. 75 μ m (50x).

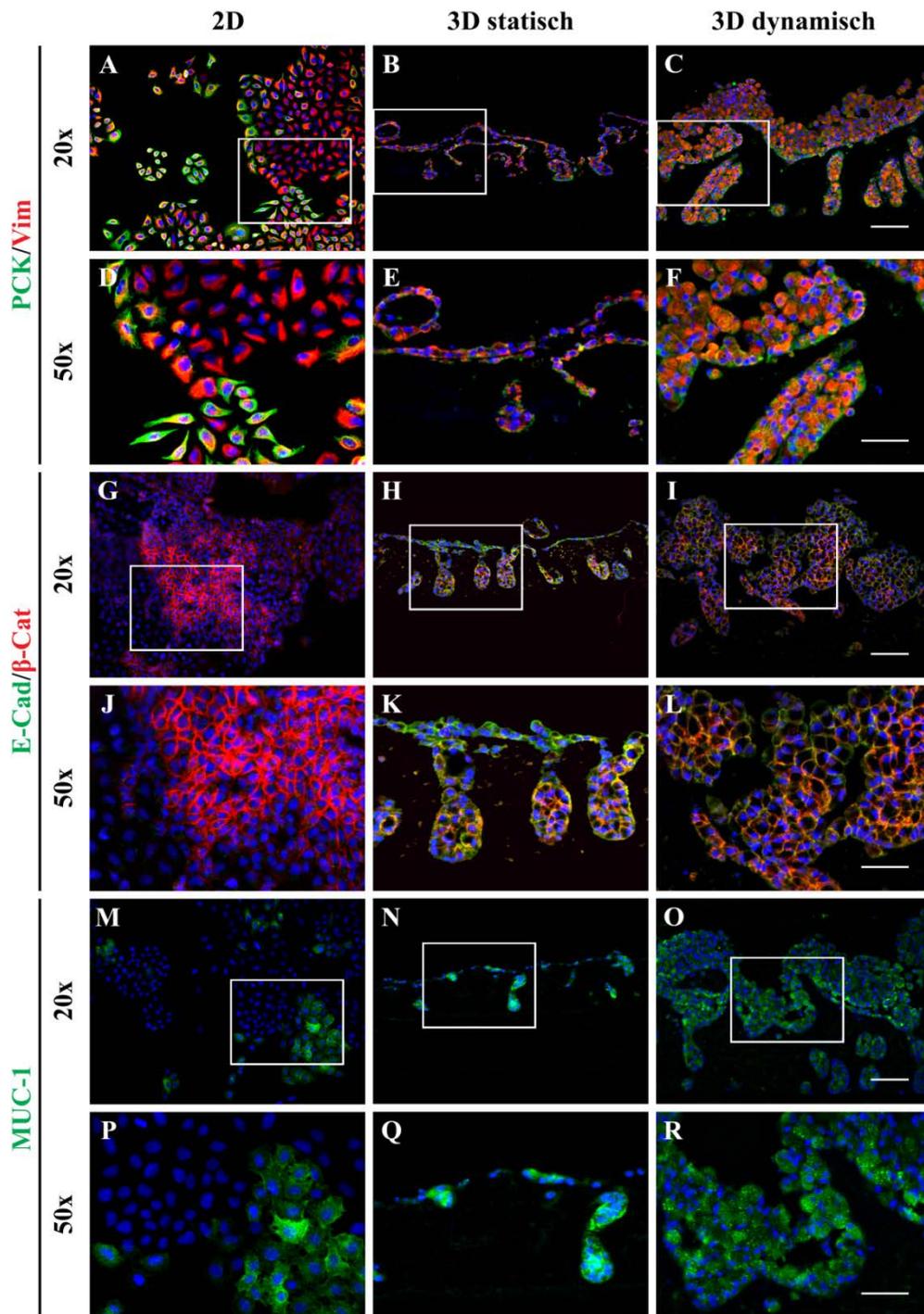


Abbildung 12: A549-Zellen in 2D, im 3D statischen und dynamischen System

Die 3D Kultur von A549-Zellen führte im Vergleich zur 2D Kultur zu einer homogenen Expression der Marker PCK und Vim (A–F) sowie β -Cat (G–L). Der epitheliale Marker E-Cad konnte nur im 3D Modell detektiert werden (G–L). Die Zellen zeigen eine diffuse Färbung von MUC-1 (M–R). Dargestellt ist jeweils die Überlagerung der beiden Kanäle sowie der Gegenfärbung mit DAPI. Der Ausschnitt der 50x Vergrößerung ist jeweils mit einem Rechteck in der 20x Vergrößerung gekennzeichnet. Maßstabsbalken: 100 μ m (20x) bzw. 75 μ m (50x).

Im Gegensatz zu den HCC827- zeigen die A549-Zellen in den 3D Färbungen keine Polarisierung: MUC-1 befindet sich diffus im gesamten Zytoplasma (Abbildung 12; N–O, Q–R). Auch hier ist in den 2D Färbungen aufgrund der Aufsicht im Mikroskop keine Einschätzung der Polarisierung möglich.

Die H441-Zellen besitzen von den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien den epithelalsten Phänotyp. Dabei zeigt sich in Abbildung 13 in der Färbung der Proteine PCK, E-Cad und β -Cat kein Unterschied zwischen 2D und 3D. Alle Proteine sind stark und homogen in allen Zellen exprimiert. Zudem ist E-Cad mit β -Cat an den Zellgrenzen kolo-kalisiert. Vim konnte nicht nachgewiesen werden. Die Lokalisation von MUC-1 unterscheidet sich in 3D in Abhängigkeit der Tiefe der Zellen in der Matrix: Zellen an der Oberfläche zeigen eine überwiegend apikale Expression, während Zellen in tieferen Schichten unpolarisiert sind (Abbildung 13; N–O, Q–R). In 2D kann die Lokalisation anhand der MUC-1 Färbung nicht untersucht werden.

Vergleicht man die verschiedenen 3D Modelle mit den Patientenbiopsaten, so zeigen diese Merkmale unterschiedlicher Subtypen. Die statische 3D Kultur der HCC827- oder der H441-Zellen ist in der Markerexpression beispielsweise mit einem sehr gut differenzierten Adenokarzinoms vom lepidischen Subtyp (Abbildung 9, Tabelle 3) vergleichbar. Werden dieselben Zelllinien unter dynamischen Bedingungen kultiviert, so entsprechen das Wachstum und die Markerexpression eher dem soliden Subtyp. Tumore, bei denen eine Depolarisierung des MUC-1 stattgefunden hat, können durch die A549-Zellen abgebildet werden.

Die Expression der untersuchten Marker der HCC827- und A549-3D Tumormodelle ist vergleichbar mit den entsprechenden Xenografts, wobei die Lokalisation sowie die Intensität der Marker in den Zellen der 3D Modelle homogener erscheinen. In den 3D Modellen der HCC827-Zelllinie weisen beispielsweise alle Zellen eine apikale Expression von MUC-1 auf, während dies in den Xenografts nur in einigen Zellen der Fall ist.

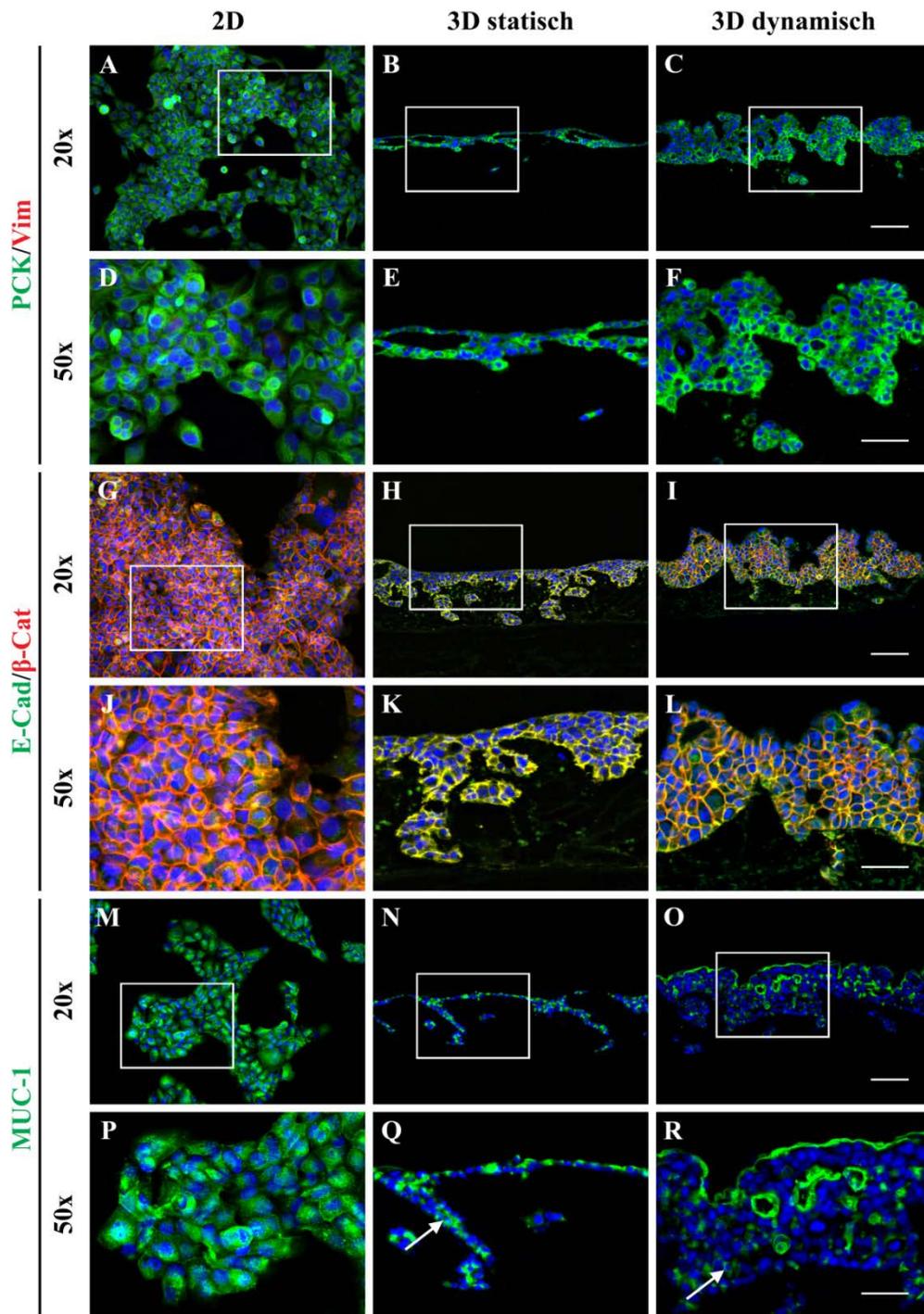


Abbildung 13: H441-Zellen in 2D, im 3D statischen und dynamischen System

Die Expression der Proteine PCK (A–F), E-Cad und β -Cat (G–L) ist in 2D und 3D vergleichbar. Vim wurde nicht detektiert (A–F). In 3D zeigen die Zellen auf der Oberfläche eine apikale Lokalisation von MUC-1, in tieferen Schichten der Matrix eine diffuse Färbung (weiße Pfeile) im gesamten Zytoplasma. Zum Teil sind in tieferen Schichten auch drüsenartige Ringstrukturen mit einer apikalen MUC-1-Expression zu erkennen (N–O, Q–R). Dargestellt ist jeweils die Überlagerung der beiden Kanäle sowie der Gegenfärbung mit DAPI. Der Ausschnitt der 50x Vergrößerung ist jeweils mit einem Rechteck in der 20x Vergrößerung gekennzeichnet. Maßstabsbalken: 100 μ m (20x) bzw. 75 μ m (50x).

Tabelle 32: Markeranalyse der Zelllinien unter verschiedenen Kulturbedingungen⁵

	PCK	Vim	E-Cad	β-Cat
HCC827				
2D	++, heterogen	++ heterogen	+ heterogen	++ heterogen
3D statisch	+++ homogen	+ heterogen	+++ homogen	+++ homogen
3D dynamisch	+++ homogen	++ heterogen	+++ homogen	+++ homogen
A459				
2D	++ heterogen	+++ heterogen	–	++ heterogen
3D statisch	+++ heterogen	+++ homogen	+++ homogen	+++ heterogen
3D dynamisch	+++ heterogen	+++ homogen	+++ heterogen	+++ heterogen
H441				
2D	+++ homogen	–	+++ homogen	+++ homogen
3D statisch	+++ homogen	–	+++ homogen	+++ homogen
3D dynamisch	+++ homogen	–	+++ homogen	+++ homogen

⁵Beurteilung: - kein Nachweis, + in wenigen Zellen, ++ in einigen Zellen, +++ in allen Zellen; heterogen: die Intensität der Färbung variiert in den Zellen, homogen: die Intensität ist in allen Zellen ähnlich

Vergleich der Proliferationsraten

Ein Problem in der präklinischen Testung ist, dass die Proliferationsraten in konventioneller 2D Kultur artifiziell hoch und nicht mit der *in vivo* Situation vergleichbar sind. Zur Testung, ob die Proliferation der Tumorzellen in den 3D Modellen eher den Raten im nativen Gewebe entsprechen, wurden die Proliferationsraten der drei Zelllinien in 2D und 3D quantifiziert und mit denen in den Xenografts bzw. in den Tumorbiopsaten aus der Klinik verglichen.

In 2D zeigte sich dabei in allen drei Zelllinien eine sehr hohe Proliferationsrate, mit über 88 % proliferativen Zellen (Tabelle 33). In 3D konnte sowohl unter statischen als

auch dynamischen Bedingungen eine Verringerung der Proliferation erreicht werden, wobei es zwischen den Zelllinien große Unterschiede gab. Die HCC827-Zellen waren mit 27,6 % im statischen und 22,3 % im dynamischen System mit den Proliferationsraten in den entsprechenden Xenografts vergleichbar. Im Gegensatz dazu, waren die A549-Zellen in den 3D Modellen mit 9,4 % in statischer und 3,4 % in dynamischer Kultur durch 3 bis 10-fach geringere Raten als im Xenograft gekennzeichnet. Diese niedrigen Proliferationsraten ähnelten wiederum denen der hier untersuchten Tumorbiopsate. Die H441-Zellen proliferierten sowohl im statischen als auch im dynamischen Modell am stärksten.

Tabelle 33: Proliferationsraten der Tumorzellen⁶

	2D	3D statisch	3D dynamisch	Xenograft	natives Gewebe
HCC827	90,5 % (± 9,2 %)	27,6 % (± 10,3 %)	22,2 % (± 5,4 %)	32,5 % (± 5,5 %)	-
A549	88,1 % (± 7,3 %)	9,4 % (± 4,5 %)	3,4 % (± 2,0 %)	32,0 % (± 16,8 %)	-
H441	96,0 % (± 5,9 %)	33,6 % (± 6,6 %)	65,3 % (± 12,3 %)	-	-
Tumorbiopsat	-	-	-	-	6,40 % (± 3,7 %)

⁶Dargestellt sind die Mittelwerte aus allen Versuchen (2D n ≥ 8, 3D statisch n ≥ 25, 3D dynamisch n ≥ 3) bzw. den verfügbaren Tumorbiopsaten (n = 3) / Xenografts (n = 5) ± STABW.

5.1.3 Varianz der Analyseparameter Proliferation und Apoptose

Testsysteme, die auf biologischen Scaffolds basieren, müssen aufgrund der zu erwartenden Schwankungen sorgfältig standardisiert werden. Zur Untersuchung der Aussagekraft der generierten 3D Tumormodelle, wurden die Varianzen der Proliferation und der Apoptose innerhalb des Systems ohne Behandlung untersucht. Dafür wurden alle Proliferationsraten der unbehandelten Kontrollen sowie alle T0-Werte des M30 Cytodeath[®] ELISAs zunächst in Form eines Box-Whisker-Plots aufgetragen (Abbildung 14) und anschließend die Variationskoeffizienten als relatives Streuungsmaß um den

Mittelwert bestimmt. Zum Vergleich mit den 3D Modellen dienten dabei konventionelle 2D Testungen.

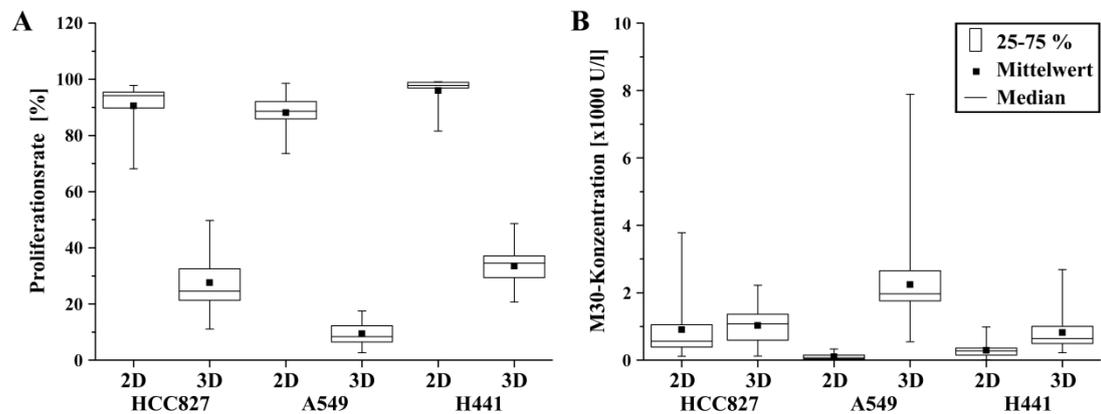


Abbildung 14: Schwankungen der Analyseparameter Proliferation und Apoptose

Die Box-Whisker-Plots zeigen A) die Schwankungen der Proliferationsraten der unbehandelten Kontrollen aus allen durchgeführten Versuchen in 2D und 3D, $n \geq 8$ und B) die Schwankung von allen T0-Werten der Apoptosemessungen in unbehandelten sowie behandelten Proben in 2D und 3D, $n \geq 41$.

Wie bereits in Tabelle 33 gezeigt, sind die Proliferationsraten in 3D durchgehend niedriger im Vergleich zu denen in 2D (Abbildung 14, A). Die Variationskoeffizienten sind in 3D höher (Tabelle 34), jedoch in allen Zelllinien unter 0,5. Bei den H441 zeigt er mit 0,2 den niedrigsten Wert. Damit können im 3D Modell Unterschiede von 100 % (Faktor 2) im Vergleich zur Kontrolle mit einem Konfidenzintervall von 95% auf die Behandlung zurückgeführt werden, bei H441 sogar Änderungen von nur 40%.

Tabelle 34: Variationskoeffizienten der Analyseparameter⁷

	Proliferationsrate		T0-Wert der Apoptosemessung	
	2D	3D	2D	3D
HCC827	0,10	0,37	0,96	0,49
A549	0,08	0,47	0,81	0,50
H441	0,06	0,20	0,70	0,48

⁷Die Variationskoeffizienten der Proliferationsraten wurden aus den unbehandelten Kontrollen und die der Apoptose aus den T0-Werten in allen Proben bestimmt. Proliferation $n \geq 8$, Apoptose $n \geq 41$.

Die Auftragung der T0-Werte der Apoptosemessungen in allen Proben zeigt stets eine höhere Grundapoptose in den 3D Modellen im Vergleich zu 2D (Abbildung 14, B). Die Variationskoeffizienten sind in 3D jedoch deutlich geringer und in allen Zelllinien gleich oder knapp unter 0,5 (Tabelle 34). Dieser Wert wurde im 2D Modell um 40 bis

90 % überschritten und zeigt bei den HCC827-Zellen den höchsten Wert mit 0,96. Auch für die Apoptose kann im 3D Modell eine Substanz ab einer 2-fachen Änderung des Wertes im Vergleich zur Kontrolle mit 95 %iger Sicherheit als wirksam betrachtet werden.

5.1.4 Vitalität als zusätzlicher Analyseparameter in 3D

Neben der Proliferation und der Apoptose, die in der vorliegenden Arbeit zur Analyse der Tumormodelle dienten, wurde die Bestimmung der Vitalität als zusätzlicher Parameter untersucht. Dafür mussten zunächst die auf Sphäroidkulturen angepassten Assays zur Zellvitalitätsbestimmung, CellTiter-Glo[®] 3D und RealTime-Glo[™] MT, auf das scaffoldbasierte 3D Tumormodell übertragen werden (siehe 4.5.2 und 4.5.3).

Zunächst wurde der CellTiter-Glo[®] 3D Vitalitätsassay erfolgreich angepasst, sodass Behandlungseffekte gezeigt werden konnten und die Ergebnisse mit Färbungen und Apoptosedaten korrelierten (Daten nicht gezeigt). In den H&E-Färbungen der SIS muc nach Lyse der Tumorzellen waren jedoch noch Zellen sichtbar, sodass weitere Optimierungen notwendig gewesen wären. Da dieser Assay jedoch eine Endpunktmessung darstellt und deshalb kein weiterer Informationsgewinn zu erkennen war, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Stattdessen wurde der nicht invasive RealTime-Glo[™] MT zur Vitalitätsbestimmung für die 3D Tumormodelle etabliert. Dieser ermöglicht die Bestimmung der Vitalität im Zeitverlauf. Die Messung des Lumineszenzsignals über die Zeit ergab in allen Zelllinien einen Anstieg bis 10 bis 12 h nach Substratzugabe (unbehandelte Proben, Abbildung 15, A). Anschließend fiel das Signal wieder ab, sodass im weiteren Verlauf keine verlässliche Bestimmung der Vitalität möglich war. Eine Behandlung mit dem HSP90-Inhibitor 17-AAG zeigte in den ersten 12 h eine differenzierte Antwort der Zelllinien. Dabei sank die Vitalität der HCC827- am stärksten auf ca. 60 %, die der A549- auf ca. 80 % und die H441-Zellen reagierten nicht auf den Inhibitor (Abbildung S 2). Diese Effekte bis zu 12 h nach Beginn der Behandlung konnten in den Färbungen, Proliferationsraten und Apoptosebestimmungen nach drei Tagen Behandlung jedoch nur teilweise bestätigt werden (Abbildung 20, Abbildung 21). Daraus schlussfolgernd ist der RealTime-Glo[™] MT nur bedingt dazu geeignet, um langfristig Behandlungseffekte zu untersuchen.

Denkbar ist es jedoch, den Assay zu nutzen, um vom Standard abweichende Modelle vor dem Start einer Behandlung zu identifizieren. Für diese Untersuchung, wurde die Schwankung des Lumineszenzsignals zwischen den Modellen eines Versuches betrachtet. Dazu wurden die Variationskoeffizienten der T0-Werte von vier bis sechs Ansätzen pro Zelllinie berechnet. Es ergaben sich dabei sehr geringe Koeffizienten von 0,1 (HCC827); 0,17 (A549) und 0,15 (H441) (Abbildung 15, B). Der Assay ist dementsprechend zur Identifikation von fehlerhaften Tumormodellen vor der Behandlung geeignet.

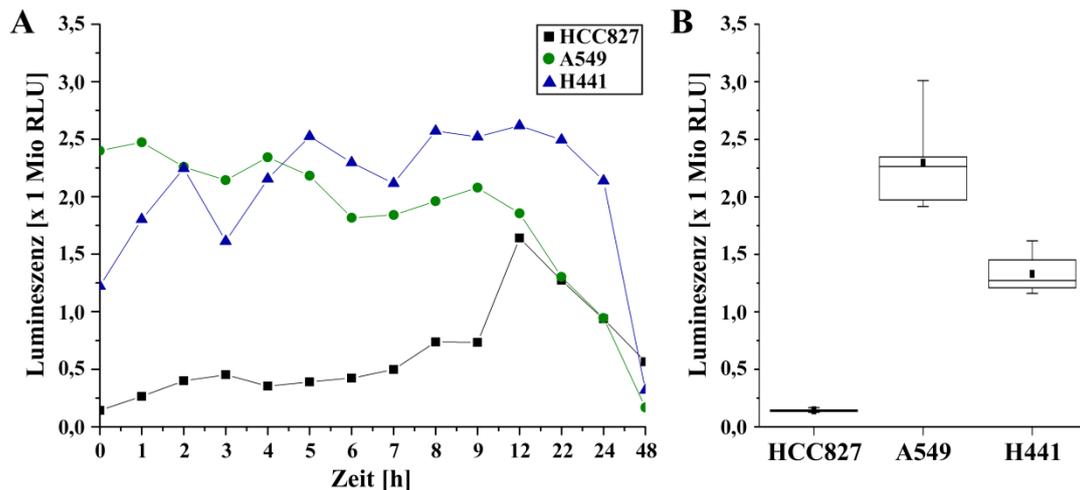


Abbildung 15: Lumineszenzsignale des RealTime-Glo™ Vitalitätsassays in 3D

A) Intensität des Lumineszenzsignals im RealTime-Glo™ Vitalitätsassays über einen Zeitraum von 48 h ($n = 1$; 3 Replikate). Bis ca. 10 bis 12 h nimmt die Intensität zu und fällt anschließend wieder ab. B) Der Boxplot zeigt die geringen Schwankungen des Lumineszenzsignals der T0-Werte innerhalb eines Versuches ($n = 1$; 4 bis 6 Replikate).

5.2 Etablierung des 3D Testsystems anhand zielgerichteter Therapien

5.2.1 Biomarkergeleitete anti-EGFR-Therapie mit Gefitinib

Nachdem das 3D Tumormodell phänotypisch charakterisiert und die Analyseparameter untersucht wurden, sollte das Modell anhand einer in der Klinik erfolgreichen Therapie validiert werden. Dafür wurde die Behandlung mit dem EGFR-Inhibitor Gefitinib (Handelsname: Iressa®) gewählt, da die Therapie mit TKI bei Lungenkrebspatienten mit einer aktivierenden *EGFR*-Mutation bereits in der klinischen Routine angewendet wird (Bronte *et al.*, 2010).

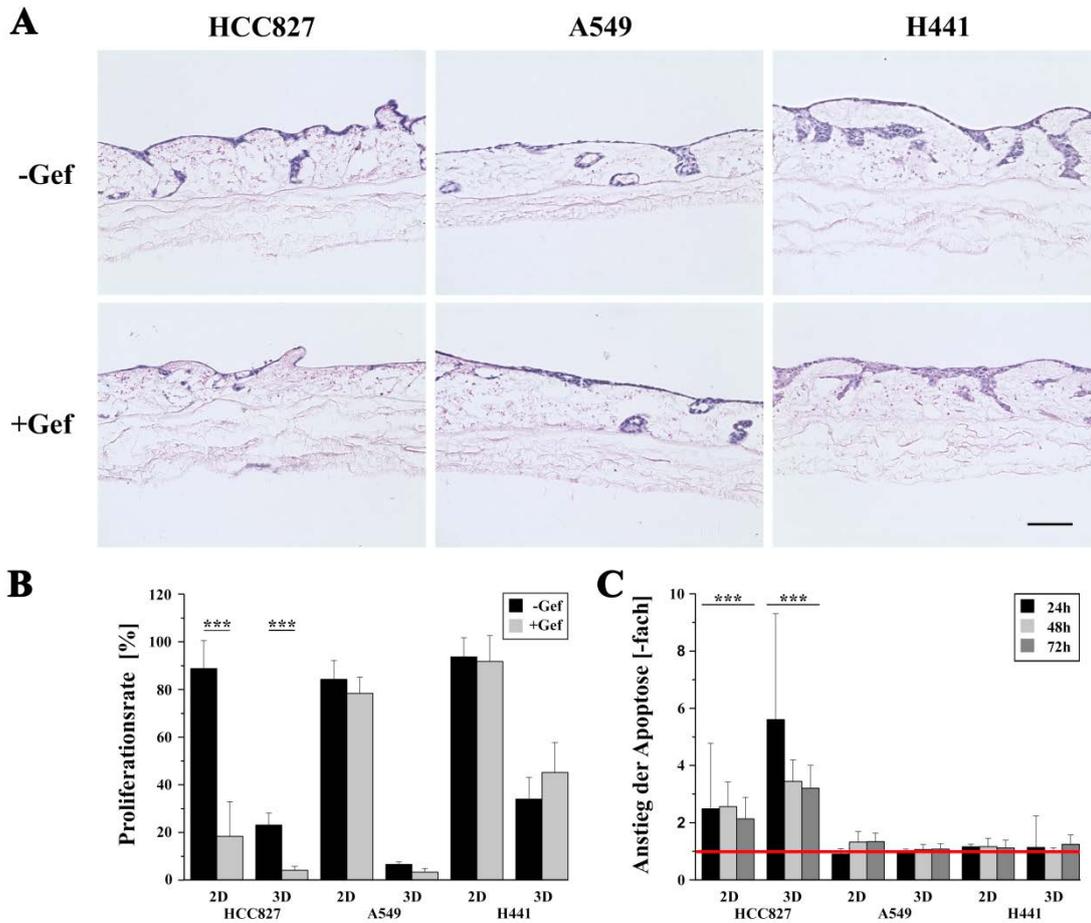


Abbildung 16: Biomarkerspezifische Antwort auf Gefitinib in 2D und 3D

A) Die in 3D kultivierten Zellen, welche entweder mit 1 μM Gefitinib behandelt wurden oder als unbehandelte Kontrolle dienten, wurden in Paraffin eingebettet und H&E gefärbt. Maßstabsbalken: 100 μm . Gef: Gefitinib B) Gefitinib führte ausschließlich in den *EGFR*-mutierten HCC827-Zellen zur Proliferationsinhibierung. 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. *** $p < 0.001$, $n \geq 4$. C) HCC827-Zellen zeigten eine verstärkte Antwort auf Gefitinib in der 3D Kultur. 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 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlung gesammelt. Die Konzentrationen an M30 nach der Behandlung wurden auf die jeweiligen T0-Werte normalisiert und anschließend auf die unbehandelte Kontrolle (rote Linie) bezogen. *** $p < 0.001$, $n \geq 4$.

Die für die Testung in 2D und 3D ausgewählten Zelllinien unterscheiden sich in ihrem Mutationsstatus bezüglich des *EGFR*: Während die HCC827- eine aktivierende *EGFR*-Mutation aufweisen, besitzen A549- und H441-Zellen das Wildtyp-*EGFR*-Gen. Zur Auswahl einer geeigneten Konzentration an Gefitinib für die Therapie in dem 3D Tumormodell, wurden Daten aus 2D *in vitro* Versuchen und klinische Daten herangezo-

gen. Eine Phase I Dosis-Findungsstudie zeigte, dass der Mittelwert der erwarteten Serumkonzentration bei einer täglichen Dosis von 250 mg bei ca. 0,5 μM liegt (Baselga *et al.*, 2002; Yeo *et al.*, 2010). Die maximal tolerierte Dosis von 1.000 mg/Tag führt zu einer mittleren Serumkonzentration von 2,461 μM . In einem Vorversuch in dem 3D Tumormodell zeigte die, in einigen *in vitro* Studien (Tracy *et al.*, 2004; Mukohara *et al.*, 2005; Cragg *et al.*, 2007) verwendete Konzentration von 1 μM , eine gute Wirkung, wobei noch Zellen zur weiteren Analyse auf der Matrix überlebten (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend wurde für alle weiteren Versuche eine Konzentration von 1 μM Gefitinib verwendet.

In Abbildung 16 ist zu sehen, dass nur die *EGFR*-mutierten HCC827-Zellen auf die Behandlung mit Gefitinib reagierten. Dabei ist in der H&E-Färbung eine Abnahme der Zellzahl und eine Elongation der Zellen nach Behandlung der HCC827 sichtbar, wohingegen A549- und H441-Zellen keine morphologischen Veränderungen zeigen. Sowohl in 2D als auch in 3D war die Antwort der HCC827-Zellen auf Gefitinib bezüglich Proliferationsinhibierung und Apoptoseinduktion signifikant. Im 3D Modell konnte jedoch eine verbesserte Medikamentenantwort beobachtet werden: Die Apoptose stieg in 3D doppelt so stark, max. 5,6-fach zu max. 2,6-fach, im Vergleich zu 2D an. A549- und H441-Zellen zeigten weder in 2D noch in 3D eine Änderung der Proliferation oder der Apoptose.

Um zu verstehen, welchen Einfluss die Behandlung mit Gefitinib auf die Signalnetzwerke der Zellen in 2D und 3D hat und um die Unterschiede im Behandlungserfolg im Anschluss *in silico* simulieren zu können, wurden Phospho-RTK und PK-Arrays durchgeführt. Dabei waren die Änderung der Signaltransduktion nach Gefitinib-Behandlung in den HCC827-Zellen zwischen 2D und 3D vergleichbar. *EGFR*, *HGFR* und *WNK Lysine Deficient Protein Kinase 1* (*WNK1*) zeigten nach Behandlung mit Gefitinib eine schwächere Aktivierung und auch die Expression von *HSP60* und β -Cat war niedriger (Abbildung 17, Abbildung 18, Tabelle 35). In vorherigen Versuchen konnte die Herunterregulierung von β -Cat durch Gefitinib bereits in Immunfluoreszenzfärbungen gezeigt werden (Schmitt, 2015).

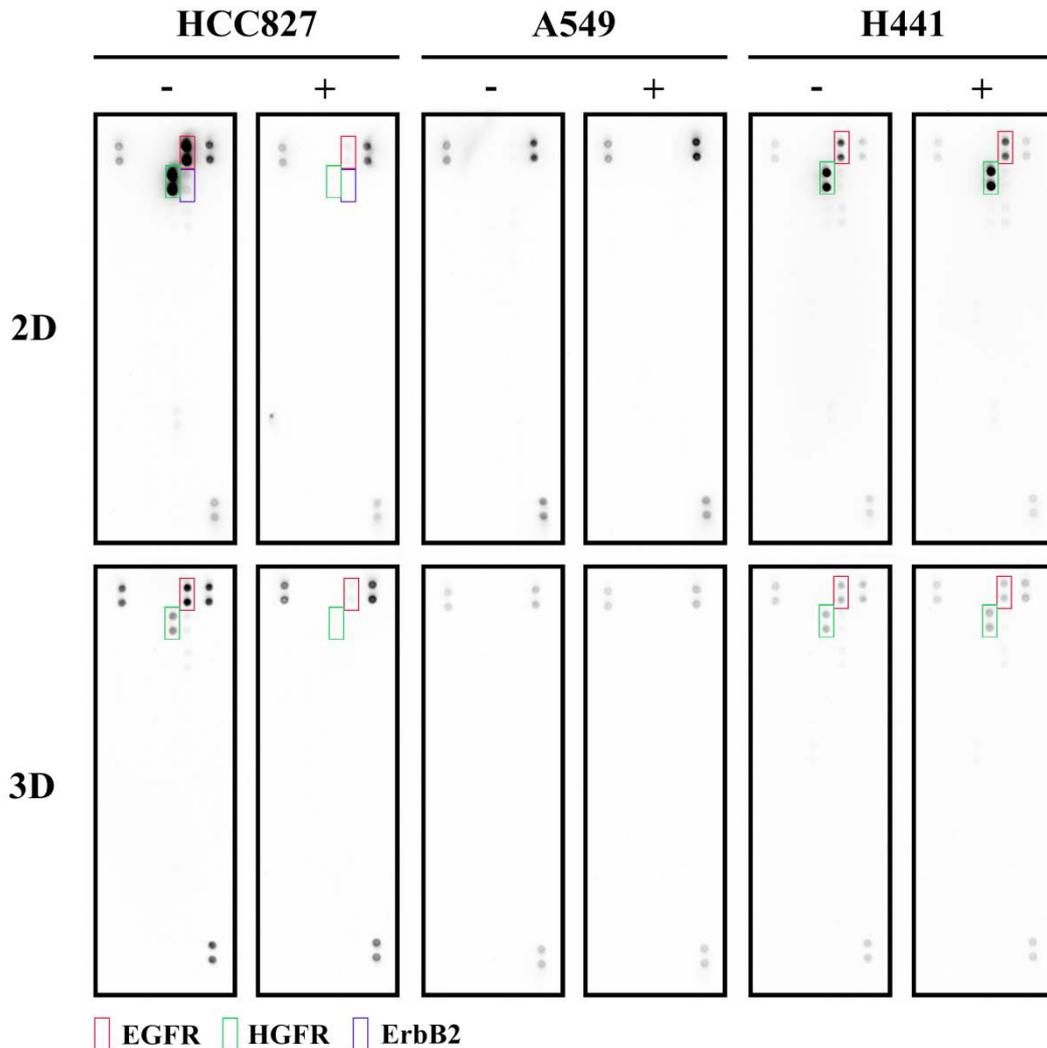


Abbildung 17: Phospho-RTK-Array nach Gefitinib-Behandlung in 2D und 3D

Dargestellt sind Phospho-RTK-Arrays der Zellysate von HCC827-, A549- und H441-Zellen, die in 2D und 3D kultiviert und für 72 h mit 1 μ M Gefitinib behandelt (+) oder als Kontrolle verwendet (-) wurden. Die Änderungen in der Signaltransduktion sind in den auf Gefitinib ansprechenden HCC827-Zellen in 2D und 3D vergleichbar.

Die Behandlung mit Gefitinib führte in den H441-Zellen im Phospho-RTK-Array ebenfalls zu einer schwächeren Aktivierung von EGFR und HGFR im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abbildung 17, Tabelle 35). Im PK-Array zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede zu den HCC827-Zellen. Hier wurde das Protein HSP60 im Gegensatz zu den HCC827-Zellen stärker exprimiert (2D und 3D) und auch die β -Cat-Expression sowie die Aktivierung von WNK1 waren in 2D durch gegenläufige Tendenzen gekennzeichnet (Abbildung 18, Tabelle 35).

Die Signaländerungen der phosphorylierten Kinasen der A549-Zellen lagen in beiden Arrays unter dem Cut-Off-Wert (Bestimmung des Cut-Off siehe Abschnitt 4.11.4.3) und konnten somit nicht weiter analysiert werden.

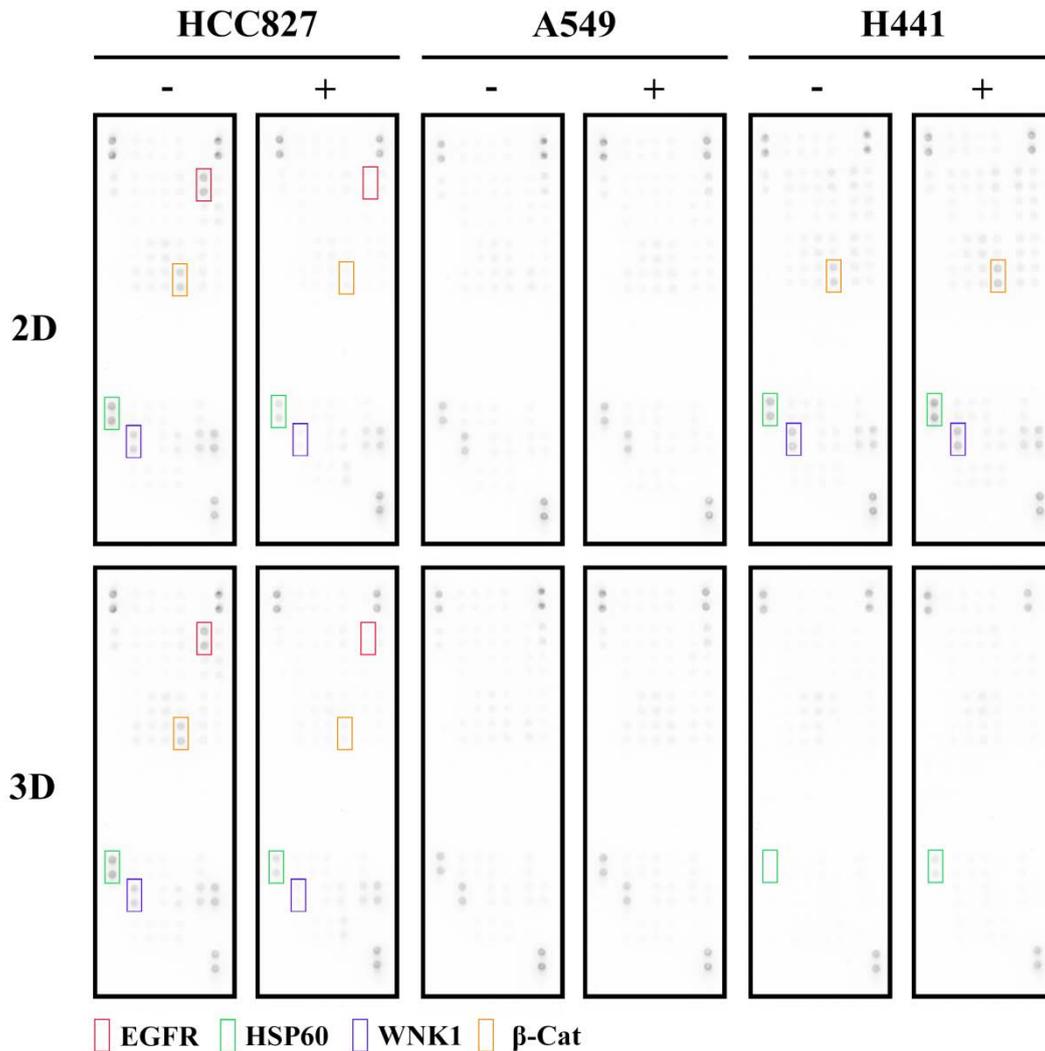


Abbildung 18: PK-Array nach Gefitinib-Behandlung in 2D und 3D

PK-Arrays der Zelllysate von HCC827-, A549- und H441-Zellen, die in 2D und 3D kultiviert und für 72 h mit 1 μ M Gefitinib behandelt (+) oder als Kontrolle verwendet (-) wurden. Die Änderungen in der Signaltransduktion waren in den auf Gefitinib ansprechenden HCC827-Zellen in 2D und 3D vergleichbar.

Zum besseren Verständnis der Antworten in dem *in vitro* Model und um neue Therapieziele für die primär Gefitinib-resistenten *KRAS*-mutierten Zelllinien A549 und H441 zu erhalten, erfolgte eine Erweiterung des bestehenden *in silico* Modells durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Dandekar (Lehrstuhl für Bioinformatik, Universität Würzburg). Dazu wurden zentrale Signalnetzwerke für Proliferation und Apoptose in

dem *in silico* Modell betrachtet und das, bereits von Stratmann *et al.* (2014) veröffentlichte, Modell mit zelllinienspezifischen Knoten erweitert. Diese umfassten spezifische Mutationen und Rezeptoraktivitäten in den jeweiligen Zelllinien. Das so generierte Modell konnte die Antworten auf eine Therapie mit Gefitinib in allen drei Zelllinien zuverlässig vorhersagen (Kunz, 2016; Daten nicht gezeigt).

Tabelle 35: Änderung der Signaltransduktion nach Gefitinib-Behandlung⁸

	HCC827		A549		H441	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D
Phospho-RTK-Array						
pEGFR	↓↓↓	↓↓	0	0	↑	↓
pErbB2	↓↓	0	0	0	0	0
pHGFR	↓↓↓	↓	0	0	↑	↑
PK-Array						
pEGFR (Y1086)	↓	↓	0	0	0	0
β-Cat	↓	↓	0	0	↑	0
pWNK-1 (T60)	↓	↓	0	0	↑	0
HSP60	↓	↓	0	0	↑	↑

⁸HCC827-, A549- und H441-Zellen wurden für 3 Tage mit 1 µM Gefitinib in 2D und 3D behandelt und anschließend die Aktivierung von Kinasen mittels Phospho-RTK- und PK-Arrays bestimmt. Kodierung: 0...keine Änderung, ↓/↑...< 10 Mio. Einheiten Unterschied, ↓↓/↑↑...≥ 10 Mio., < 50 Mio. Einheiten Unterschied, ↓↓↓/↑↑↑... ≥ 50 Mio. Einheiten Unterschied

5.2.2 Anti-HSP90-Therapie mit 17-AAG bei *KRAS*-Mutation

Nachdem die Biomarker-abhängige Therapieantwort mit dem EGFR-Inhibitor erfolgreich *in vitro* und *in silico* simuliert wurde, sollte nun das Versagen der HSP90-Inhibitor Behandlung in der Klinik in dem 3D Modell getestet werden (Bhattacharya *et al.*, 2015). Diese Therapie galt in präklinischen *in vitro* 2D und *in vivo* Mausmodellen bei *KRAS*-mutierten Tumoren als vielversprechend (Sos *et al.*, 2009; De Raedt *et al.*, 2011; Acquaviva *et al.*, 2012).

Zunächst wurden für die weitere Testung mit dem HSP90-Inhibitor 17-AAG die Konzentrationsbereiche, in dem die IC₅₀-Werte liegen, mit Hilfe des CellTiter-Glo[®] Zellviabilitätsassays in 2D bestimmt.

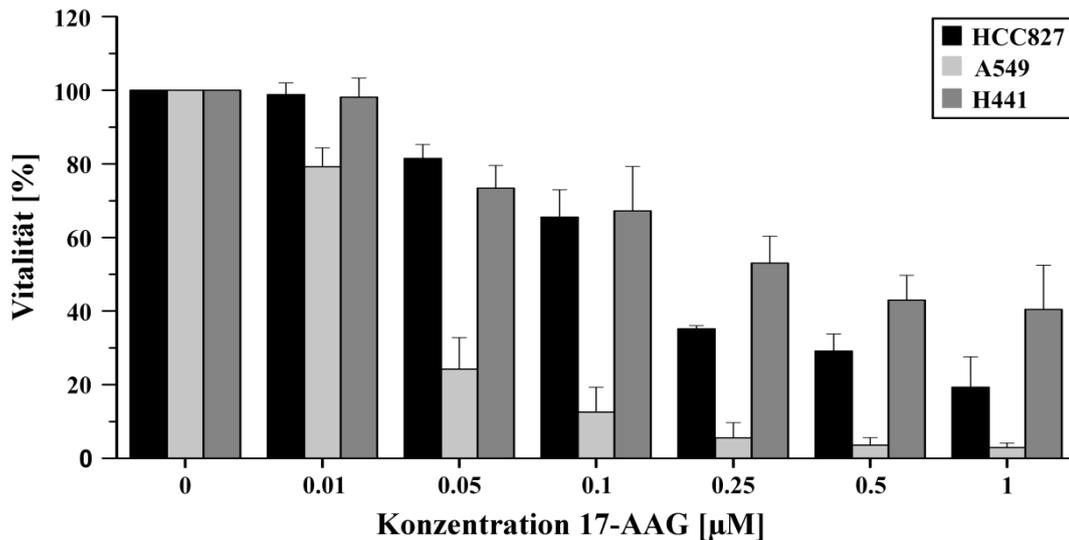


Abbildung 19: Sensitivität der Zelllinien gegenüber 17-AAG in 2D

Die Zellvitalität (RLU behandelte Zellen/RLU unbehandelte Zellen) nach 72 h Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen 17-AAG wurde mit Hilfe des CellTiter-Glo® Zellvitalitätsassays bestimmt. $n \geq 4$.

Abbildung 19 zeigt, dass der IC50-Wert der H441-Zellen im Bereich von 0,25 µM 17-AAG liegt. Diese Konzentration führte in den A549- zu einer Verringerung der Vitalität auf 5 % und in den HCC827-Zellen auf 30 %. Auch in den Phasenkontrastbildern der Behandlung mit 0,25 µM 17-AAG in 2D wird deutlich, dass die Therapie bei allen drei Zelllinien die Zellzahl reduzierte und bei den A549 die meisten Zellen starben (Abbildung 20). Im Gegensatz dazu kann man in den H&E-Färbungen der 3D Tumormodelle nach dreitägiger 17-AAG-Behandlung nur sehr geringe Effekte bei den HCC827- und den A549-Zellen erkennen (Abbildung 20). Dabei sind vor allem in den Kryptenstrukturen weniger Zellen sichtbar als ohne Behandlung. Die H441-Zellen zeigten keine Änderung im Wachstum.

Die Quantifizierung der Proliferationsinhibierung und der Apoptoseinduktion ergab ebenfalls deutlich abgeschwächte Effekte in 3D im Vergleich zu 2D (Abbildung 21). Während in der 2D Kultur eine KRAS-abhängige Antwort in Bezug auf die Hemmung der Proliferation durch den HSP90-Inhibitor vorhanden war, konnte dies in 3D nicht beobachtet werden. Die Proliferationsrate der H441-Zellen sank ausschließlich in 2D von ca. 98,4 % auf 42,5 %, blieb in 3D jedoch unverändert (Abbildung 21, A). Zusätzlich verringerte sich der Apoptoseanstieg bei den A549-Zellen von 5,7-fach in 2D auf 1,3 bis 1,9-fach in 3D (Abbildung 21, B). Bei den HCC827-Zellen war kein Unterschied

im Ansprechen auf 17-AAG zwischen 2D und 3D zu sehen, die Proliferation sank jeweils um 12 bis 13 % und die Apoptose stieg 2-fach an.

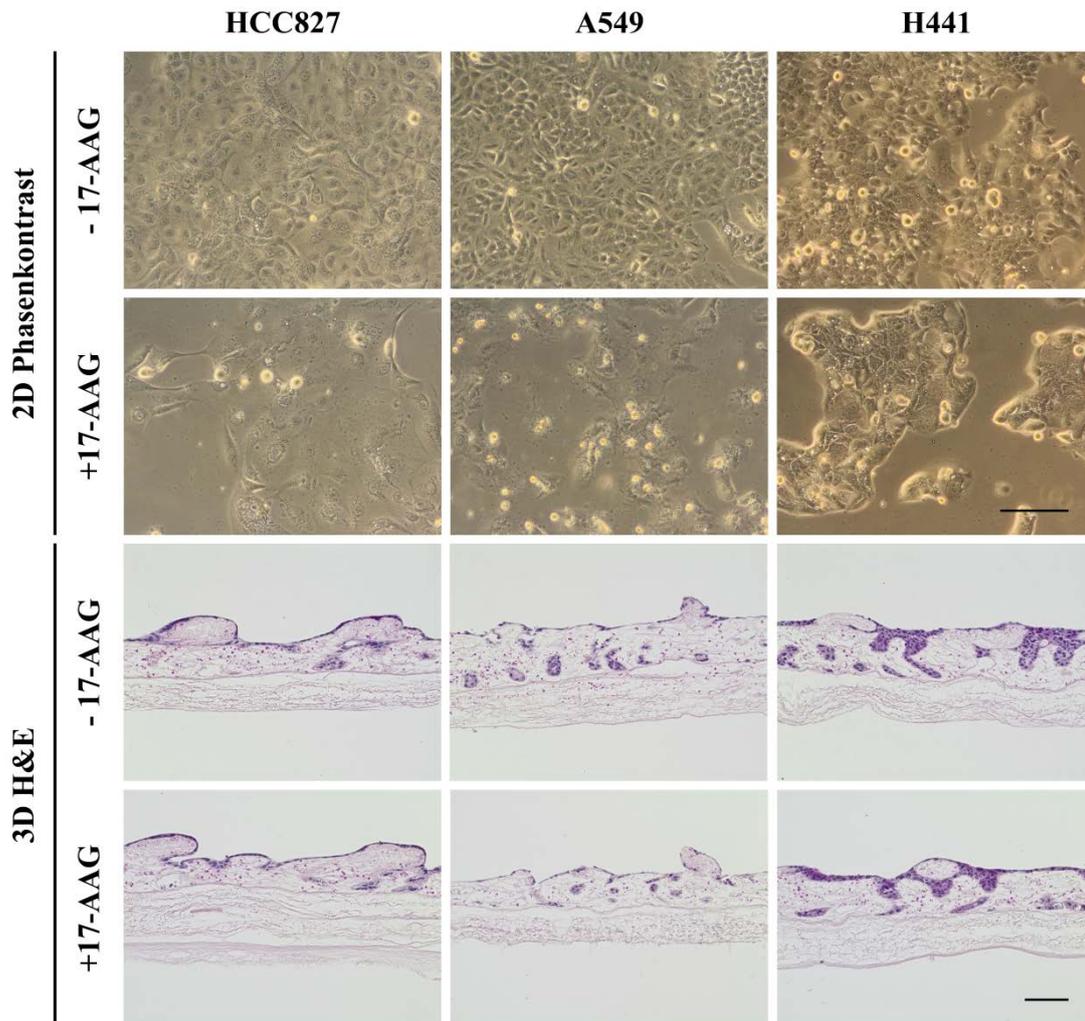


Abbildung 20: Behandlung mit dem HSP90-Inhibitor 17-AAG in 2D und 3D

HCC827-, A549- und H441-Zellen wurden in 2D sowie im 3D Tumormodell kultiviert und für 72 h mit 0,25 μ M 17-AAG behandelt. Die Untersuchung der morphologischen Änderungen erfolgte in 2D über Phasenkontrastaufnahmen, in 3D über H&E-Färbungen. Die Antwort auf die Behandlung mit dem HSP90-Inhibitor war in 3D abgeschwächt. Maßstabsbalken: 100 μ m.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden Proteinaktivierungen im Phospho-RTK-Array (Abbildung S 3), PK-Array (Abbildung S 4) und in Western Blots (Abbildung 22, Tabelle 36, Abbildung S 5) analysiert. Das Ziel war, die für die unterschiedlichen Antworten der Zellen in 2D und 3D zugrunde liegenden Mechanismen zu untersuchen. Zunächst konnten hier die Daten aus den Phospho-RTK-Arrays bezüglich einer starken Inhibierung des EGFR und des HGFR in HCC827- und H441-Zellen (2D und 3D) im Western Blot bestätigt werden.

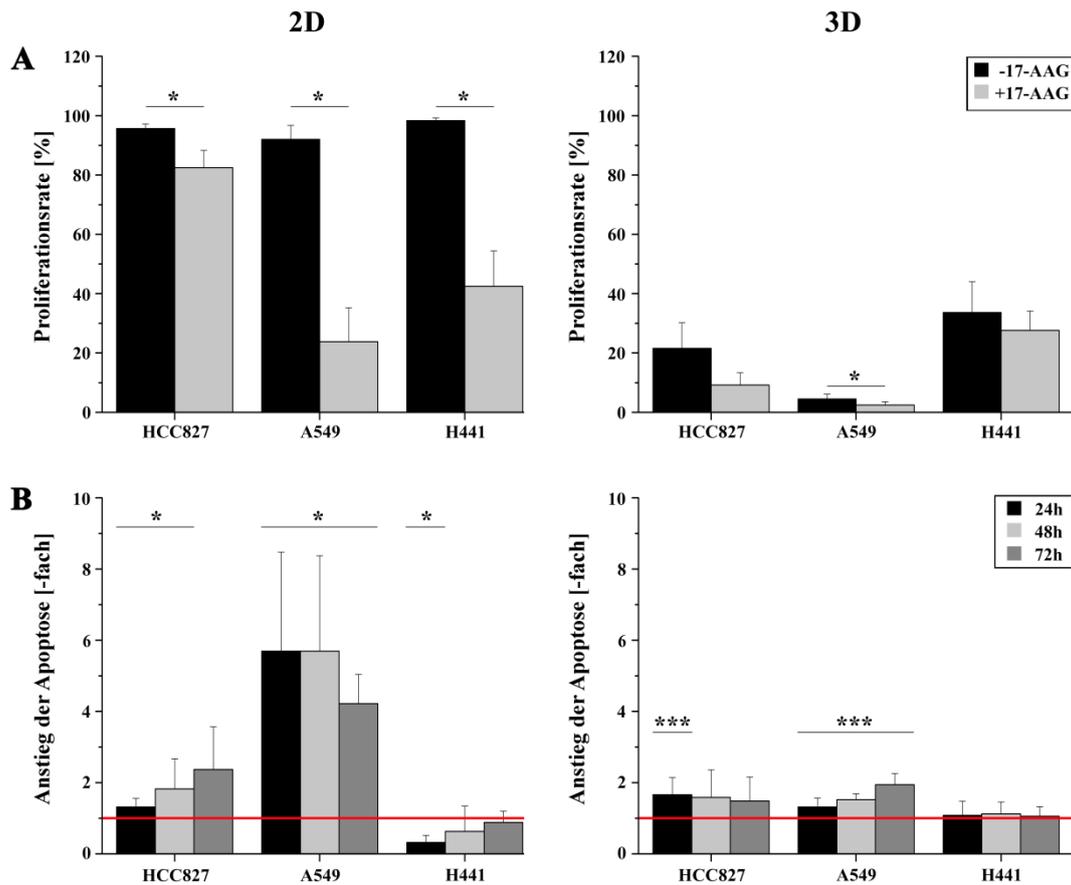


Abbildung 21: Proliferation und Apoptose nach Behandlung mit 17-AAG

A) Die Proliferationsrate wurde über eine Ki67-Immunfluoreszenzfärbung bestimmt. Dabei wurden die Ki67-positiven Zellen sowie die Gesamtzellzahl über DAPI in fünf (2D) bzw. zehn (3D) Bildern je Probe quantifiziert und anschließend der Quotient gebildet. * $p < 0.05$, $n \geq 4$. B) Der Anstieg der Apoptose wurde mit Hilfe des M30 CytoDeath™ ELISAs ermittelt. Dafür wurden Überstände der unbehandelten und behandelten Proben direkt vor (T0-Probe) sowie 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlung gesammelt. Die Konzentrationen an M30 nach der Behandlung wurden auf die jeweiligen T0-Werte normalisiert und anschließend auf die unbehandelte Kontrolle (rote Linie) bezogen. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, $n \geq 4$.

Der Western Blot in Abbildung 22 zeigt, dass die Inhibierung von HGFR in beiden Zelllinien in 3D im Vergleich zu 2D schwächer war. Zusätzlich ergaben die Western Blot Messungen verschiedene Aktivierungsänderungen von p53: In den H441-Zellen war das Signal von phospho-p53 in 2D konstant, stieg in 3D jedoch nach 17-AAG Behandlung an. In den HCC827-Zellen stellte sich dies genau umgekehrt dar: Die p53-Aktivierung war in 3D konstant, stieg jedoch in 2D an. Weiterhin konnte für die HCC827-Zellen in 2D und 3D in den Phospho-RTK-Arrays eine Inaktivierung von ErbB2, ErbB3 und c-Ret detektiert werden (Abbildung S 3). In den H441-Zellen waren ErbB2, ErbB3, *Vascular endothelial growth factor 2* (VEGFR2), phospho-Macrophage

stimulating protein receptor 1 (MSPR1) und c-Ret zusätzlich zu EGFR und HGFR in beiden Kulturbedingungen nach Behandlung schwächer aktiviert. Darüber hinaus wurden in den behandelten H441 schwächere Signale des FGFR3 in 3D detektiert als in unbehandelten Zellen.

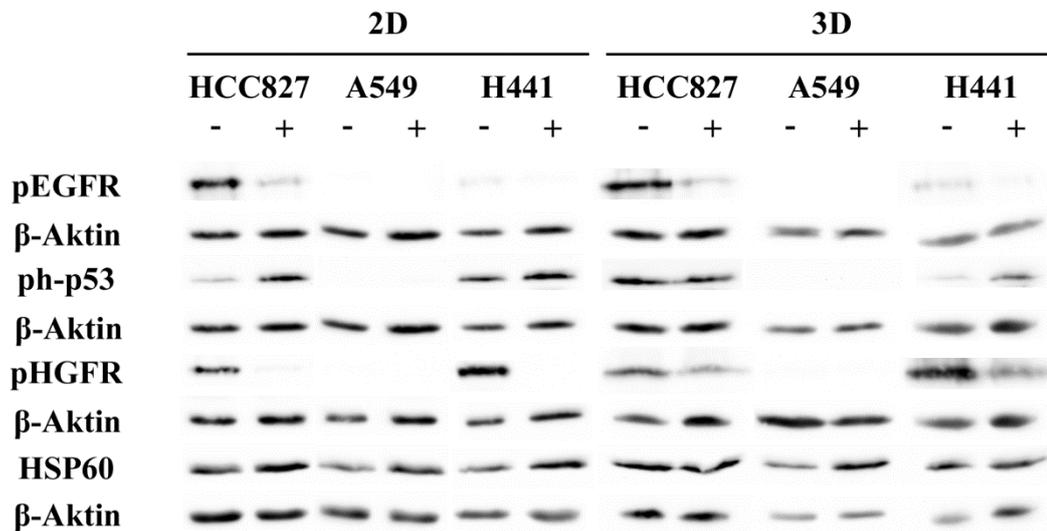


Abbildung 22: Signalwegsanalyse nach HSP90-Inhibitor-Behandlung in 2D und 3D

Western Blots von Phospho-Proteinen und den zugehörigen β -Aktin-Kontrollen. Die Zellen wurden mit 0,25 μ M 17-AAG für 24 h (2D) bzw. 72 h (3D) behandelt (+) oder als Kontrolle (-) verwendet und anschließend lysiert. Nach der Aufkonzentrierung der Proteinlysate erfolgte die Auftrennung von jeweils 27 μ g Protein mittels SDS-Gelelektrophorese und das Übertragen auf Nitrozellulose-Membranen im Semitrockenblotverfahren. Die Proteine wurden über spezifische Primärantikörper und HRP-gekoppelte Sekundärantikörper nachgewiesen, die eine Detektion über Chemilumineszenz ermöglichten. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus $n = 3$.

In den A549-Zellen konnten keine großen Unterschiede in der Signaltransduktion nach 17-AAG-Behandlung zwischen 2D und 3D beobachtet werden. Im Phospho-RTK-Array zeigte sich in 2D und 3D eine Reduktion der EGFR-Aktivierung, die sich jedoch im Western Blot nicht bestätigte. Die Quantifizierung der Western Blots aus drei unabhängigen Versuchen ist in Abbildung S 5 gezeigt.

Die Daten der PK-Arrays (Abbildung S 4) konnten in den Western Blots (Abbildung 22, Tabelle 35, Abbildung S 6) nur zum Teil reproduziert werden. So unterschieden sich die Signale von HSP60 im Western Blot von denen im PK-Array: In den Western Blots zeigte sich bei den HCC827- keine Änderung, bei den A549- ein Anstieg und bei den H441-Zellen in 2D ein Anstieg und in 3D keine Änderung des Signals. Im Gegensatz dazu wurde im PK-Array bei allen Zelllinien in 3D ein Anstieg detektiert. Aus diesem

Grund dienen die Daten der PK-Arrays nur als Trends für die bioinformatischen Simulationen. Für diese erfolgte die Erweiterung des *in silico* Modells, analog zum *EGFR*-geleiteten Modell, mit zelllinienspezifischen Knotenpunkten unter dem *KRAS*-mutierten Hintergrund. Dazu wurden die experimentellen Signalwegsdaten nach 17-AAG-Behandlung, zellspezifische Mutationen aus der COSMIC Datenbank sowie ihre Interaktionspartner aus der HPRD-Datenbank eingefügt (Kunz, 2016). Das *in silico* Modell konnte anschließend alle Antworten der Zelllinien auf die Behandlung mit 17-AAG vorhersagen (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 36: Änderung der Signaltransduktion nach Behandlung mit 17-AAG⁹

Western Blot	HCC827		A549		H441	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D
pEGFR (Y1068)	↓↓	↓↓	n.d.	n.d.	↓↓↓	↓↓↓
ph-p53 (S46)	↑↑↑	0	n.d.	n.d.	0	↑↑↑
pHGFR (Y1234/1235)	↓↓↓	↓↓	n.d.	n.d.	↓↓↓	↓↓
HSP60	0	0	↑↑	↑↑↑	↑	0

⁹HCC827-, A549- und H441-Zellen wurden mit 0,25 μ M 17-AAG in 2D und 3D behandelt und die Protein-Aktivierung sowie die Gesamtmenge an HSP60 mittels Western Blot untersucht. Qualitativ dargestellt ist der Quotient der Signalintensität von behandelten durch unbehandelte Proben. n = 3, Kodierung: n.d....nicht detektierbar, 0...0,8 \leq Quotient \leq 1,5 (konstant); ↓...0,5 \leq Quotient $<$ 0,8; ↓↓...0,2 \leq Quotient $<$ 0,5, ↓↓↓...Quotient $<$ 0,2; ↑...1,5 $<$ Quotient \leq 2; ↑↑...2 $<$ Quotient \leq 3; ↑↑↑...Quotient $>$ 3

5.3 Darstellung von fortgeschrittenen Tumorstadien

5.3.1 Induktion von EMT und Invasion durch TGF- β 1-Stimulation

Mit den im Folgenden beschriebenen Experimenten wurde untersucht, ob in dem 3D Lungentumor-Testsystem Effekte der EMT analysiert werden können. Dazu wurden die Modelle mit dem in der Literatur als Induktor für EMT beschriebenen Wachstumsfaktor TGF- β 1 stimuliert (Kim, Litzemberger, *et al.*, 2007).

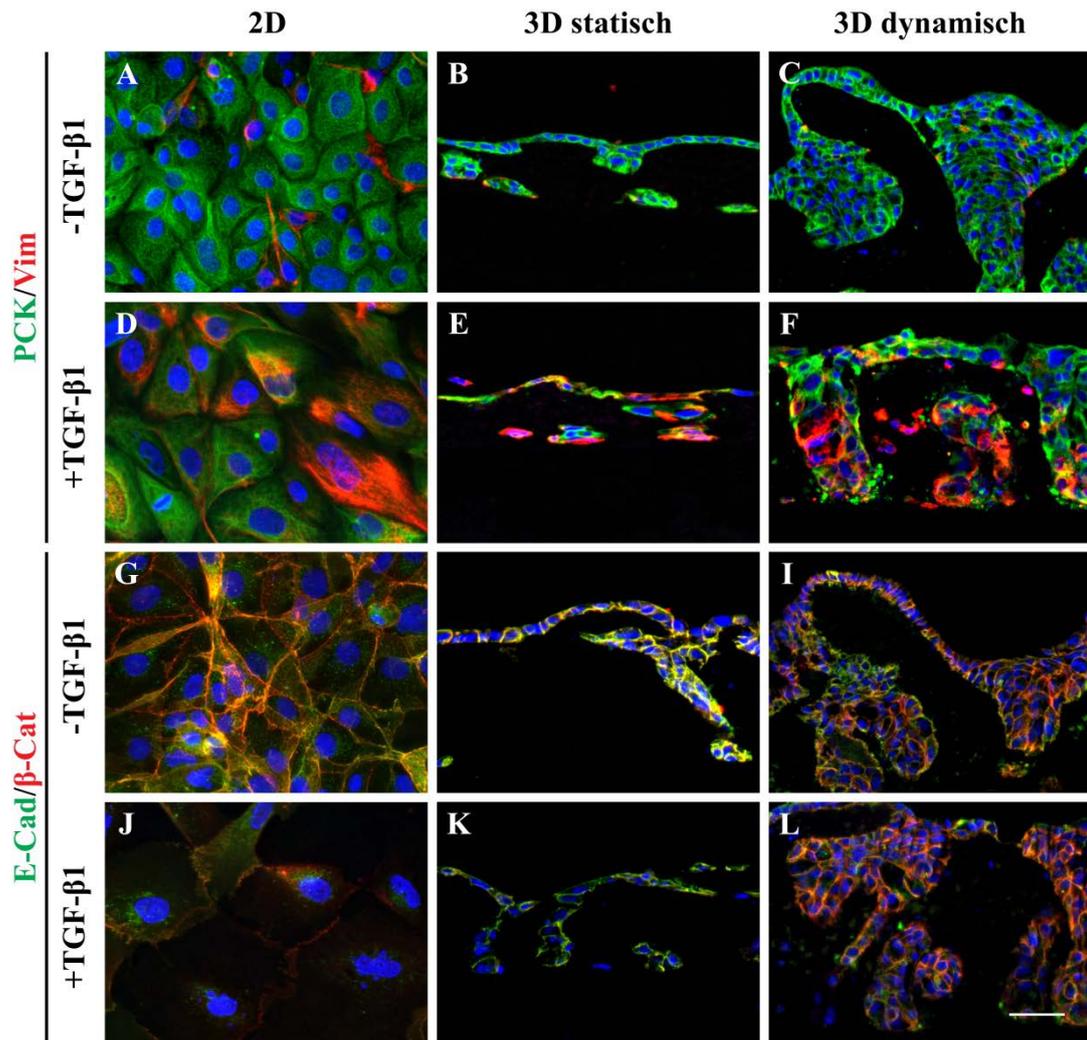


Abbildung 23: EMT-Induktion durch TGF- β 1 in HCC827-Zellen

HCC827-Zellen wurden unter 2D, 3D statischen und 3D dynamischen Bedingungen kultiviert und drei Tage mit 2 ng/ml TGF- β 1 stimuliert oder als Kontrollzellen verwendet. Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigen, dass die epithelialen Marker E-Cad und β -Cat (G–L) nach TGF- β 1-Stimulation schwächer und der mesenchymale Marker Vim (A–F) stärker exprimiert wurde. Die Expression von PCK war unverändert (A–F). Dargestellt ist jeweils die Überlagerung der beiden Kanäle sowie der Gegenfärbung mit DAPI. Maßstabsbalken: 75 μ m.

Zunächst sollte gezeigt werden, dass TGF- β 1 auch in der komplexeren Gewebestruktur des 3D Tumormodells eine EMT auslöst. Dafür mussten in einem ersten Schritt die TGF- β 1-Konzentration sowie der Zeitpunkt und die Dauer der Stimulation an das System angepasst werden. Die Vorversuche ergaben dabei eine optimale Konzentration von 2 ng/ml, eine Anwachsphase der Zellen von drei Tagen und eine anschließende kontinuierliche Stimulation bis zum Versuchsende (Schmitt, 2015).

Zwei der Zelllinien, HCC827 und A549, zeigten durch Stimulation mit 2 ng/ml TGF- β 1 Merkmale einer EMT (Abbildung 23, Abbildung 24), die bei den bereits ursprünglich mesenchymaleren A549-Zellen noch deutlicher zu detektieren waren. In den H441-Zellen ließ sich hingegen keine Veränderung zu einem mesenchymalen Phänotyp beobachten (Schmitt, 2015; Daten nicht gezeigt). In den HCC827-Zellen führte die TGF- β 1-Stimulation in 2D und im statischen 3D Modell zu einer schwächeren Expression des epithelialen Markers E-Cad sowie des Proteins β -Cat, das für Zellkontakte bedeutsam ist. Im dynamischen 3D Modell konnte kein Unterschied festgestellt werden (Abbildung 23, G–L). Beide Marker waren vor und nach der Stimulation an den Zellgrenzen kolokalisiert. In allen drei Kulturbedingungen zeigte sich in 40 bis 90 % der HCC827-Zellen nach TGF- β 1-Zugabe eine erhöhte Expression des mesenchymalen Markers Vim (Abbildung 23, A–F). Dabei waren tiefer in der Matrix gelegene Zellen häufiger Vim-positiv als die medienexponierten Zellen an der Oberfläche. PCK konnte auch nach Stimulation mit TGF- β 1 noch in allen Zellen mit einer hohen Intensität detektiert werden. Demnach waren sowohl epitheliale Zellen als auch Zellen, die eine EMT durchliefen, vorhanden.

In den A549-Zellen führte die Stimulation mit TGF- β 1 zu einer starken Änderung der Morphologie und der Ausprägung von EMT-Markern. Die Zellen waren sowohl in 2D als auch auf der Matrix langgestreckt und spindelförmig. Die Expression von E-Cad wurde nach den Ergebnissen der Färbung vollständig unterdrückt (Abbildung 24, J–L), wohingegen die Marker Vim und β -Cat in allen Zellen stärker exprimiert wurden als in der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 24). Dabei waren Hinweise auf eine zunehmende Translokation von β -Cat in den Zellkern zu beobachten (Abbildung 24, K und L, weißer Pfeil), die ohne TGF- β 1-Stimulation nur vereinzelt nachgewiesen werden konnte. Die Intensität der PCK-Färbung war jeweils unverändert (Abbildung 24, A–F).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die A549- und HCC827-Zellen durch die Stimulation mit TGF- β 1 eine EMT durchlaufen. In einem nächsten Schritt wurde untersucht, wie sich dies auf die Invasion und das Therapieansprechen auswirkt. Zunächst wurde dafür das in Stratmann *et al.* (2014) publizierte Verfahren, die in die Matrix eingewanderten Zellen zu quantifizieren, optimiert. Um die Matrixstruktur deutlich erkennen zu können und damit die in die Krypten gewanderten Zellen von denjenigen Zellen zu unterscheiden, die tatsächlich die Basallamina überquert haben, wurde die

Matrix mit einem anti-Kol IV-Antikörper angefärbt. Diese Färbung erlaubt die Identifizierung und Quantifizierung der in der Matrix lokalisierten Zellen (Abbildung 25, A).

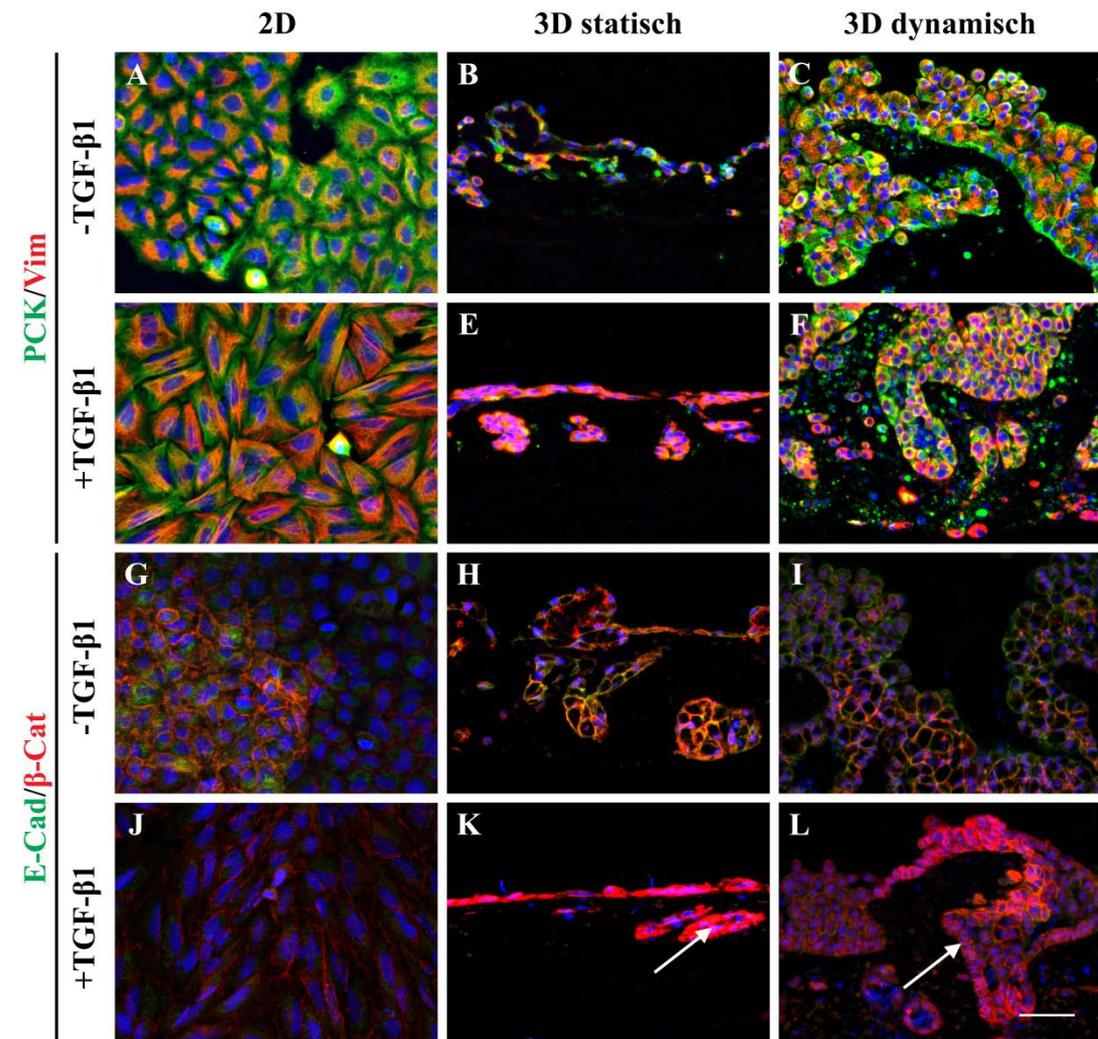


Abbildung 24: EMT-Induktion durch TGF- β 1 in A549-Zellen

A549-Zellen wurden unter 2D, 3D statischen und 3D dynamischen Bedingungen kultiviert und drei Tage mit 2 ng/ml TGF- β 1 behandelt oder als Kontrollzellen verwendet. Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigten neben der veränderten Morphologie der Zellen eine stark erhöhte Expression von Vim (A–F) sowie β -Cat (G–L) und eine vollständige Herunterregulierung von E-Cad (G–L) durch TGF- β 1. Die Signalintensität von PCK (A–F) war unverändert. Dargestellt ist jeweils die Überlagerung der beiden Kanäle sowie der Gegenfärbung mit DAPI. Maßstabsbalken: 75 μ m.

Anhand der Kol IV-Färbung zeigte sich in beiden Zelllinien sowohl in statischer als auch in dynamischer Kultur ein Anstieg der invasiven Zellen nach Stimulation mit TGF- β 1 (Abbildung 25, B). Dieser Unterschied war außer in der statischen 3D Kultur der A549-Zellen in allen Ansätzen signifikant, wobei auch hier eine deutliche Tendenz erkennbar war. Insgesamt konnten in der dynamischen Kultur mehr invasive Zellen in

der Matrix identifiziert werden als in der statischen. Dies spiegelt sich im prozentualen Anteil jedoch nicht wider, da die Gesamtzellzahl in der dynamischen Kultur ebenfalls deutlich höher war.

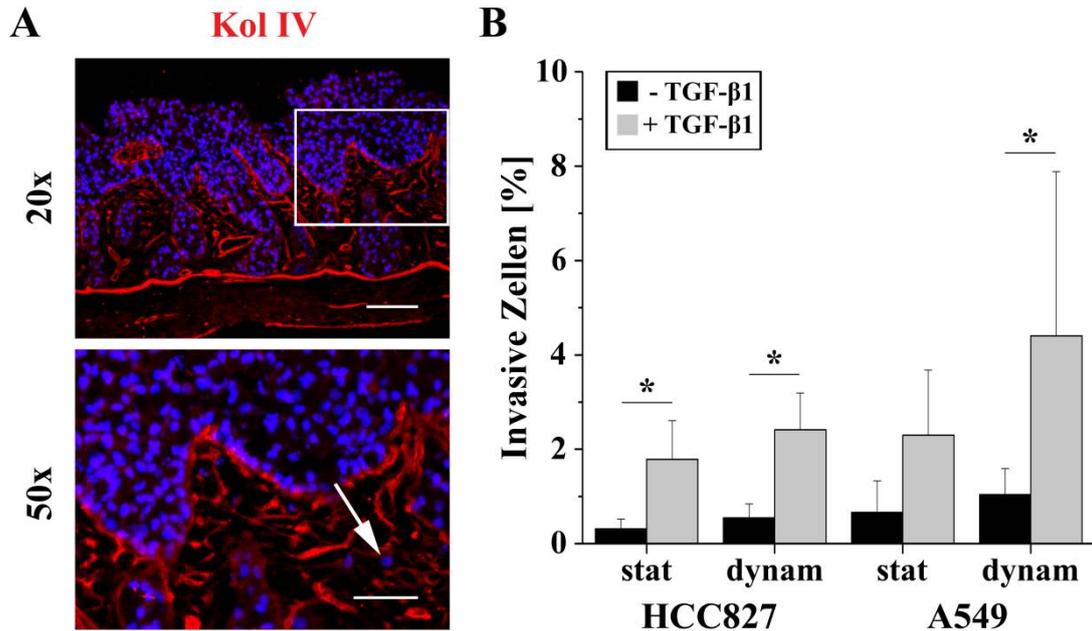


Abbildung 25: Quantifizierung der in die Matrix eingewanderten Zellen

A) Eine Kol IV-Färbung ermöglicht die Darstellung der Kryptenstrukturen und der eingewanderten Zellen (Pfeil) durch die Markierung der Basalmembranstrukturen. Gezeigt ist die Gegenfärbung mit DAPI. Maßstabsbalken 100 μm (20x) bzw. 75 μm (50x). B) Die mit DAPI gefärbten Zellkerne wurden automatisch mit Hilfe eines Makros in ImageJ quantifiziert, die in die Matrix eingewanderten Zellen manuell anhand der Kol IV-Färbung gezählt. Anschließend konnte der prozentuale Anteil an invasiven Zellen bestimmt werden. * $p < 0.05$, $n = 4$.

Nachdem die erhöhte Invasivität der mit TGF- β 1-stimulierten Zellen bestätigt wurde, sollte zusätzlich untersucht werden, ob es Hinweise auf die Degradierung der Basalmembran sowie der erhöhten Aggressivität der Tumorzellen gab. Dafür wurden auf der Grundlage von PCR-Arrays (EMT und *Lung Cancer Array*; Schmitt, 2015; Daten nicht gezeigt) gezielt qRT-PCRs durchgeführt. Die untersuchten Gene waren:

- *Serine proteinase inhibitor family E member 1 (SERPINE1)*, welches in Invasion, Metastasierung sowie epithelialer Plastizität involviert ist (Samarakoon *et al.*, 2009);
- Das Gen für die Typ IV-Kollagenase MMP9;
- *Tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI2)* und *Serine protease inhibitor Kazal-type 1 (SPINK1)*, dessen Proteine MMPs, vor allem MMP9 inhibieren;

- *Anterior gradient protein 2 homolog (AGR2)*, das unter anderem einen Einfluss auf epitheliale Barrieren hat (Brychtova *et al.*, 2015).

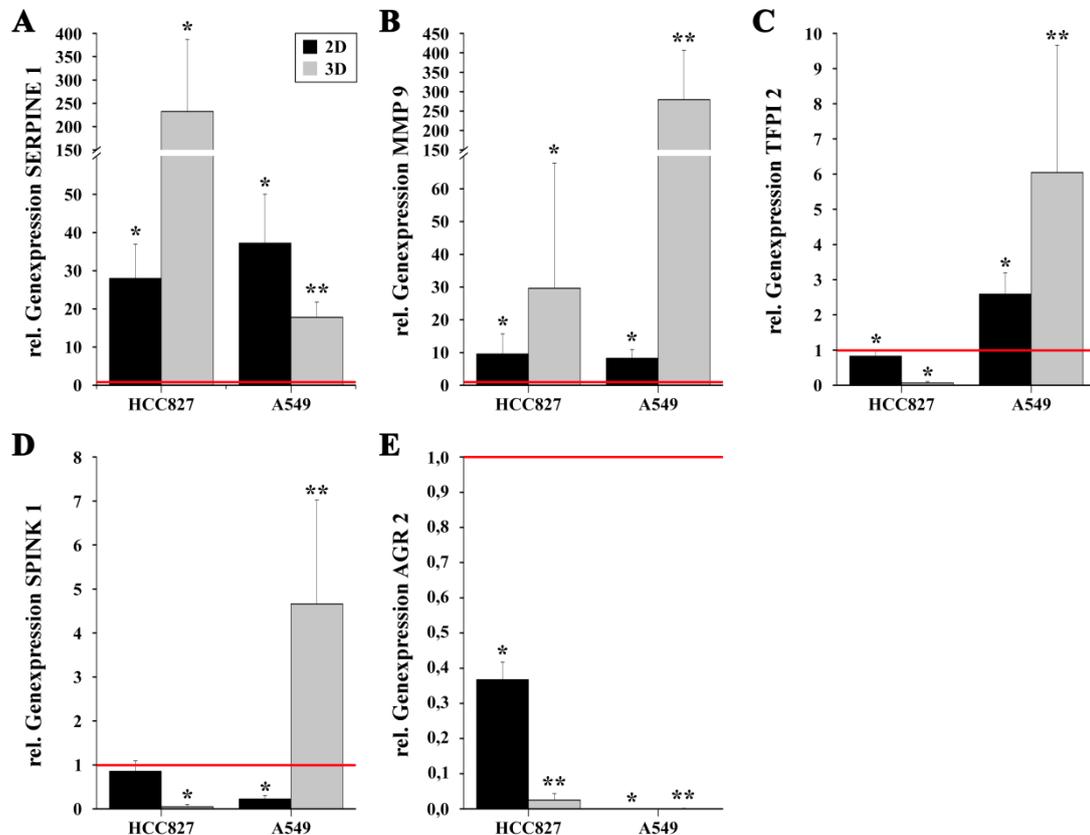


Abbildung 26: Genexpression TGF- β 1-stimulierter Tumorzellen in 2D und 3D

In 2D und 3D kultivierte HCC827- und A549-Zellen wurden drei Tage mit 2 ng/ml TGF- β 1 stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Der Nachweis von *SERPINE1*, *MMP9*, *TFPI2*, *SPINK1* und *AGR2* erfolgte über qRT-PCR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n \geq 4$.

SERPINE1 war in beiden Zelllinien nach Stimulation mit TGF- β 1 signifikant höher exprimiert als in den nicht stimulierten Kontrollen, wobei dieser Effekt in den HCC827-Zellen durch die 3D Umgebung noch verstärkt wurde. Ebenfalls konnte in beiden Zelllinien in 2D und 3D eine Induktion von MMP9 detektiert werden. Diese war in 3D bei den HCC827- dreimal und bei den A549-Zellen 25-mal so stark im Vergleich zu 2D. Weiterhin führte die TGF- β 1-Stimulation nur in den HCC827-Zellen zu einer geringeren Expression der MMP-Inhibitoren *TFPI2* und *SPINK1*. In den A549-Zellen wurden diese, außer *SPINK1* in 2D, stärker exprimiert. *AGR2* war nach Stimulation mit TGF- β 1 in beiden Zelllinien in 2D und 3D stark herunter reguliert. Zusammenfassend kann man demnach Hinweise darauf finden, dass die mit TGF- β 1-stimulierten Zellen invasiver

waren und eine Degradation der Basalmembran stattfand, durch die stellenweise Tumorzellen hindurch wandern konnten.

Da in einigen anderen Arbeiten eine erhöhte Resistenz gegenüber zielgerichteten Therapien nach EMT gezeigt worden war (Fischer *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2015), sollte auch dieser Aspekt untersucht werden. Dafür wurden die Gefitinib-sensitiven HCC827-Zellen vor der Behandlung mit dem TKI mit TGF- β 1 stimuliert und die Antwort auf das Medikament mit der nicht stimulierten, aber behandelten Kontrolle verglichen. Dabei zeigte sich in dem 3D Tumormodell keine erhöhte Resistenz gegenüber Gefitinib (Abbildung 27). In den HCC827-Zellen konnte zwar nach TGF- β 1-Stimulation eine niedrigere Proliferation in der unbehandelten Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 27, A), jedoch führte die zusätzliche Behandlung mit Gefitinib wie in der unstimulierten Kontrolle zu einer weiteren signifikanten Proliferationsinhibierung. In der Apoptoseinduktion war kein Unterschied zwischen stimulierten und nicht stimulierten Proben zu sehen (Abbildung 27, B).

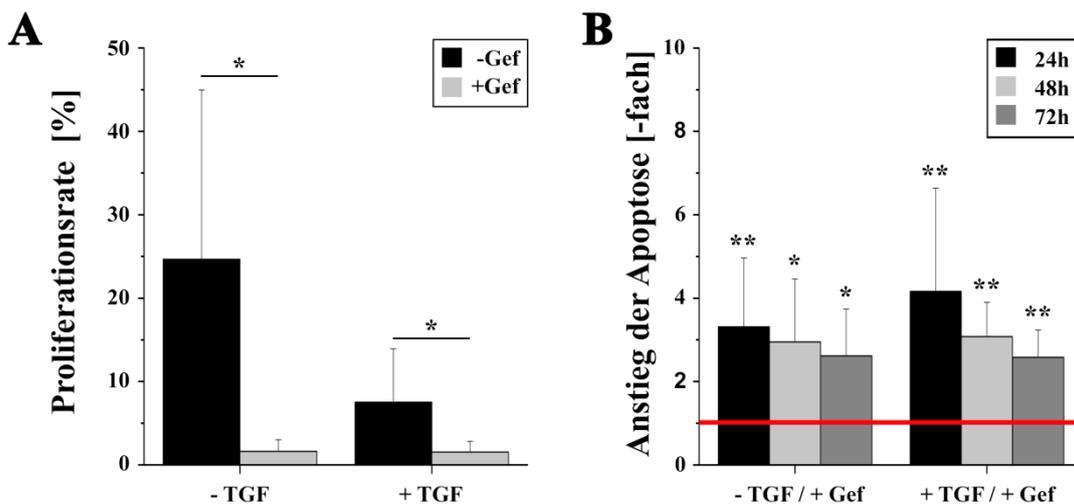


Abbildung 27: Gefitinib-Behandlung von TGF- β 1-stimulierten HCC827-Zellen

Die Bestimmung der Proliferationsrate und des Apoptoseanstiegs zeigte keine Resistenz gegenüber Gefitinib in den 3D kultivierten HCC827-Zellen mit EMT-Phänotyp. A) Die Proliferationsrate 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. * $p < 0.05$, $n = 4$. B) Der Anstieg der Apoptose wurde mit Hilfe des M30 CytoDeathTM ELISAs bestimmt. Dafür wurden Überstände der unbehandelten und behandelten Proben direkt vor (T0-Probe) sowie 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlung gesammelt. Die Konzentrationen an M30 nach der Behandlung wurden auf die jeweiligen T0-Werte normalisiert und anschließend auf die jeweils unbehandelten Proben (rote Linie) bezogen. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n = 6$.

5.3.2 Charakterisierung von Gefitinib-resistenten Subpopulationen

TKI wie Gefitinib und Erlotinib sind in der klinischen Anwendung im NSCLC durch gute Erfolge gekennzeichnet. Viele Patienten, die zunächst gut auf die EGFR-Inhibitoren ansprechen, zeigen jedoch innerhalb von neun bis 14 Monaten nach Therapiebeginn eine Progression der Erkrankung (Jackman *et al.*, 2006; Maemondo *et al.*, 2010). Ursache dafür sind Resistenzentwicklungen.

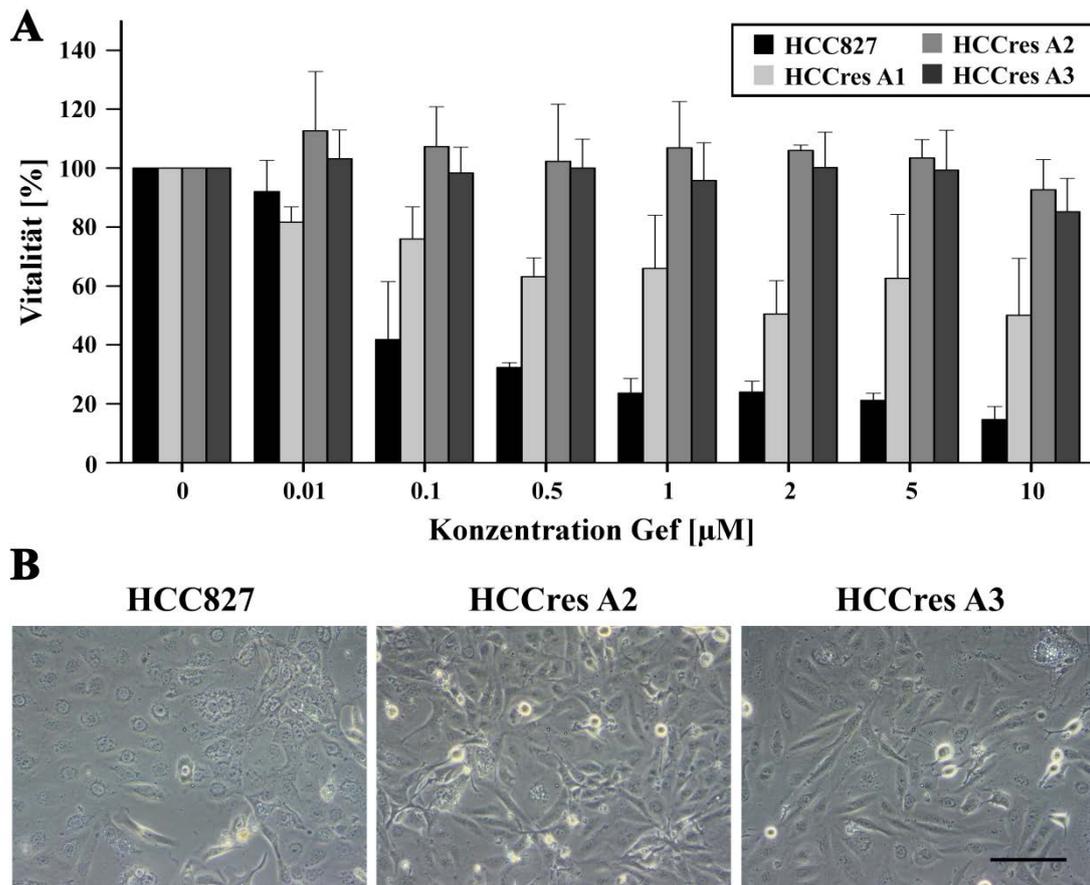


Abbildung 28: Resistenzentwicklung in HCC827-Subpopulationen

In zwei von drei Ansätzen konnte durch kontinuierliche Behandlung der HCC827-Zellen mit Gefitinib eine Resistenz induziert werden. A) Die Zellvitalität (RLU behandelte Zellen/RLU unbehandelte Zellen) wurde mit Hilfe des CellTiter-Glo[®] Zellvitalitätsassays bestimmt. $n \geq 3$. Gef: Gefitinib. B) Phasenkontrastaufnahmen der resistenten Subpopulationen HCCres A2 und HCCres A3 sowie der Ursprungslinie HCC827. Maßstabsbalken: 100 µM.

Zur Darstellung dieser Resistenzbildung in dem 3D Modell, sollte zunächst eine Gefitinib-resistente Subpopulation aus der sensitiven Zelllinie HCC827 generiert und anschließend charakterisiert werden. Dafür wurden die HCC827-Zellen durch die stetige Zugabe von 1 µM Gefitinib dauerhaft einem Selektionsdruck ausgesetzt. Dieser führte

dazu, dass Gefitinib-sensitive Zellen starben und nur die resistenten vital waren. Die Einschätzung der entwickelten Resistenz erfolgte mit Hilfe des CellTiter-Glo® Zellvitalitätsassays. Dafür wurden drei verschiedene Ansätze (nachfolgend HCCres A1, HCCres A2 und HCCres A3 genannt) mit der HCC827-Zelllinie verglichen (Abbildung 28). Es zeigte sich, dass zwei der drei Subpopulationen (HCCres A2 und HCCres A3) resistent geworden und selbst bei einer Konzentration von 5 μM Gefitinib noch zu 100 % vital waren. Erst bei 10 μM sank die Vitalität in den HCCres A2 auf 93 % und bei den HCCres A3 auf 85 %. Die sensitiven HCC827-Zellen erreichten bereits zwischen 0,01 und 0,1 μM den IC50-Wert. Die Subpopulation HCCres A1 war bei 1 μM Gefitinib nur zu 66 % vital und wurde deshalb nicht weiter verwendet.

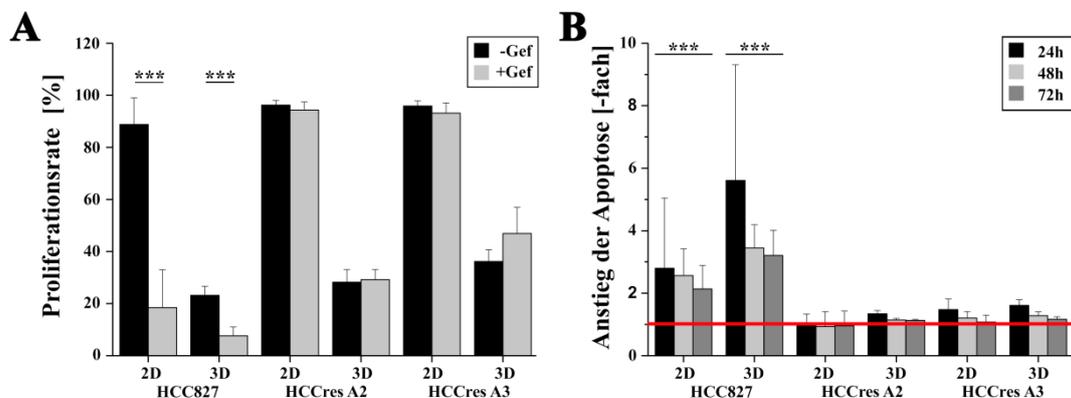


Abbildung 29: Proliferation und Apoptose in den resistenten Subpopulationen

In den resistenten Subpopulationen konnte nach Behandlung mit Gefitinib keine Proliferationsinhibition und Apoptoseinduktion nachgewiesen werden. A) Die Bestimmung der Proliferationsrate erfolgte über eine Ki67-Immunfluoreszenzfärbung. Dabei wurden die Ki67-positiven Zellen sowie die Gesamtzellzahl über DAPI in fünf (2D) bzw. zehn (3D) Bildern je Probe quantifiziert und anschließend der Quotient gebildet. *** $p < 0.001$, $n \geq 4$. Gef: Gefitinib B) Der Anstieg der Apoptose wurde mit Hilfe des M30 CytoDeath™ ELISAs quantifiziert. Dafür wurden Überstände der unbehandelten und behandelten Proben direkt vor (T0-Probe) sowie 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlung gesammelt. Die Konzentrationen an M30 nach der Behandlung wurden auf die jeweiligen T0-Werte normalisiert und anschließend auf die unbehandelte Kontrolle (rote Linie) bezogen. *** $p < 0.001$, $n \geq 5$.

Die beiden resistenten Subpopulationen HCCres A2 und HCCres A3 wurden im Folgenden auf die Proliferationsinhibition und Apoptoseinduktion durch Gefitinib-Zugabe getestet. Die sensitiven HCC827-Zellen dienten in jedem Versuch als Positivkontrolle. Sowohl in 2D als auch in 3D zeigte sich, dass beide Subpopulationen resistent waren: Weder eine Verringerung der Proliferationsrate (Abbildung 29, A) noch ein Anstieg der Apoptose (Abbildung 29, B) konnten beobachtet werden.

Wie bereits einleitend beschrieben, sind für die Entstehung von Resistenzen nach TKI-Gabe verschiedene Sekundärmutationen als ursächlich beschrieben. Eine Sequenzierung der hier etablierten resistenten Subpopulationen sollte deshalb zeigen, ob diese Zellen eine der bekannten Mutationen besitzen. Die Sequenzierung erfolgte in der Arbeitsgruppe von Dr. Simone Rost in der Abteilung der Humangenetik, Universität Würzburg. Die Sequenzierungsdaten wurden anschließend in der Arbeitsgruppe von Prof. Dandekar am Lehrstuhl für Bioinformatik, Universität Würzburg, mit Hilfe von GensearchNGS ausgewertet (Wolf *et al.*, 2015). Dabei zeigte sich zunächst in allen drei Zellpopulationen, HCC827, HCCres A2 und A3, eine Deletion von 15 Basen im Exon 19 der Tyrosin-Kinase-Domäne des *EGFR*. In der Subpopulation HCCres A2 sind zudem größere Regionen der Chromosomen 11 und 17 stark dupliziert. Weiterhin wurden 193 klinisch relevante Mutationen entdeckt, die in beiden resistenten Subpopulationen, jedoch nicht in den ursprünglichen HCC827-Zellen auftreten. Zusätzlich konnten 613 Mutationen in den HCCres A2 und 473 zusätzliche Mutationen in den HCCres A3 nachgewiesen werden. Dabei war jedoch keine der bereits beschriebenen Mutationen als kausal für die Entstehung der Gefitinib-Resistenz verantwortlich. Tabelle 37 zeigt die Mutationen, die in der ClinVar Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) als pathogen eingestuft sind. Darunter finden sich drei Mutationen, die in beiden resistenten Subpopulationen, jedoch nicht in den sensitiven HCC827-Zellen vorkamen.

Tabelle 37: Mutationen der resistenten Subpopulationen im Vergleich zu HCC827

in HCCres A2 und A3	zusätzlich in HCCres A2	zusätzlich in HCCres A3
SOX17 Missense c.775T>A, p.Y259N	FCGR3B Missense c.194A>G, p.N65S	CTH Missense c.1208G>T, p.S403I
SAA1 Missense c.209C>T, p.A70V		CYP4V2 Missense c.64C>G, p.L22V
CYP2B6 Missense c.785A>G, p.K262R		PRSS1 Missense c.86A>T, p.A29I

Die in der Literatur beschriebene veränderte Expression von miRNAs in Tumoren ist ein weiterer Mechanismus, der Ursache einer Resistenzentwicklung sein kann (Garofalo *et al.*, 2011; Gomez *et al.*, 2013). Die bei Lungenkrebs häufig überexprimierte miRNA-21, ist mit einer Progression der Erkrankung und einer schlechten Prognose verbunden (Hatley *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2014). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit unter-

sucht, ob diese miRNA in den sekundär resistenten Zellen überexprimiert ist. Dabei war jedoch kein Unterschied in der Expression der miRNA-21 zwischen den resistenten und den sensitiven Zellen festzustellen (Abbildung 30).

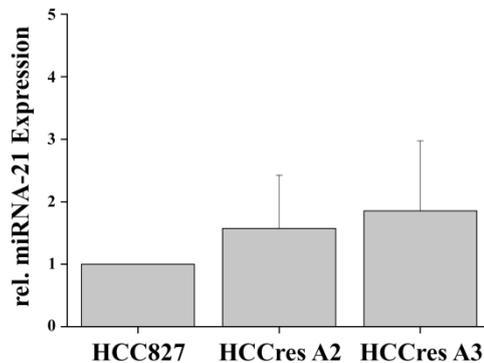


Abbildung 30: MiRNA-21-Expression in den resistenten Subpopulationen

Die miRNA-21-Expression war in den resistenten Subpopulationen im Vergleich zur Gefitinib-sensitiven Zelllinie HCC827 unverändert. Die miRNA-21 wurde mit Hilfe des *TaqMan*[®] *miRNA ABC Purification Kit* aus den in 2D kultivierten HCC827- und den resistenten Zellen isoliert und mit dem *TaqMan*[®] *Micro RNA Reverse Transcription Kit* für die Analyse im *TaqMan*[®] *MicroRNA Assay* vorbereitet. Als Referenz zur Quantifizierung der miRNA-21 wurden U6 und RNU44 verwendet. n = 3.

Da weder eine bisher in der Literatur beschriebene Mutation noch eine Erhöhung der miRNA-21 Ursachen der Resistenz zu sein schienen, erfolgte die weitere Charakterisierung der HCCres A2 und HCCres A3. Dafür wurden die Morphologie der Zellen sowie die Expression von EMT- und Tumormarkern betrachtet, wobei sich erhebliche Unterschiede zwischen den resistenten und sensitiven Zellen zeigten (Abbildung 31).

Während die ursprünglichen HCC827-Zellen eine starke Expression epithelialer Marker wie PCK und E-Cad sowie des kolokalisierten β -Cat aufwiesen, waren diese in den resistenten Subpopulationen stark herunterreguliert: In der Färbung waren PCK schwach (Abbildung 31, A–F), E-Cad und β -Cat nicht detektierbar (Abbildung 31, G–L). Im Gegensatz dazu war der mesenchymale Marker Vim in den HCCres A2 und HCCres A3 in allen Zellen sehr stark exprimiert (Abbildung 31, A–F). Damit korrelierte auch der langgestreckte, spindelförmige Phänotyp, der in 2D in der Vim-Färbung (Abbildung 31, B–C) und in 3D in den REM-Aufnahmen (Abbildung 32, weiße Pfeile) deutlich sichtbar ist.

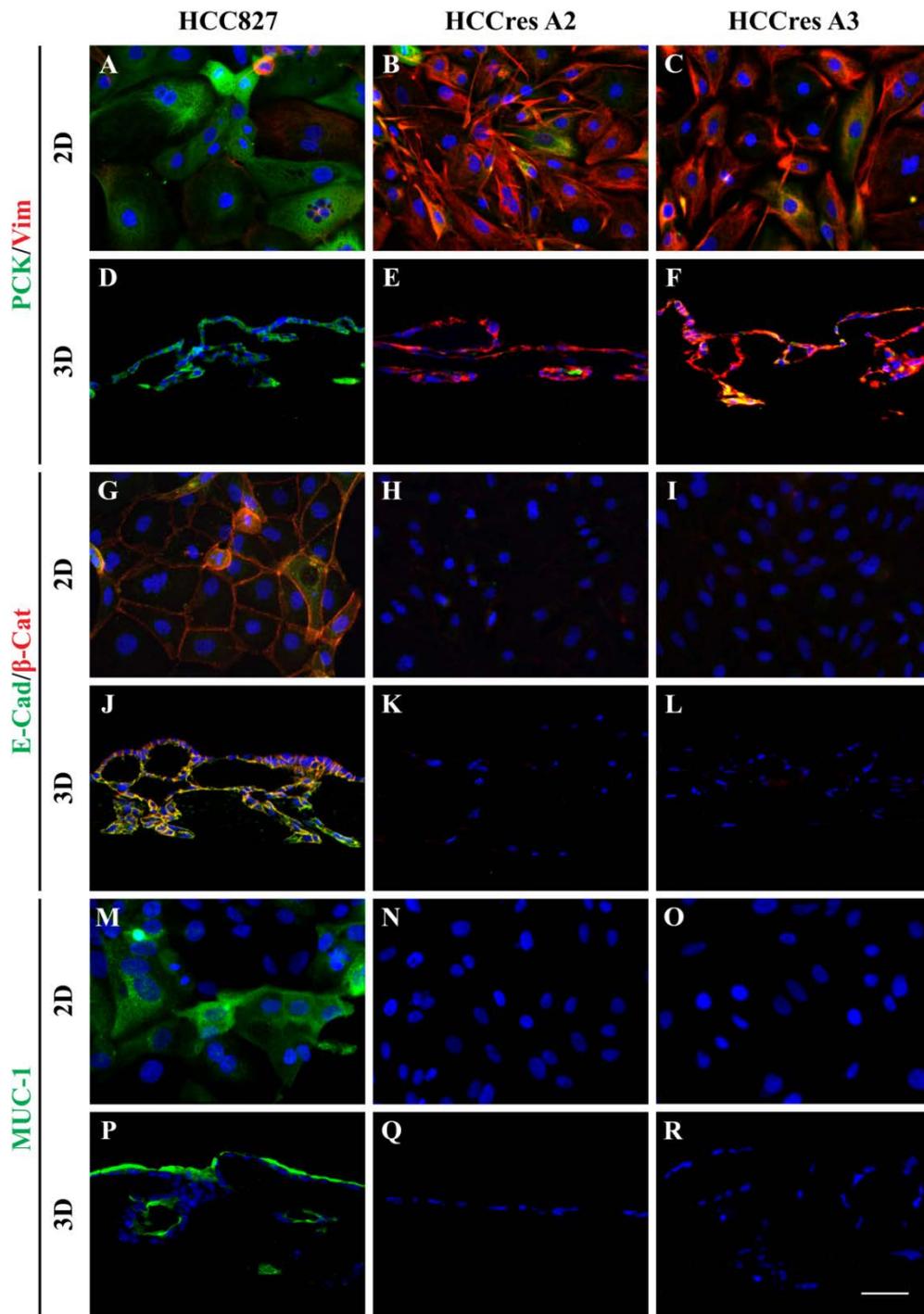


Abbildung 31: Markerexpression der HCCres A2 und A3 im Vergleich zu HCC827

Die resistenten Zellsubpopulationen zeigen im Vergleich zu der Gefitinib-sensitiven Zelllinie HCC827 eine unterschiedliche Markerexpression. Die epithelialen Marker E-Cad/ β -Cat (G–L) sowie PCK (A–F) wurden in den resistenten Zellen nicht mehr bzw. schwächer exprimiert, wohingegen eine stärkere Färbung von Vim (A–F) detektierbar war. MUC-1 (M–R) konnte nur in den ursprünglichen HCC827-Zellen nachgewiesen werden. Gezeigt sind jeweils die Überlagerungen der zwei Kanäle sowie der Gegenfärbung mit DAPI. Maßstabsbalken: 75 μ m.

Die REM-Aufnahmen zeigen auch, dass die resistenten HCC keine geschlossenen Monolayer ausbildeten und viele Löcher im Zellrasen zu finden sind, während die sensitiven HCC827-Zellen eine über die gesamte Matrix geschlossene Zellschicht ausbildeten. Dies war neben der geringeren Expression epithelialer Proteine und höheren Expression des mesenchymalen Markers ein weiterer Hinweis darauf, dass die resistenten Zellen eine EMT durchliefen und nicht mehr so starke Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Kontakte ausbildeten. Interessanterweise konnte MUC-1 in den resistenten HCC nicht detektiert werden. Ursache dafür könnte eine fehlerhafte Synthese sein, da sich in den Sequenzierungsdaten der HCCres A2 und HCCres A3 zahlreiche Mutationen in den *Mucin*-Genen finden ließen (Daten nicht gezeigt).

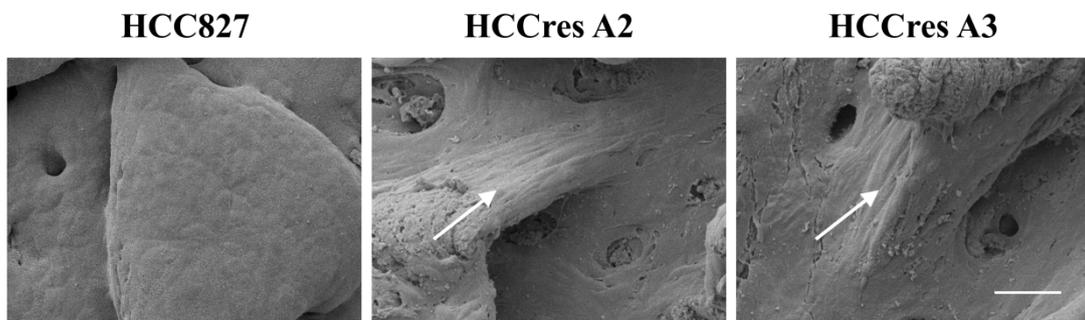


Abbildung 32: Morphologie der resistenten Zellen

Die resistenten Zellen zeigen eine spindelförmige Morphologie ohne die Ausbildung eines geschlossenen Monolayers auf der SISmuc. REM-Aufnahmen von HCC827-Zellen und den resistenten-Subpopulationen HCCres A2 und HCCres A3. Maßstabsbalken: 50 μ m.

In einem nächsten Schritt, sollte untersucht werden, welche Unterschiede es in der Signaltransduktion in den resistenten HCC im Vergleich zur ursprünglichen HCC827-Zelllinie gibt. Dafür wurden, auf Grundlage von phospho-RTK- und PK-Array-Daten (Daten nicht gezeigt), Western Blots durchgeführt. Während in allen drei Zellpopulationen in 2D und 3D nach Behandlung mit Gefitinib der EGFR stark inaktiviert war, gab es wesentliche Unterschiede in den phospho-Proteinkonzentrationen von HGFR und der nachgeschalteten Proteine Akt und Erk1/2 (Abbildung 33, Tabelle 38, Abbildung S 6). Bei den HCCres A2 war nach Gefitinib-Behandlung die Aktivierung des HGFR weniger stark herunter reguliert und auch die Signaltransduktion über Erk1/2 war nicht so stark inhibiert wie bei den sensitiven HCC827-Zellen. Die schwächere Inaktivierung von Erk1/2 war noch deutlicher bei den HCCres A3 in 2D zu detektieren. Jedoch konnte in dieser Subpopulation in 3D kein Unterschied zwischen unbehandelten und behandel-

ten Zellen in der Erk1/2-Signalübermittlung festgestellt werden. Zusätzlich konnte in den HCCres A3 in 2D und 3D aber eine schwächere Inaktivierung von Akt im Vergleich zu den ursprünglichen HCC827-Zellen beobachtet werden.

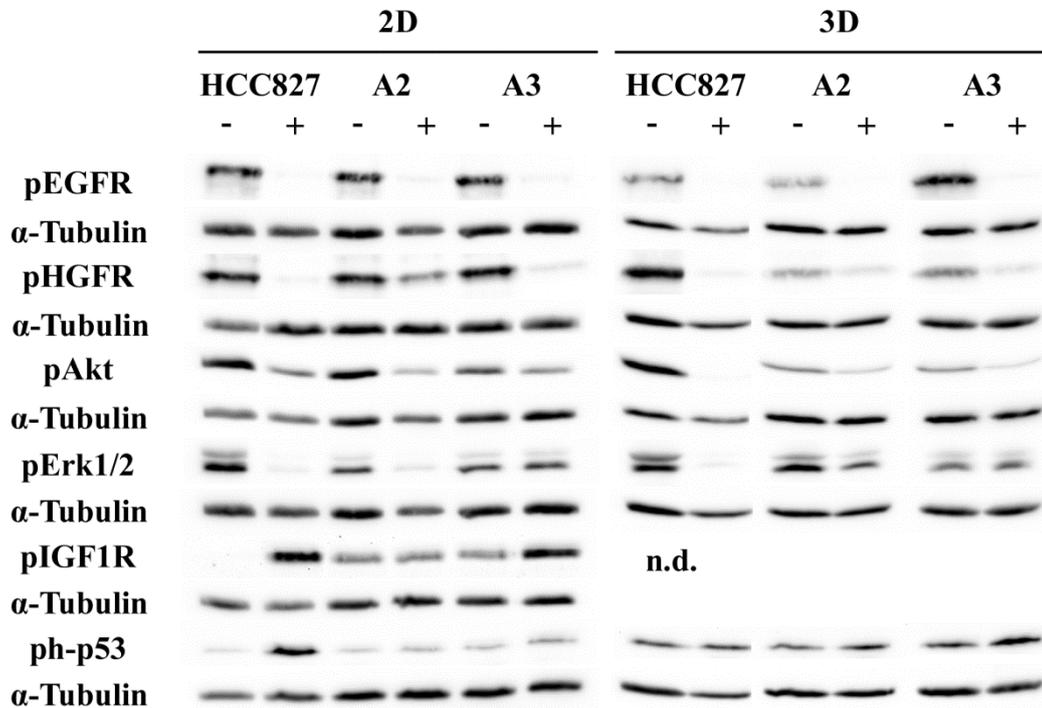


Abbildung 33: Signalwegsanalyse der Gefitinib-resistenten Subpopulationen

Western Blots von Phospho-Proteinen und den zugehörigen α -Tubulin Kontrollen der HCC827 sowie der Gefitinib-resistenten Subpopulationen A2 und A3 nach Behandlung mit $1 \mu\text{M}$ Gefitinib. Die Zellen wurden mit $1 \mu\text{M}$ Gefitinib für 24 h (2D) bzw. 72 h (3D) behandelt und anschließend lysiert. Nach der Aufkonzentrierung der Proteinlysate erfolgte die Auftrennung von jeweils $27 \mu\text{g}$ Protein mittels SDS-Gelelektrophorese und das Übertragen auf Nitrozellulosemembranen im Semitrockenblotverfahren. Die Proteine wurden über spezifische Primärantikörper und HRP-gekoppelte Sekundärantikörper nachgewiesen, die eine Detektion über Chemilumineszenz ermöglichten. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus $n = 3$ (2D), $n = 1$ (3D).

Die Änderungen der Signaltransduktion von IGF1R und p53 zeigten jeweils die gleichen Tendenzen. Während in den HCC827 nach Behandlung in 2D die Konzentrationen beider phospho-Proteine stark erhöht waren, konnte in den HCCres A3 nur eine schwache Erhöhung und in den HCCres A2 keine Änderung detektiert werden. In 3D stiegen die phospho-p53-Konzentrationen in allen drei Populationen nur leicht an. Phospho-IGF1R wurde nicht nachgewiesen.

Zusammenfassend konnten einige Unterschiede in der Morphologie, der Markerexpression sowie der Signaltransduktion zwischen den Gefitinib-sensitiven HCC827-Zellen

und den daraus generierten resistenten Subpopulationen gezeigt werden. Diese Unterschiede sowie die Ergebnisse aus den Sequenzierungen sollen nun als Grundlage für bioinformatische Netzwerke und Simulationen dienen, um die zu Grunde liegenden Mechanismen zu verstehen und mögliche Therapiestrategien bei auftretenden Sekundärresistenzen zu entwickeln. Diese Strategien können dann wiederum in den *in vitro* Modellen getestet werden.

Tabelle 38: Änderung der Signaltransduktion in den resistenten Zellen¹⁰

Western Blot	HCC827		HCCres A2		HCCres A3	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D
pEGFR (Y1068)	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
pHGFR (Y1234/1235)	↓↓↓	↓↓↓	↓	↓↓	↓↓↓	↓↓
pAkt (S473)	↓↓	↓↓↓	↓↓	↓↓	↓	↓↓
pERK1/2 (T202/Y204)	↓↓↓	↓↓↓	↓↓	↓	↓	0
pIGF1R (Y1135/1136, Y1150/1151)	↑↑↑	n.d.	0	n.d.	↑	n.d.
ph-p53 (S46)	↑↑↑	↑	0	↑	↑	↑

¹⁰ HCC827-Zellen und die daraus generierten resistenten Subpopulationen wurden mit 1 μ M Gefitinib behandelt und anschließend die Änderung der Signaltransduktion mittels Western Blot untersucht. Dargestellt ist der Quotient der Signalintensität von behandelten durch unbehandelte Proben. 2D: n = 3, 3D: n = 1 Kodierung: 0...0,8 \leq Quotient \leq 1,5 (konstant); ↓...0,5 \leq Quotient $<$ 0,8; ↓↓...0,2 \leq Quotient $<$ 0,5; ↓↓↓...Quotient $<$ 0,2; ↑...1,5 $<$ Quotient \leq 2; ↑↑...2 $<$ Quotient \leq 3; ↑↑↑...Quotient $>$ 3; n.d....nicht detektierbar

5.4 Testung alternativer Therapiestrategien im 3D Tumormodell

Eine neuartige Therapiestrategie im Kampf gegen Krebs ist die Behandlung mit gentechnisch modifizierten T-Zellen, die einen chimären Antigen Rezeptor (CAR) exprimieren. Derzeit besteht ein Bedarf darin, diese Therapie von hämatologischen auf solide Tumore zu übertragen (Newick *et al.*, 2016; Zhang, Qin, *et al.*, 2016). Da viele 2D und 3D *in vitro* Modelle wichtige Aspekte, wie zum Beispiel eine komplexe Gewearchitektur und eine Perfusion vernachlässigen, sollte überprüft werden, ob das entwickelte 3D Lungentumor-Modell für eine Testung von CAR T-Zell-basierten Therapien geeignet ist. Dafür wurden die im Labor von Dr. Michael Hudecek generierten ROR1-CAR T-Zellen für die Therapie von A549-Tumormodellen verwendet. Nachdem bestätigt werden konnte, dass die A549-Zellen in 2D und 3D Kultur das Antigen ROR1 exprimieren

(Daten nicht gezeigt), sollte der Effekt der CAR T-Zellen zunächst im statischen Tumormodell nachgewiesen werden. Hier konnte beobachtet werden, dass sowohl die ROR1-CAR als auch die Kontroll-T-Zellen (KT-Zellen) in Abhängigkeit der zugegebenen Dosis in die Matrix einwanderten (Abbildung S 7, A–G) und dort mit den Tumorzellen interagierten (Abbildung S 7, H und I). Die Apoptosemessung über den M30 Cytodeath™ ELISA zeigte nur nach Zugabe der ROR1-CAR T-Zellen einen dosisabhängigen Anstieg (Abbildung S 8). Die KT-Zellen lösten hingegen keine Apoptose in den Tumorzellen aus.

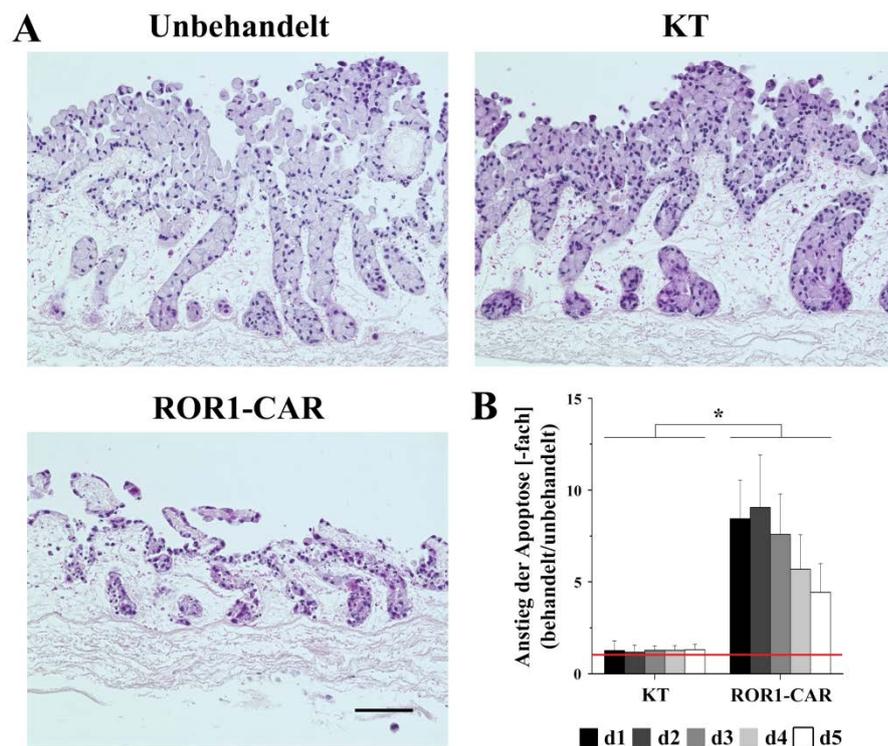


Abbildung 34: Behandlung mit ROR1-CAR T-Zellen im Bioreaktor

Die dynamischen Tumormodelle wurden 14 Tage lang kultiviert und danach fünf Tage mit untransduzierten KT-Zellen (KT) oder ROR1-spezifischen CAR T-Zellen (ROR1-CAR) behandelt. A) H&E-Färbung. Maßstabsbalken: 100 μ m. B) Während der Behandlung konnten Proben über den Probenentnahmeanschluss des Bioreaktorsystems genommen werden. Die Apoptosemessung erfolgte mit Hilfe des M30 CytoDeath™ ELISAs. Die Konzentrationen an M30 nach der Behandlung mit ROR1-spezifischen CAR T-Zellen bzw. KT-Zellen wurden auf die jeweiligen T0-Werte normalisiert und anschließend auf die unbehandelte Kontrolle (rote Linie) bezogen. * $p < 0.05$, $n = 4$.

Nach diesen ersten Versuchen sollten die T-Zellen unter Bedingungen getestet werden, die sich den physiologischen Therapiebedingungen im Menschen annähern. Dazu wurden die Experimente unter dynamischen Bedingungen im Flussreaktor durchgeführt, um

eine Blutzirkulation zu simulieren. Die T-Zellen wurden in das Medienreservoir appliziert und über das Schlauchsystem zum Tumorgewebe transportiert. Dort mussten sie aktiv an die Tumorzellen anheften, um ihre Effektorfunktionen auszuüben.

In der H&E-Färbung zeigte sich bereits, dass die ROR1-spezifischen CAR T-Zellen in der Lage waren, die Tumorzellen auch im dynamischen System zu lysieren: Die finalen Gewebeschichten in den Ansätzen mit ROR1-CAR T-Zellen waren deutlich dünner als in den unbehandelten Modellen bzw. den Ansätzen mit KT-Zellen (Abbildung 34, A). Auch die Quantifizierung der Apoptose zeigte, dass diese in den Tumorzellen, die mit ROR1-CAR T-Zellen behandelt wurden, signifikant stärker anstieg als in den KT-Zellen (Abbildung 34, B).

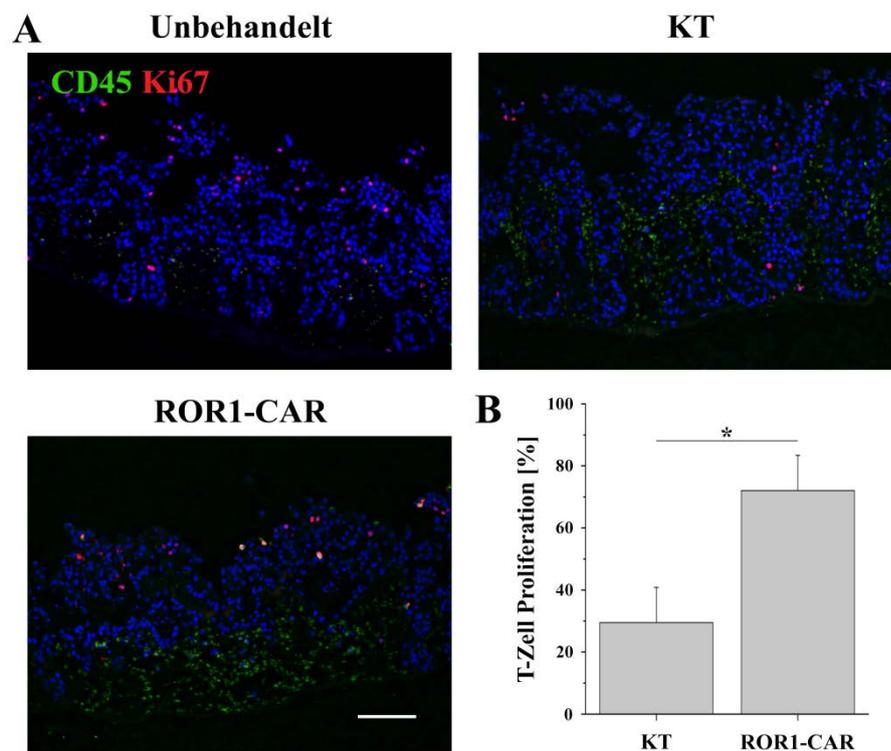


Abbildung 35: Proliferation der ROR1-CAR T- und KT-Zellen

Die Proliferationsrate war in den ROR1-spezifischen CAR T-Zellen im Vergleich zu den KT-Zellen signifikant erhöht. A) CD45/Ki67-Immunfluoreszenz-Doppelfärbung der dynamischen Tumormodelle, die mit KT-Zellen (KT) oder ROR1-CAR T-Zellen (ROR1-CAR) fünf Tage behandelt wurden. Maßstabsbalken: 100 μ m. Anhand dieser Färbung wurde B) die Proliferation der T-Zellen quantifiziert. Dafür mussten die CD45/Ki67-doppelt positiven Zellen in sechs Bildern je Probe gezählt und auf die Gesamt-T-Zellzahl (nur CD45-positiv) bezogen werden. * $p < 0.05$, $n = 4$.

Der Versuchsaufbau ermöglichte es, zusätzlich zur Apoptose der Tumorzellen, auch die T-Zellen näher zu untersuchen. So konnte über den Nachweis von CD25 und CD69 im Durchflusszytometer in den T-Zellen mit dem ROR1-spezifischem CAR eine höhere Aktivierung beobachtet werden (AG Dr. Hudecek, Daten nicht gezeigt). Zusätzlich zeigte sich eine signifikant höhere Proliferation der ROR1-CAR T-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-T-Zellen (Abbildung 35) sowie eine höhere Ausschüttung von Interleukin-2 und Interferon-gamma in das Medium (Daten AG Dr. Hudecek, Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Effekte der ROR1-CAR T-Zellen im Modell eines soliden Tumors nachweisbar waren und quantifiziert werden konnten. Zudem ermöglichte das Testsystem die Untersuchung der T-Zellen im Überstand als auch der Tumor infiltrierenden Lymphozyten im Gewebe.

6 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe des Tissue Engineering ein humanes Testsystem für das Lungenkarzinom weiterentwickelt und für die präklinische Anwendung mit SOP-Schema vorbereitet. Durch die Verwendung einer natürlichen Gewebematrix konnte das Modell in vielen Punkten an die Tumore in Patienten angeglichen werden: Zunächst wurde bestätigt, dass eine zielgerichtete Therapie gegen den EGFR in dem 3D System zu einer verstärkten Induktion der Apoptose führt. Anschließend wurde hier erstmals *in vitro* gezeigt, dass die Behandlung mit einem HSP90-Inhibitor bei *KRAS*-Mutation keine eindeutigen Vorteile bringt, diese jedoch in der 2D Zellkultur vorhergesagt werden. Die Prognosen aus dem *in vitro* Modell entsprechen damit verschiedenen klinischen Studien und unterstreichen das Potenzial des hier vorgestellten Testsystems. Der Vergleich des 3D *in vitro* Modells mit primären Adenokarzinomen aus der Klinik hinsichtlich der Morphologie, des EMT-Status und der Differenzierung ergab zudem zahlreiche Ähnlichkeiten. Weiterhin konnte das Modell so erweitert werden, dass es zur Untersuchung progressiver Tumormechanismen wie EMT, Invasion und Resistenzen geeignet ist. Eine neuartige Behandlung im Bereich der Immuntherapie wurde ebenfalls erfolgreich simuliert und belegt damit die Eignung des Testsystems für die Untersuchung alternativer Therapiestrategien.

6.1 Charakterisierung des humanen 3D Lungentumor-Testsystems

Der Aufbau der humanen 3D Lungentumormodelle erfolgte auf der Basis der BioVaSc[®], die aus einem dezellularisiertem Abschnitt des Schweinedünndarms besteht und eine intakte Gefäßstruktur besitzt (Mertsching *et al.*, 2005). Diese ermöglicht es, vaskularisierte Gewebekonstrukte herzustellen und in Langzeitkulturen zu untersuchen (Linke *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurde ein Teilstück der BioVaSc[®] ohne Gefäßstruktur – die SISmuc – verwendet. Dieser Scaffold setzt sich aus der *small intestinal submucosa* und der *Mucosa* zusammen, und besteht hauptsächlich aus Kollagen und Elastin (Schultheiss *et al.*, 2005; Mertsching *et al.*, 2009). Die SISmuc bietet demnach extrazelluläre Komponenten und eine komplexe Gewebearchitektur mit zahlreichen Hohlräumen, welche das Wachstum der Zellen verbessern und eine organisierte Anord-

nung verschiedener Zelltypen in dieser 3D Umgebung ermöglichen. Zusätzlich hat diese komplexe Struktur einen Einfluss auf die Differenzierung, die Medikamentenantwort, die Signaltransduktion sowie den malignen Phänotyp von Krebszellen (Paszek *et al.*, 2005; Walles *et al.*, 2007; David *et al.*, 2008). Die erhaltene Basalmembranstruktur stellt zudem eine Barriere für die Invasion von Tumorzellen und die Ausbildung von Metastasen dar und ist als besonderes Merkmal dieser Matrix hervorzuheben (Stratmann *et al.*, 2014).

Als zelluläre Komponenten wurden zur Etablierung des 3D Lungentumor-Testsystems zunächst Zelllinien verwendet. Obwohl Studien belegen, dass die Kultur von Primärzellen die ursprünglichen Eigenschaften der *in vivo* Zellen wahrscheinlich besser repräsentiert, besitzen Zelllinien einige Vorteile gegenüber den zum Teil schwer zu isolierenden und aufwändig zu kultivierenden Primärzellen (Cree *et al.*, 2010). Zum einen sind Zelllinien in großen Mengen verfügbar und können einfach kultiviert werden, zum anderen sind ihre Eigenschaften beschrieben und sie variieren weniger in ihrem Verhalten als primäre Zellen. Diese Merkmale sind bei der Etablierung eines neuen Testsystems von Vorteil, besonders wenn andere Parameter variieren, die Reproduzierbarkeit der Analyseparameter bestimmt und eine hohe Standardisierung erzielt werden soll. Zudem wurde in mehreren Studien gezeigt, dass viele Tumorzelllinien den Primärtumor noch sehr gut repräsentieren (Wistuba *et al.*, 1999; Gazdar, Girard, *et al.*, 2010). So verglichen Wang und Kollegen 59 NCI-60-Zelllinien mit ihren Primärtumoren und beobachteten, dass 51 davon in ihrem Genexpressionsprofil den Originaltumor widerspiegeln (Wang *et al.*, 2006). Bemerkenswerterweise konnten zahlreiche wichtige genetische und epigenetische Veränderungen, die beim Lungenkrebs auftreten, auch in Zelllinien nachgewiesen werden (Gazdar, Gao, *et al.*, 2010). Sos und andere stellten fest, dass das Genom von NSCLC-Zelllinien das Genom von primären NSCLC-Tumoren sehr gut repräsentiert und dass die Verteilung der onkogenen Mutationen in den Zelllinien mit denen in primären NSCLC-Tumoren vergleichbar ist (Sos *et al.*, 2009).

Insbesondere die 3D Kultur von Zelllinien spiegelt die pathophysiologische Situation im Patienten gut wider (Kunz-Schughart *et al.*, 2004; Herrmann *et al.*, 2008). So konnte auch in der vorliegenden Arbeit anhand einiger Biomarker der Onkologie gezeigt werden, dass verschiedene Zelllinien, die auf der SISmuc im statischen oder dynamischen System kultiviert wurden, im Gegensatz zur 2D Kultur, unterschiedliche Tumorsubty-

pen abbilden. Beispielsweise ähneln die HCC827- und H441-3D Tumormodelle in statischer Kultur einem gut differenzierten Adenokarzinom vom lepidischen Subtyp, in dem E-Cad und beta-Cat homogen und an den Zellgrenzen kolokalisiert vorkommt. Wurden dieselben Zelllinien unter dynamischen Bedingungen kultiviert, so entsprachen das Wachstum und die Markerexpression eher dem soliden Subtyp. Dabei nähert sich der Phänotyp der Tumorzellen in den humanen 3D Modellen stärker an die *in vivo* Situation im Patienten an, als die mit HCC827-Zellen induzierten Xenografts. Während die homogene E-Cad/ β -Cat-Färbung auch in den Xenografts analog zum Adenokarzinom zu sehen ist, konnte die apikale Lokalisation des transmembranösen MUC-1, wie sie in normalen sekretorischen Epithelzellen (Kufe *et al.*, 1984) und differenzierten Adenokarzinomen (Lau *et al.*, 2004) vorkommt, nur in den 3D *in vitro* Modellen dargestellt werden. Eine solche Polarisierung war in den Xenograftmodellen größtenteils nicht zu erkennen, da die Tumorzellen aufgrund der subkutanen Injektion in das Binde- und Fettgewebe in einer für Tumore epithelialen Ursprungs nicht physiologischen Umgebung wachsen. In dem 3D Lungentumor-Testsystem wird die Polarisierung durch die Gewebearchitektur der SISmuc und vor allem durch die vorhandene Basalmembranstruktur ermöglicht und konnte bereits in Stratmann *et al.* (2014) veröffentlicht werden. Die Möglichkeit die Polarisierung der Zellen einschätzen zu können, ist ein entscheidender Vorteil des 3D Tumormodells gegenüber konventioneller 2D Kultur auf Plastikoberflächen. So können gut differenzierte Zellen leichter von weniger differenzierten Zellen unterschieden werden. Stratmann und Kollegen zeigten auch, dass MUC-1 in der Zelllinie A549 vorwiegend basolateral/zytoplasmatisch lokalisiert ist und damit die Zellen depolarisiert sind. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden und korreliert vor allem im dynamischen System eher mit einem weniger differenzierten Adenokarzinom (Lau *et al.*, 2004; Kufe, 2009).

Im Allgemeinen unterscheidet sich die morphologische Ausbildung der *in vitro* Tumore in der dynamischen Kultur von der in statischen Bedingungen, wobei die dynamische Kultur zu einem stark verbesserten Tumorwachstum führt. Durch den kontinuierlichen Medienfluss werden die Zellen besser mit Nährstoffen versorgt (Hansmann *et al.*, 2013). Zudem können Stoffwechselprodukte schneller abtransportiert werden. Dies ermöglicht eine weitgehend konstante molekulare Zusammensetzung des Mediums in der Nähe der Tumorzellen ohne periodische Schwankungen, wie sie in der statischen Kultur durch regelmäßige Medienwechsel entstehen. Zusätzlich ist die dynamische Kultur

durch physikalische Impulse, wie zum Beispiel Scherstress, gekennzeichnet. Diese Stimuli tragen dazu bei, dass die Bedingungen im Bioreaktor denen von *in vivo* Gewebe ähneln (Hansmann *et al.*, 2013). So belegen viele Studien, dass die Kultur in einem dynamischen System für das Zellwachstum und ihre Differenzierung von Vorteil ist (Zhao *et al.*, 2009; Mishra *et al.*, 2012). Chen und Kollegen zeigten eine verbesserte Expansion von mesenchymalen Stammzellen, die nach Induktion im Bioreaktor in adipogene, osteogene und chondrogene Vorläuferzellen differenzieren (Chen *et al.*, 2006). Hirt und andere verglichen die statische Kultur von kolorektalen Karzinomzellen mit der Kultur in einem Perfusionsbioreaktor und beobachteten, dass die dynamische 3D Kultur zu einer homogeneren Gewebearchitektur führte und die Morphologie vergleichbar mit der von Xenografts der gleichen Zelllinie war (Hirt *et al.*, 2015). Eine Vergleichbarkeit der dynamisch kultivierten Zellen mit den äquivalenten Xenograftmodellen konnte auch in der vorliegenden Arbeit durch ähnliche Markerexpression gezeigt werden. Zudem ermöglichte die unterschiedliche Kultivierung wie vorhergehend beschrieben die Darstellung von verschiedenen Adenokarzinomsubtypen.

Neben der Medienversorgung hat auch die Kulturdauer einen großen Einfluss auf die Ausprägung des 3D Tumormodells. Während sich die Zellzahl auf der SISmuc und die Morphologie der Zellen zu Beginn der Kultur noch stark änderten, erreichte das Modell zwischen Tag sieben und elf eine Gewebemöostase. Danach waren kaum noch Änderungen in der H&E-Färbung sowie der Proliferation festzustellen. Wie bereits mehrfach von unserer Arbeitsgruppe publiziert (Stratmann *et al.*, 2014; Göttlich *et al.*, 2016; Nietzer *et al.*, 2016) und auch in dieser Arbeit gezeigt, ist die Proliferationsrate der Tumorzellen in den 3D Tumormodellen auf Basis der SISmuc signifikant geringer als in konventionellen präklinischen 2D Modellen. Eine niedrigere Proliferationsrate in 3D Umgebung wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Fallica *et al.*, 2012; Luca *et al.*, 2013). Die artifiziell hohe Proliferation von Tumorzellen in herkömmlicher 2D Kultur führt zu einer Überschätzung der Wirksamkeit von Medikamenten, besonders im Fall von Zytostatika oder Substanzen, welche die mit der Proliferation verbundene Signaltransduktion beeinflussen (Cree *et al.*, 2010). Die niedrigeren Proliferationsraten in den 3D Testsystemen entsprechen eher denen von Tumoren in Patienten (Lara-Guerra *et al.*, 2012), sodass diese neben den oben genannten Merkmalen einen weiteren Vorteil des 3D Modells gegenüber der 2D Kultur darstellen. Dabei zeigten die Proliferationsraten sowohl zwischen den verschiedenen Zelllinien als auch in Abhängigkeit der

Kulturbedingungen Unterschiede, welche die Darstellung verschiedener Tumorstadien bzw. -subtypen ermöglichen.

Ki67 ist ein Proliferationsmarker, der auch in der Klinik routinemäßig gefärbt wird (Gerdes *et al.*, 1984) und innerhalb eines Tumors erheblich schwanken kann (Macdonald *et al.*, 2004). Die prädiktive Bedeutung von Ki67 in der Behandlung des NSCLC wird in der Literatur kontrovers diskutiert, wird aber häufig mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht. So zeigten Cavarga und andere, dass der Ki67-Index in präneoplastischen Läsionen niedrig ist, mit der malignen Entwicklung ansteigt und den höchsten Wert in invasiven Karzinomen hat (Cavarga *et al.*, 2009). Auch in einer Studie von Wen und Kollegen korrelierte eine erhöhte Ki67-Expression negativ mit dem Gesamtüberleben und dem krankheitsfreiem Überleben von NSCLC-Patienten (Wen *et al.*, 2015). 2014 untersuchten Warth und andere die Proliferationsrate in 184 Adenokarzinomen des NSCLC, die im Mittel bei 25,8 % lag (Warth *et al.*, 2014) und damit gut mit den hier vorgestellten HCC827-Tumormodellen korreliert. Zusätzlich fanden Warth und Kollegen heraus, dass verschiedene Subtypen unterschiedlich stark proliferieren. Solide Tumore besitzen mit 39,4 % proliferativen Zellen die höchste Rate, gefolgt von azinären (21,6 %), micropapillären (15,7 %), papillären (14,4 %) und lepidischen Tumoren (9,5 %). Die Proliferationsrate, der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Biopsate, war deutlich niedriger und lag im Mittel bei 6,4 %. Ursache dafür ist möglicherweise, dass die Biopsate erst ein paar Stunden nach Entnahme fixiert wurden und deshalb schon weniger Zellen proliferierten. Andererseits könnten auch zufälligerweise Tumore mit einer niedrigen Proliferationsrate gefärbt worden sein, da die Stichprobenzahl mit $n = 3$ sehr niedrig ist.

Die Proliferationsrate der Xenograftmodelle ist im Fall der HCC827-Zellen mit den 3D Tumormodellen und der in der Literatur beschriebenen Proliferationsrate für Adenokarzinome der Lunge vergleichbar. Die Proliferationsrate der A549-Zellen war in den *in vitro* Modellen mit 4 bis 15 % deutlich geringer im Vergleich zu den entsprechenden Xenograftmodellen und spiegelt die Rate von lepidären Tumoren wider. Hier ist jedoch zu überlegen, ob man die Bewertung des antiproliferativen Effektes einer Testsubstanz für solche Tumore und damit auch für die Testsysteme weniger stark gewichten sollte.

Neben der Proliferationsrate wurde zur Einschätzung des Behandlungserfolges die Apoptosebestimmung mittels M30 CytoDeath™ ELISA eingesetzt. Da dieser ELISA

spezifisch die Apoptose in Zellen epithelialen Ursprungs bestimmt, kann er auch in späteren Kokulturstudien zur Bestimmung der Apoptoserate in Karzinomzellen verwendet werden. Bei der Untersuchung der Variationskoeffizienten der gewählten Analyseparameter Proliferation und Apoptose zeigte sich eine gute Reproduzierbarkeit mit zum Teil niedrigeren Koeffizienten im Vergleich zu 2D. Entscheidend für die hohe Reproduzierbarkeit ist möglicherweise der homogenere Phänotyp der Tumorzellen im 3D Modell im Vergleich zur 2D Kultur. So weisen die HCC827-Zellen in 3D eine gleichmäßige Expression der Epithel- und Differenzierungsmarker auf, während diese in 2D nicht in allen Zellen zu finden sind. In einem Testsystem, in dem natürlicherweise viele Parameter variieren, ist diese Homogenität von Vorteil und kann, wie weiter unten beschrieben, zu einer verbesserten Aussagekraft der Modelle hinsichtlich eines Medikamenteneffektes führen.

Ein Nachteil in der Analyse der 3D Tumormodelle ist derzeit, dass die exakte Zellzahl nicht bestimmt werden kann. Deshalb ist es notwendig für alle Analyseparameter eine geeignete Normalisierungsmethode zu finden. Zusätzlich ist es von Vorteil vor Behandlungsbeginn zu prüfen, ob die hergestellten Modelle untereinander vergleichbar sind und einer definierten Qualität entsprechen. Neben der optischen Kontrolle, in der geprüft wird, ob die Matrix intakt ist oder Kontaminationen vorliegen, wurde deshalb in dieser Arbeit die Bestimmung der Vitalität im dreidimensionalen Modell mittels Real-Time-Glo™ MT Zellvitalitätsassays untersucht. Dieser Test hat den Vorteil, dass er nicht invasiv und schnell durchzuführen ist und deshalb routinemäßig vor Beginn einer Behandlung durchgeführt werden kann. Nach der erfolgreichen Anpassung des Tests an die 3D Kultur im Zellkronenformat zeigte sich, dass die Tumormodelle eines Versuches in der Regel eine geringe Schwankung in der Vitalität aufweisen, was auf eine vergleichbare Besiedelung zurückschließen lässt. Damit können bei zukünftiger Verwendung des Vitalitätstests für standardmäßige Testungen potentiell fehlerhafte Modelle identifiziert und verworfen werden.

Zusammenfassend konnte im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt werden, dass die 3D Tumormodelle je nach Zelllinie und Kulturbedingungen tumorrelevante Merkmale aufweisen und deshalb zur Untersuchung tumorbiologischer Aspekte und zur Testung von Medikamenten herangezogen werden können. Zur Generierung reproduzierbarer Ergebnisse bei Substanztestungen, wurde auf Grundlage der oben beschriebenen Daten ein

standardisiertes Behandlungsschema eingeführt und als SOP umgesetzt (Göttlich *et al.*, 2016). Die Schwankungen der Analyseparameter Proliferation und Apoptose konnten in dem 3D Modell als gering eingestuft werden. Diese Daten sowie die SOP stellen eine wichtige Grundlage für die weitere Validierung des Testsystems dar.

6.2 Etablierung des 3D Testsystems anhand zielgerichteter Therapien

Für die Untersuchung der klinischen Relevanz des 3D Tumormodells im Vergleich zur herkömmlichen 2D Kultur, wurde zunächst die in der Klinik angewandte Biomarkergeleitete Therapie mit dem EGFR-Inhibitor Gefitinib getestet (Bronte *et al.*, 2010). Dieser TKI wurde 2009 auf dem europäischen Markt zugelassen, nachdem gezeigt wurde, dass Gefitinib als Erstlinientherapie in *EGFR*-mutierten Adenokarzinompatienten gegenüber der Standardtherapie Carboplatin-Paclitaxel überlegen ist (Mok *et al.*, 2009). Dabei belegten molekulare Studien, dass das Vorhandensein einer Mutation in der Tyrosin-Kinase-Domäne des *EGFR*-Gens ein stärkerer Prädiktor für die Wirksamkeit ist als die Adenokarzinomhistologie (Lynch *et al.*, 2004; Paez *et al.*, 2004; Pao *et al.*, 2004). Um diese Therapie nun in dem vorgestellten Modell abbilden zu können, wurden Zelllinien mit unterschiedlichem Mutationsstatus und unterschiedlicher Sensitivität gegenüber Gefitinib gewählt. Die HCC827-Zellen, die eine aktivierende Mutation im Exon 19 des *EGFR*-Gens tragen, wurden in vorhergehenden 2D Studien aufgrund dieses genetischen Hintergrundes als sensitiv beschrieben (Mukohara *et al.*, 2005; Engelman *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu gelten Tumore von Patienten, die eine *KRAS*-Mutation besitzen als primär resistent gegenüber der Therapie mit TKI (Pao, Wang, *et al.*, 2005). Dieser Biomarker tritt in etwa 24 % der NSCLC-Patienten auf (Sequist *et al.*, 2011) und wurde in dieser Arbeit durch die verwendeten Zelllinien A549 und H441 repräsentiert. Diese *EGFR*-Wildtyp, *KRAS*-mutierten Zellen unterscheiden sich dabei in ihrer Abhängigkeit von *KRAS* (Singh *et al.*, 2009): Die A549-Zellen sind unabhängig von *KRAS*, d.h. das Wachstum der Zellen wird durch einen *Knockdown* von *KRAS* nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu sind die H441-Zellen abhängig von *KRAS*, sodass eine fehlende Signaltransduktion über *KRAS* zum Zelltod führt. In vielen 2D Studien sind die A549- mit einer mittleren Sensitivität gegenüber Gefitinib beschrieben (Kokubo *et al.*, 2005; Noro *et al.*, 2006), während die H441-Zellen nicht auf Gefitinib reagieren (Tracy *et al.*, 2004; Mukohara *et al.*, 2005). Die unterschiedliche

Antwort auf den TKI Gefitinib in Abhängigkeit des genetischen Hintergrundes konnte auch in der vorliegenden Arbeit über die Bestimmung der Proliferationsabnahme und des Apoptoseanstiegs nach Therapie bestätigt werden. Dabei waren nur die *EGFR*-mutierten HCC827-Zellen sensitiv gegenüber Gefitinib, während in den A549- und H441-Zellen keine Veränderungen in Proliferation und Apoptose zu beobachten waren. Zu erwähnen ist, dass sich die hier ermittelten Proliferationsraten leicht von denen bereits in Stratmann *et al.* (2014) publizierten unterschieden. Ursache dafür könnte der Ersatz der Diaminobenzidin-Färbung durch die Fluoreszenzfärbung sein, welche keinen Schritt zur zusätzlichen Signalverstärkung beinhaltet. Der Vorteil der Fluoreszenzfärbung liegt jedoch in der besseren Unterscheidung proliferativer und nicht proliferativer Zellen. Zudem erlaubt sie die Verwendung von Algorithmen zur halbautomatischen Bestimmung der Proliferationsrate, welche ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit implementiert und in Göttlich *et al.* (2016) publiziert wurden.

Die hier ermittelte Reduktion der Proliferation infolge der Gefitinib-Behandlung korrelierte dabei mit klinischen retrospektiven Studien. Lara-Guerra und Kollegen zeigten, dass *EGFR*-mutierte Adenokarzinome nach TKI-Behandlung im Mittel eine Proliferationsrate von 4,6 % aufweisen, während in Adenokarzinomen die im *EGFR*-Gen wildtypisch waren auch nach Behandlung eine Proliferationsrate von 31,4 % nachgewiesen werden konnte (Lara-Guerra *et al.*, 2012). In vielen prospektiven klinischen Studien mit Gefitinib und Erlotinib liegt das Ansprechen von *EGFR*-mutierten Patienten zwischen 65 und 90 % (Ladanyi und Pao, 2008). Zudem zeigen Patienten mit einer Mutation im *EGFR*-Gen und einem Ansprechen nach TKI-Behandlung ein längeres progressionsfreies Überleben sowie einen Trend für ein verbessertes Gesamtüberleben gegenüber Patienten mit wildtypischen *EGFR*. Wie in Stratmann *et al.* (2014) gezeigt, reagierten die *EGFR*-mutierten HCC827-Zellen stärker in dem 3D Tumormodell im Vergleich zu 2D, gekennzeichnet durch einen höheren Anstieg der Apoptose nach Behandlung. Die 3D Umgebung konnte demzufolge die *in vivo* Ergebnisse genauer abbilden und stellt somit einen besseren Prädiktor für den Therapieerfolg in der Klinik dar als die 2D Kultur. Andere Studien belegen ebenfalls, dass 3D Modelle die Medikamentenantwort *in vivo* besser vorhersagen können (Hongisto *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2014). In der Regel wird, im Gegensatz zu der in dieser Arbeit gezeigten zielgerichteten Therapie, in den 3D Modellen eine höhere Chemoresistenz und demzufolge ein schlechteres Ansprechen auf Substanzen im Vergleich zu 2D nachgewiesen (Karlsson *et al.*, 2012; Fong *et al.*,

2013). Damit die Antworten in dem *in vitro* Modell besser verstanden und neue Therapieziele für die primär Gefitinib-resistenten *KRAS*-mutierten Zelllinien A549 und H441 identifiziert werden können, wurde das bereits veröffentlichte *in silico* Modell zur Vorhersage der Therapieeffekte in HCC827- und A549-Zellen (Stratmann *et al.*, 2014) durch die Arbeitsgruppe von Prof. Thomas Dandekar am Lehrstuhl für Bioinformatik, Universität Würzburg, erweitert. Dafür musste zunächst die Signaltransduktion in den Zelllinien ohne und mit Behandlung sowohl in 3D als auch 2D untersucht werden. Es zeigte sich, dass die in den HCC827-Zellen durch Gefitinib beeinflussten Proteine (EGFR-, HGFR-, WNK1-Aktivierung, sowie HSP90 und β -Cat) in 2D und 3D ähnlich verändert waren. Dies deutet darauf hin, dass die stärkere Antwort auf Gefitinib in 3D weniger durch eine Änderung in der Signaltransduktion beeinflusst wird, sondern wie bereits weiter oben beschrieben, durch eine stärkere Homogenität des Testsystems, gezeigt durch eine gleichmäßigere Markerexpression im Vergleich zu 2D. Dadurch ist das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert und das System liefert eine eindeutigere Antwort auf Veränderungen. Die H441- zeigten im Gegensatz zu den HCC827-Zellen unterschiedliche Änderungen in der Signaltransduktion zwischen 2D und 3D als Antwort auf Gefitinib und zusätzlich Unterschiede zu den HCC827- und A549-Zellen. Auf Grundlage dieser Ergebnisse erfolgte die Erweiterung des *in silico* Modells (Stratmann *et al.*, 2014) mit zelllinienspezifischen Knoten. So wurde zum Beispiel für die HCC827- und die H441-Zellen der HGFR-Signalweg eingefügt. Dieses erweiterte Modell konnte die Antworten auf eine Therapie mit Gefitinib in allen drei Zelllinien zuverlässig vorhersagen und ermöglicht überdies eine *in silico* Vorhersage für neue Medikamentenziele oder -kombinationen, insbesondere als Zweitlinientherapie nach der Entwicklung von Resistenzen (Kunz, 2016).

Nachdem die Therapie mit Gefitinib erfolgreich in dem 3D *in vitro* Tumormodell abgebildet werden konnte, stellte sich die Frage, ob das Testsystem auch Medikamente identifizieren kann, die in der Klinik nicht wirken. Dies ist vor allem wichtig, da die Erfolgsrate von in der Präklinik als wirksam vorhergesagten Substanzen in der Onkologie bei nur 5 % liegt (Bhattacharjee, 2012). Eine Substanz, die in präklinischen *in vitro* 2D und *in vivo* Mausmodellen bei *KRAS*-mutierten Tumoren als wirksam getestet wurde (Sos *et al.*, 2009), in klinischen Studien jedoch keinen Effekt in *KRAS*-mutierten NSCLC hatte (Socinski *et al.*, 2013), ist der Inhibitor des HSP90. Hitzeschockproteine, besonders das HSP90, sind seit einigen Jahren im klinischen Fokus, da diese in vielen

Krebsentitäten überexprimiert (Ferrarini *et al.*, 1992; Maloney und Workman, 2002) und für die Stabilität ihrer Substratproteine, darunter eine Reihe von Onkoproteinen, verantwortlich sind (Chatterjee *et al.*, 2016). HSP90 ist zum Beispiel mit der korrekten Faltung und biologischen Aktivität seiner Substratproteine Akt, ErbB2, MEK, mutiertes p53, mutierter EGFR, HGFR, BCL2 und BRAF assoziiert, die alle onkogene Treiber sind (Workman, 2002; Chatterjee *et al.*, 2016). Geldanamycin, der HSP90-Inhibitor der ersten Generation interagiert mit der Nukleotidbindungsstelle in der N-terminalen Domäne des HSP90 (Roe *et al.*, 1999). Dies führt zur Inhibierung der ATPase Aktivität, welche essentiell für die Chaperonfunktion des HSP90 ist. Infolgedessen werden die Substratproteine nicht richtig gefaltet und über den Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut (Neckers *et al.*, 1999; Hostein *et al.*, 2001). Die Entwicklung von Geldanamycin und dessen Derivaten, zu denen auch das in dieser Arbeit verwendete 17-AAG gehört, wurde jedoch aufgrund von starken Nebenwirkungen eingestellt (Saif *et al.*, 2013; Chatterjee *et al.*, 2016). Ganetespib, ein HSP90-Inhibitor der zweiten Generation, zeigte in verschiedenen *KRAS*-mutierten Zelllinien ebenfalls eine gute Wirksamkeit (Acquaviva *et al.*, 2012), hat aber weniger toxische Nebenwirkungen im Vergleich zu Geldanamycin-Derivaten (Jhaveri und Modi, 2015; Chatterjee *et al.*, 2016). Um die Effekte des HSP90-Inhibitors in unserem Modell mit der 2D Kultur zu vergleichen, wurde dennoch 17-AAG gewählt, um die Ergebnisse mit den *in vitro* und *in vivo* Versuchen von Sos und Kollegen (2009) vergleichen zu können. Zudem sollte zunächst nur der Antitumoreffekt und nicht die Toxizität auf gesunde Zellen untersucht werden. In der Studie von Sos und anderen führte die Behandlung mit 17-AAG zu unterschiedlichen Therapieeffekten in den HCC827-, A549- und H441-Zellen, weshalb sich die bereits in dieser Arbeit eingeführten Zelllinien für die Testung eignen (Sos *et al.*, 2009).

In 2D war die Antwort durch eine starke Reduktion der Proliferation in A549- und H441- und einen deutlichen Anstieg der Apoptose in A549-Zellen gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu waren beide *KRAS*-mutierten Zelllinien in den 3D Tumormodellen durch eine reduzierte zellspezifische Antwort auf den HSP90-Inhibitor 17-AAG gekennzeichnet. Dies belegt – neben der oben beschriebenen verbesserten Prädiktion für den EGFR-Inhibitor Gefitinib – eine erhöhte Chemoresistenz für die HSP90-Inhibition im *KRAS*-Mutationshintergrund, die mit den klinischen Daten korreliert. In einer Studie von Socinski und anderen (2013) wurden 99 Patienten in drei verschiedenen Kohorten (*EGFR*-mutiert, *KRAS*-mutiert, *KRAS* und *EGFR* wildtypisch) mit dem HSP90-Inhibitor

Ganetespib als Monotherapie über einen Zeitraum von drei Wochen behandelt. Dabei zeigten Patienten, die für *EGFR* und *KRAS* wildtypisch waren, das längste progressionsfreie Überleben. Der HSP90-Inhibitor hatte jedoch keinen signifikanten Effekt in den *KRAS*-mutierten NSCLC-Patienten. In der nachfolgenden klinischen Studie GALAXY-1 wurde die Kombinationstherapie von Ganetespib mit Docetaxel untersucht (Bhattacharya *et al.*, 2015). Hier konnten zwar ein längeres progressionsfreies Überleben sowie Gesamtüberleben der Adenokarzinompatienten gefunden werden, jedoch nicht der Patienten, die durch eine *KRAS*-Mutation gekennzeichnet waren. Im Anschluss an die Studie fand eine weitere – die GALAXY-2 – Studie statt, um *KRAS* als Prädiktor für diese Kombinationstherapie zu untersuchen. Jedoch wurde diese Studie 2016 vorzeitig eingestellt (Bhattacharya *et al.*, 2015; www.clinicaltrials.gov).

Zur Identifizierung wirksamer Therapiestrategien für Tumore mit *KRAS*-Hintergrund, wurde die Antwort des 3D Tumormodells in Hinblick auf die Signaltransduktion nach HSP90-Inhibierung weiter untersucht und mit der 2D Kultur verglichen. Anschließend dienten diese Daten zur zusätzlichen zelllinienspezifischen Erweiterung des oben beschriebenen *in silico* Modells. Die Phospho-Arrays sowie die Western Blots zeigten dabei Unterschiede in der Signaltransduktion sowohl zwischen 2D und 3D als auch zwischen den *KRAS*-mutierten Zelllinien, wobei die folgenden Proteine durch 17-AAG-Behandlung reguliert wurden: EGFR, HGFR, p53, HSP60, ErbB2, ErbB3, c-Ret, VEGFR2, FGFR3 und MSPR. Dabei ist die steigende Konzentration von HSP60 nach Behandlung in 3D in den A549- im Gegensatz zur unveränderten Signalintensität in den HCC827- und H441-Zellen besonders zu beachten. HSP60 wird direkt durch HSP90 inhibiert und inaktiviert selbst p53 (Ghosh *et al.*, 2008). Eine p53-Aktivierung konnte trotz erhöhter HSP60-Konzentration in den A549- nicht nachgewiesen werden, jedoch stieg die Signalintensität von phospho-p53 in den H441-Zellen bei gleichbleibenden HSP60 stark an. Anhand dieser Daten kann ein noch unbekannter Mechanismus postuliert werden wie HSP60 und p53 in Lungenkarzinomzellen verknüpft sind. Auf Grundlage der *in vitro* Daten wurden die *in silico* Modelle von allen Zelllinien mit den Knoten HSP90 als Zielprotein, p53, HSP60 und HIF1- α als direkten Interaktionspartner von HSP60 erweitert. Weitere Knoten wurden zelllinienspezifisch in die Modelle eingefügt. Anschließend konnten die *in vitro* beobachteten Antworten auf die Behandlung mit 17-AAG erfolgreich *in silico* simuliert werden, sodass die Modelle nun als Grundlage zur Identifizierung von unterstützenden potentiellen Biomarkern zusätzlich zu *KRAS* und

damit auch von neuen Zielmolekülen für eine erfolgreiche Therapie *KRAS*-mutierter Tumore dienen können. Die *in vitro* Testung der Vorhersagen soll dann zeigen, ob die, in dem *in silico* Modell eingefügten Knoten richtig verknüpft wurden. Gegebenenfalls müssen diese sonst zur Optimierung des *in silico* Modells erneut angepasst werden.

6.3 Darstellung von fortgeschrittenen Tumorstadien

Nachdem gezeigt wurde, dass das 3D Lungentumor-Testsystem die Situation in der Klinik bezüglich zwei Biomarker-geleiteter Therapien besser abbilden kann als herkömmliche 2D Kulturen, sollte nun untersucht werden, ob auch fortgeschrittene Tumorstadien wie Invasionsprozesse oder Resistenzen in dem 3D Modell dargestellt werden können. Invasion und Metastasierung sind die entscheidenden Merkmale, die lokal wachsende Tumore in eine systemische, lebensbedrohliche Krankheit verwandeln und sie stellen deshalb die Hauptursache dar, weshalb Patienten an Krebs sterben (Friedl und Alexander, 2011; Bastid, 2012).

Ein Prozess, durch den Krebszellen eine erhöhte Fähigkeit zur Migration und Invasion, d.h. zur Durchdringung körpereigener Barrieren wie der Basalmembran erhalten, ist die EMT (Thiery, 2002; Kalluri und Weinberg, 2009). Sie ist ein biologischer Mechanismus, durch den polarisierte Epithelzellen, die mit einer Basalmembran interagieren, in einen mesenchymalen Phänotyp transformieren, verbunden mit einer gesteigerten Mobilität. Das hier vorgestellte Modell enthält eine Basalmembranstruktur und stellt somit eine attraktive Plattform dar, um die EMT und damit, in der Literatur beschriebene, assoziierte Prozesse wie Invasion und Resistenz zu untersuchen. Zur Auslösung der EMT in den 3D Tumormodellen wurde der Wachstumsfaktor TGF- β 1 gewählt, da dieser als potentester EMT-Induktor beschrieben ist (Kim, Jang, *et al.*, 2007; Papageorgis, 2015).

Tatsächlich konnte in zwei, HCC827 und A549, der drei verwendeten Zelllinien eine EMT beobachtet werden. Dabei war neben der morphologischen Veränderung in einen langgestreckten, spindelförmigen Zelltyp auch eine veränderte Expression von EMT-Markern zu beobachten. Der epitheliale Marker E-Cad, der in den HCC827- und A549-Zellen mit β -Cat an den Zellgrenzen kolokalisiert ist, konnte nach der Stimulation mit TGF- β 1 nur deutlich schwächer oder gar nicht mehr detektiert werden. Die Expression von E-Cad ist in der Literatur oft invers mit dem Überleben von Patienten verbunden

(Li *et al.*, 2017; Tsoukalas *et al.*, 2017). Zudem wird der Verlust von E-Cad mit dem Durchlaufen einer EMT in Verbindung gebracht (Vleminckx *et al.*, 1991; Dumont *et al.*, 2008). Eine Studie belegte beispielsweise, dass das Onkogen *c-Fos* in normalen murinen Epithelzellen des Brustgewebes eine EMT induziert und diese mit einer verringerten Expression von E-Cad einhergeht (Eger *et al.*, 2000). Da die intrazelluläre Domäne des E-Cad Bindungsstellen für Catenine wie β -Cat enthält, führt ein Verlust von E-Cad auch zum Verschwinden dieser Verankerungspunkte, die normalerweise der Stabilisierung der Zelladhäsion dienen (Gottardi *et al.*, 2001; Tian *et al.*, 2011). Infolgedessen akkumuliert β -Cat im Zytoplasma und transloziert verstärkt in den Nukleus, wo es als entscheidender Transkriptionsfaktor für eine Reihe von Genen, darunter auch EMT-induzierende Transkriptionsfaktoren, dient (Polyak und Weinberg, 2009; Tian *et al.*, 2011). Eine stärkere Expression von β -Cat sowie Hinweise für dessen Translokation in den Zellkern konnte anhand von Immunfluoreszenzfärbungen auch in der vorliegenden Arbeit in den A549-Zellen nach der Stimulation mit TGF- β beobachtet werden und deutet somit ebenfalls auf eine EMT hin.

Ein weiteres Protein, das durch eine EMT stärker exprimiert wird, ist das Typ-III-Intermediärfilament Vim (Kalluri und Weinberg, 2009; Zeisberg und Neilson, 2009). Die TGF- β 1-Stimulation in den 3D Tumormodellen führte, analog zu anderen Studien in 2D (Kim, Jang, *et al.*, 2007) und 3D (Wendt *et al.*, 2010), zu einer stärkeren Vim-Färbung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. In den HCC827 wurde nicht in allen Zellen eine stärkere Färbung detektiert, sondern nahezu ausschließlich in Zellen, die tiefer in den Kryptenstrukturen lokalisiert waren und damit nahe der Basalmembran lagen sowie in Zellen, welche die Basalmembran überwinden konnten. Analog dazu beobachteten Dauphin und Kollegen in Proben von NSCLC-Patienten, dass Vim in gut differenzierten Adenokarzinomen auf der basalen Seite von Zellen vorhanden war, die Kontakt zum Stroma oder der Basalmembran hatten (Dauphin *et al.*, 2013). Neben der nachgewiesenen Polarisation der HCC827- und H441-Zellen, ist die unterschiedliche Markerexpression in verschiedenen Schichten der Matrix ein Hinweis darauf, dass die SISmuc eine Kompartimentierung der Zellen ermöglicht und somit eine physiologischere Umgebung als die 2D Kultur darstellt. In den A549-Zellen war die Färbung für Vim in allen Schichten etwa gleich stark, unabhängig von der Lokalisation der Zellen. Ursache dafür könnte sein, dass die A549- im Vergleich zu den HCC827-Zellen schon vor der Stimulation mit TGF- β 1 eine homogene Vim-Expression zeigten, deren Intensität

durch die EMT noch verstärkt wurde. Dauphin und Kollegen beobachteten weiterhin, dass in isolierten Zellen mit spindelförmiger Morphologie ebenfalls Vim vorhanden war (Dauphin *et al.*, 2013). Analog sind in dem 3D Tumormodell Zellen, welche die Basalmembran überquert haben und einzeln in der Matrix liegen positiv für Vim. Der prognostische Wert dieses mesenchymalen Markers wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einige Studien belegen, dass eine Vim-Expression mit einer schlechten Prognose verbunden ist (Al-Saad *et al.*, 2008; Tadokoro *et al.*, 2016). Andere zeigen wiederum, dass das Vorhandensein von Vim keine Vorhersagen bezüglich des Gesamtüberlebens und des progressionsfreien Überlebens erlauben (Soltermann *et al.*, 2008; Chikaishi *et al.*, 2011). Auch Dauphin und andere, konnten keinen Zusammenhang zwischen Vim und einem Rezidiv nachweisen, jedoch war das Vorhandensein von Vim signifikant mit dem Auftreten von Metastasen assoziiert (Dauphin *et al.*, 2013). Eine Korrelation der Vim-Expression mit der Ausbildung ferner Metastasen, jedoch nicht mit Lymphknotenmetastasen, fanden auch Tadokoro und Kollegen (Tadokoro *et al.*, 2016). Umgekehrt waren drei der vier im Rahmen dieser Arbeit gefärbten Biopsate durch Lymphknotenmetastasen gekennzeichnet, zeigten jedoch im Primärtumor in den Färbungen nur in wenigen Tumorzellen eine Vim-Expression. Ferne Metastasen traten in den hier untersuchten Biopsaten nicht auf. Nach heutigem Stand der Wissenschaft ist bekannt, dass Lymphknotenmetastasen auftreten können, ohne dass Zellen des Primärtumors eine EMT durchlaufen (Banyard und Bielenberg, 2015). Lymphgefäße besitzen im Gegensatz zu Blutgefäßen keine durchgängige Basalmembran und keine engen interendothelialen Verbindungen und sind deshalb für Zellen leichter permeabel (Leak, 1976; Alitalo und Carmeliet, 2002), sodass auch epitheliale Zellen mit einem geringeren migratorischen und invasiven Potenzial in diese Gefäße eindringen können (Banyard und Bielenberg, 2015). Im Gegensatz dazu, belegen andere Studien, dass für das Überqueren der Basalmembran und für das Eintreten in die Blutbahn die phänotypische Veränderung von Zellen von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp notwendig ist (Polyak und Weinberg, 2009).

Da in dem hier vorgestellten Modell eine EMT in den Tumorzellen induziert werden konnte und eine physiologische Basalmembranstruktur als *in vivo* relevante Barriere vorhanden ist, lag der Fokus im Folgenden auf der Untersuchung invasiver Prozesse, wie sie zunächst bei der Überquerung der epithelialen Basalmembran vorkommt. Eine Schwierigkeit bei der Identifizierung von invasiven Zellen in dem 3D Tumormodell

stellen die erhaltenen Kryptenstrukturen dar. In herkömmlichen Invasionsassays ohne physiologische Basalmembran wie Boyden Kammern mit ECM-Komponenten, die beispielsweise von Cell Biolabs, Inc (USA) oder R&D Systems, Inc (USA) vertrieben werden (Boyden, 1962), gibt es eine in allen Modellen horizontal verlaufende Grenzlinie zwischen nicht-invasiven und invasiven Zellen. Diese ist in den hier vorgestellten 3D Tumormodellen aufgrund der unregelmäßigen Krypten- und Villistrukturen nicht vorhanden. Vielmehr muss beurteilt werden, ob die Zellen in tiefere Kryptenstrukturen migriert sind oder die Zellen tatsächlich die Struktur der Basalmembran überquert haben. Damit dies eingeschätzt werden kann, wurde die Matrix mit Kol IV angefärbt. Kol IV ist ein Bestandteil der Basalmembran (Khoshnoodi *et al.*, 2008; Mak und Mei, 2017) und ermöglicht eine klare Erkennung der Matrixstrukturen wie Dünndarmzotten und Krypten. Dadurch können die Zellen, welche die Basalmembran überquert haben, identifiziert und ausgezählt werden. Mit dieser Methode wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass sowohl in statischer als auch in dynamischer Kultur durch die Stimulation mit TGF- β 1 signifikant mehr Zellen die Basalmembran überqueren als ohne den Wachstumsfaktor. Die Beobachtung, dass nahezu alle invasiven Zellen Vim-positiv waren, lässt darauf schließen, dass diese Zellen durch die EMT ein höheres migratorisches sowie invasives Potenzial besitzen und bestätigt damit die Daten anderer Gruppen (Polyak und Weinberg, 2009; Shao *et al.*, 2017). Zudem lässt sich aber aus den hier präsentierten Ergebnissen vermuten, dass sich die dynamische Kultur vorteilhaft für die Ausbildung einer EMT sowie die Invasion von Zellen in die Matrix auswirkt, da die absolute Zahl an Zellen, welche die Basalmembran überquert hatten, im Bioreaktorsystem höher war. Rizvi und Kollegen beobachteten, dass 3D kultivierte Ovarialkarzinomzellen allein durch hydrodynamische Kräfte in einem mikrofluidischen System eine EMT durchlaufen (Rizvi *et al.*, 2013). Wie bereits weiter oben diskutiert, belegen auch andere Studien einen Einfluss der dynamischen Kultur auf das Zellwachstum und die Ausprägung von Biomarkern.

Auch in den in dieser Arbeit durchgeführten qRT-PCR-Analysen konnten Hinweise dafür gefunden werden, dass die mit TGF- β 1 stimulierten Zellen ein erhöhtes migratorisches bzw. invasives Potenzial besitzen. So führte die Transition von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp zu einer stark erhöhten Genexpression von *SERPINE1* in 2D und 3D. *SERPINE1* ist häufig in Tumorzellen an der invasiven Front von Tumoren lokalisiert (Illemann *et al.*, 2004; Samarakoon *et al.*, 2009) und mit einer er-

höhten Migration und Aggressivität von Tumorzellen verbunden (Mazzoccoli *et al.*, 2012; Qiu *et al.*, 2012). Bemerkenswert ist zudem, dass der Anstieg der Expression von *SERPINE1* in den HCC827-Zellen in 3D deutlich höher im Vergleich zu 2D war, was auf eine Verstärkung der migratorischen Eigenschaften in dreidimensionaler Umgebung hin deutet.

Ein weiteres Gen, welches zum Teil mit der Progression von Krebserkrankungen, zum Beispiel von Magenkrebs, in Verbindung gebracht wird, ist das *AGR2* (Zhang, Jin, *et al.*, 2016). Andere Gruppen beobachteten, dass *AGR2* die Tumormetastasierung von Brusttumorzellen in die Lunge in Xenograftmodellen verstärken kann (Liu *et al.*, 2005). Entgegen der Erwartungen, wurde *AGR2* in dem hier vorgestellten Tumormodell und den parallelen 2D Ansätzen nach TGF- β -Stimulation signifikant schwächer exprimiert. Allerdings wurde bereits in einer Studie von Norris und anderen eine SMAD4-abhängige Unterdrückung der *AGR2*-Expression durch TGF- β beobachtet (Norris *et al.*, 2013). Die Rolle von *AGR2* wird demnach in der Literatur kontrovers diskutiert: Aufgrund der hohen Expression und der noch nicht vollständig verstandenen Funktion wird angenommen, dass *AGR2*, ähnlich wie TGF- β 1, sowohl als Tumorsuppressor als auch als Onkogen fungieren kann (Obacz *et al.*, 2015). Normalerweise ist *AGR2* intrazellulär am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Gupta *et al.*, 2012) und mit der Synthese sekretorischer Proteine assoziiert, die einen Einfluss auf die epitheliale Barriere haben (Pelaseyed *et al.*, 2014). Zudem kann *AGR2* jedoch auch außerhalb der Zelle binden, wo es Bestandteil des Mucus im Gastrointestinaltrakt ist (Pelaseyed *et al.*, 2014). Zusätzlich scheint *AGR2* wichtig für die Expression von Muzinen wie MUC-1 zu sein (Norris *et al.*, 2013). Diese sekretorischen Proteine sind mit einer Reihe von physiologischen Prozessen wie Signaltransduktion, Immunabwehr, Umbau der ECM und Koagulation sowie mit pathophysiologischen Prozessen wie der Modifikation der Tumormikroumgebung, darunter Angiogenese, Invasion und Metastasenbildung, verbunden (Brychtova *et al.*, 2015).

Zusätzlich zu Hinweisen auf eine erhöhte Aggressivität der Tumorzellen konnten Indizien dafür gefunden werden, dass Strukturen der ECM, insbesondere der Basalmembran von den TGF- β 1-stimulierten Zellen degradiert werden. Eine wichtige Rolle bei dem Umbau der ECM spielen MMPs, die im Vergleich zu gesundem Gewebe in nahezu allen Tumoren stärker exprimiert und aktiviert sind. Zudem sind MMPs mit einem fortge-

schrittenem Tumorstadium, einer erhöhten Invasivität sowie einer schlechteren Prognose verbunden (Egeblad und Werb, 2002). Von besonderer Bedeutung ist die MMP9, welche bei NSCLC-Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und fernen Metastasen korreliert, wenn sie im Gewebe überexprimiert wird (Gong *et al.*, 2016). Auch *in vivo* Studien in Ratten belegten eine Korrelation von MMP9 mit der Ausbildung von Metastasen. So war die Anzahl an Zellkolonien in Rattenlungen und damit die Fähigkeit zur Metastasierung nach der Herunterregulierung von MMP9 in Sarkomzellen geringer (Hua und Muschel, 1996). Andere Arbeiten belegten ebenfalls, dass MMP9 für die Intravasation notwendig ist (Kim *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit zeigten qRT-PCR-Analysen, dass HCC827- und A549-Zellen, die eine EMT durchlaufen hatten, das Gen für diese Typ IV-Kollagenase stärker exprimieren, als Zellen, die einen epithelialeren Phänotyp aufweisen. Dabei war der Anstieg der *MMP9*-Expression in der 3D Umgebung in den HCC827-Zellen dreimal und in den A549-Zellen 25-mal so stark im Vergleich zu 2D, was die besondere Bedeutung der ECM und der Zell-Matrix-Kontakte bei der Expression geweberrelevanter Marker herausstellt. Loessner und Kollegen beobachteten ebenfalls, dass die mRNA-Mengen von MMP9 in 3D kultivierten Ovarialkarzinomzellen im Vergleich zu 2D höher waren (Loessner *et al.*, 2010). Interessanterweise ist MMP9 selbst an der Aktivierung von TGF- β 1 beteiligt (Yu und Stamenkovic, 2000). Messungen haben ergeben, dass in dem hier verwendeten Medium geringe Mengen an latenten TGF- β 1 vorhanden sind (Daten nicht gezeigt), welche potentiell durch MMP9 in aktives TGF- β 1 umgewandelt werden und so in einer Rückkopplungsschleife die EMT noch verstärken können.

Ebenfalls positiv auf eine EMT könnte sich die Herunterregulierung der Gene für die MMP-Inhibitoren *TFPI2* und *SPINK2* in den HCC827-Zellen ausgewirkt haben, die in 3D deutlich stärker ausgeprägt war. Kontroverserweise wurde in den A549-Zellen nach Stimulation mit TGF- β 1 höhere Expressionen dieser MMP-Inhibitoren detektiert. Dies deutet möglicherweise daraufhin, dass es ein Gleichgewicht zwischen MMP und MMP-Inhibitoren gibt, welches im Tumor durch den erhöhten Umbau der Matrix generell zu höheren Konzentrationen führt (Egeblad und Werb, 2002). In der Literatur gibt es Beispiele, die zeigen, dass hohe Konzentrationen an weiteren MMP-Inhibitoren wie TIMP-1 und -2 mit einer schlechten Prognose verbunden sind, auch wenn diese nicht ursächlich für fortgeschrittene Tumorstadien sind (Egeblad und Werb, 2002). Zudem belegten Tierexperimente, dass TIMP-2 ein wichtiger Aktivator von MMP2 ist (Wang

et al., 2000) und somit auch andere MMP-Inhibitoren einen progressiven Einfluss auf MMPs haben könnten.

Neben einer erhöhten Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung wird die Induktion einer EMT häufig mit einer erhöhten Chemoresistenz gegenüber konventionellen und zielgerichteten Therapien assoziiert (Fischer *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2015). So sind einige Tumore, darunter Lungen- und Darmkarzinome, die Merkmale einer EMT besitzen, durch eine geringere Sensitivität gegenüber EGFR-Kinase-Inhibitoren gekennzeichnet (Witta *et al.*, 2006; Barr *et al.*, 2008). Es wird diskutiert, dass die EMT und dadurch möglicherweise auftretende Resistenzen mit dem Erwerb von Stammzellcharakteristika einherzugehen, da in resistenten Tumoren nach einer Standardchemotherapie oft Krebszellen mit Stammzeleigenschaften zu finden sind (Mani *et al.*, 2008; Polyak und Weinberg, 2009). In Patienten mit Brustkrebs, die eine neoadjuvante Therapie bekommen haben, wurde beispielsweise ein signifikanter Anstieg von CD44⁺/CD24⁻-Zellen, die EMT-assoziierte Gene exprimieren, detektiert (Li *et al.*, 2008). Es gibt jedoch auch Studien, die belegen, dass basale mesenchymale Tumore initial besser auf eine neoadjuvante Chemotherapie ansprechen, als epitheliale lumbale Tumore (Yauch *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2009). Im Allgemeinen wird das prognostische Potenzial von EMT-Markern, wie bereits weiter oben beschrieben, in der Literatur kontrovers diskutiert (Chikaishi *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013). Daher wurde in dem hier vorgestellten Modell untersucht, ob sich die Antwort der HCC827-Zellen auf den TKI Gefitinib nach Stimulation mit TGF- β 1 und der damit verbundenen EMT-Induktion ändert. Jedoch zeigten die stimulierten HCC827-Zellen eine vergleichbare Antwort auf die EGFR-Inhibierung wie die nicht stimulierten Zellen. Dies entspricht auch einigen klinischen Fallstudien, die belegen, dass TKI in Metastasen wirken (Zhu und Chai, 2016; Nair *et al.*, 2017; Peng und Gong, 2017).

Da in dem hier vorgestellten Modell durch Induktion einer EMT keine Resistenz ausgelöst werden konnte, wurde ein anderer Weg gewählt, um diesen Prozess zu untersuchen. Dafür erfolgte zunächst die Selektion resistenter Subpopulationen aus den HCC827-Zellen, die, wie bereits publiziert (Stratmann *et al.*, 2014) und in der vorliegenden Arbeit gezeigt, sensitiv gegenüber dem EGFR-Inhibitor Gefitinib sind. Nach einem modifizierten Protokoll basierend auf Publikationen von Engelman und Kollegen sowie Ogino und Kollegen (Engelman *et al.*, 2007; Ogino *et al.*, 2007), wurden die HCC827-

Zellen dauerhaft einem Selektionsdruck mit Gefitinib ausgesetzt, der im Überleben der resistenten Zellen resultierte. Zwei der drei Versuchsansätze stellten sich nach ca. vier Monaten als resistent gegenüber einer Dosis von 1 μ M Gefitinib heraus, wohingegen die andere Subpopulation nur zum Teil resistent geworden war. Eine vollständige Resistenz dieser Population hätte sich wahrscheinlich bei noch längerer Selektion ausgebildet. Da jedoch zwei resistente Ansätze zur weiteren Untersuchung zur Verfügung standen, wurde dies nicht weiter verfolgt. In der Literatur sind verschiedene Mechanismen beschrieben, die nach einer Therapie mit einem TKI zur Resistenz führen können (Hammerman *et al.*, 2009; Oxnard *et al.*, 2011; Gomez *et al.*, 2013). So ist die Entwicklung von Resistenzen in Patienten häufig durch die Entstehung von sekundären Mutationen begründet. In ca. 50 % der Patienten, die eine Resistenz ausbilden, wurde eine T790M-Mutation im Exon 20 der *EGFR*-Kinase Domäne nachgewiesen (Kobayashi *et al.*, 2005; Hammerman *et al.*, 2009). Weiterhin tritt bei 20 % der Patienten eine *MET*-Amplifikation auf (Engelman *et al.*, 2007; Yano *et al.*, 2008). Ebenfalls können Mutationen in Proteinen des intrinsischen PI3K-Signalwegs für die Entwicklung einer Resistenz verantwortlich sein (Hammerman *et al.*, 2009). Obwohl diese Mutationen auch in resistenten Zelllinien in *in vitro*-Studien nachgewiesen wurden (Ogino *et al.*, 2007; Cross *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2015), konnte keine der bekannten genetischen Veränderungen in den in dieser Arbeit vorgestellten resistenten HCC827-Subpopulationen mittels DNA-Sequenzierung festgestellt werden. In den Sequenzierungsdaten zeigte sich in der Gefitinib-sensitiven HCC827-Zelllinie und den resistenten Subpopulationen zunächst eine Deletion von 15 Basen im Exon 19 der Tyrosin-Kinase-Domäne des *EGFR*. Diese ist in der Literatur mit einer Antwort auf TKI assoziiert (Lynch *et al.*, 2004) und für die HCC827-Zelllinie beschrieben (Walter *et al.*, 2013). In den resistenten Subpopulationen gab es zusätzliche Genveränderungen, die für die Resistenzausbildung verantwortlich sein könnten. In den duplizierten Regionen auf Chromosom 11 und 17, die in den HCCres A2 detektiert werden konnten, sind beispielsweise wichtige krebsassoziierte Gene lokalisiert. Zusätzlich wurden die in den HCCres A2- und A3-, jedoch nicht in den HCC827-Zellen, gefundenen pathogenen Mutationen mittels Gene Ontology Annotation (www.geneontology.org) auf ihre biologischen Funktionen untersucht. Dabei konnte eine Vielzahl an Funktionen der betroffenen Proteine gefunden werden. So ist CYP2B6 in metabolischen Prozessen von Medikamenten, SAA1 in der Aktivierung des MAPK-Signalwegs und SOX17 in der Angiogenese sowie dem Wnt-Signalweg invol-

viert. Aufgrund dieser wichtigen biologischen Prozesse, sind die genannten Mutationen für weitere bioinformatische Analysen besonders interessant.

Ein weiterer Mechanismus der zur Resistenzbildung führen kann, ist eine veränderte miRNA-Expression und damit eine veränderte Translation von mRNAs (Gomez *et al.*, 2013). Dabei ist besonders die miRNA-21 von Bedeutung, welche negative Regulatoren des EGFR-Signalweges inhibiert. In Brustkrebsmodellen konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Aktivität der miRNA-21 zu einer erworbenen Resistenz der Tumorzellen gegenüber dem anti-Her2/neu-Antikörper Trastuzumab führt (Gong *et al.*, 2011). Dabei waren die resistenten Zellen durch eine niedrige Expression von PTEN gekennzeichnet, was in einer gesteigerten Signalübertragung über den PI3K-Weg resultierte (Mellinghoff *et al.*, 2007). Dementsprechend konnte in Glioblastoma-Zelllinien beobachtet werden, dass die Inhibierung der miRNA-21 mit einer erhöhten PTEN-Expression und einer verringerten Tumorigenität assoziiert war (Zhou *et al.*, 2010). Shen und Kollegen untersuchten Tumorgewebe von 47 NSCLC-Patienten und fanden, dass die miRNA21/PTEN-Expression mit der Sensitivität gegenüber TKI korreliert (Shen *et al.*, 2014). Anschließend zeigten sie *in vitro*, dass die miRNA-21 stärker und PTEN schwächer in Gefitinib-resistenten PC9-Zellen im Vergleich zu sensitiven Zellen exprimiert wird. Aufgrund dessen war zu vermuten, dass die miRNA-21 auch eine Rolle bei den in dieser Arbeit vorgestellten resistenten Zellen spielen könnte. Jedoch wurde dies mit der Quantifizierung der miRNA-21 in den resistenten Subpopulationen im Vergleich zu den Gefitinib-sensitiven HCC827-Zellen nicht bestätigt. Möglicherweise war eine andere miRNA für die Entstehung der Resistenz ursächlich, wie die miRNA Let-7, miRNA-34 oder miRNA-221/222, welche alle den EGFR-Signalweg beeinflussen (Gomez *et al.*, 2013). Da der Nachweis der miRNA im Vergleich zu anderen Methoden jedoch sehr zeitaufwändig und kostenintensiv ist, wurden zunächst keine anderen miRNAs betrachtet, sondern eine genauere phänotypische Charakterisierung vorgenommen. Hier zeigte sich, dass die resistenten Zellen eine EMT durchlaufen hatten. So waren epitheliale Marker wie E-Cad und PCK stark herunter reguliert und im Gegensatz dazu war der mesenchymale Marker Vim deutlich stärker exprimiert. Aus den vorhergehenden Ergebnissen der TGF- β 1-Stimulationsversuche lässt sich somit schlussfolgern, dass in dem hier verwendeten 3D Tumormodell eine EMT zwar nicht ursächlich für eine Resistenz gegenüber Gefitinib war, dass jedoch die Ausbildung einer Resistenz von einer EMT begleitet wurde. Diese Beobachtung machten auch Zhao und Kollegen: Ge-

fitinib-resistente NCI-H1975 NSCLC-Zellen hatten eine geringere E-Cad- und eine höhere Vim-Expression im Vergleich zu ihren sensitiven Ursprungszellen (Zhao *et al.*, 2015). Analog dazu können auch andere Chemotherapeutika wie Cisplatin eine EMT induzieren (Kurokawa *et al.*, 2013). Da Tumorbiopsate, die einen zeitlichen Ablauf der Resistenzentstehung abbilden nur schwer verfügbar sind, ist die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen EMT und Resistenz im Patienten schwierig (Jakobsen *et al.*, 2016). Sequist und Kollegen detektierten in drei aus 37 Re-Biopsaten von Patienten mit wiederkehrenden NSCLC nach Erlotinib-Behandlung Merkmale einer EMT (Sequist *et al.*, 2011). Dabei ist jedoch nicht klar, ob die EMT nur begleitend auftrat oder Ursache der Resistenz war. Die meisten Re-Biopsate werden zudem nicht auf EMT untersucht, was eine Einschätzung bezüglich des Auftretens von EMT alleine oder zusammen mit anderen Resistenzmechanismen *in vivo* weiter erschwert. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen das Potenzial des Modells, solche Fragestellungen zu untersuchen. Zukünftig kann beispielsweise analysiert werden, ob die resistenten Zellen durch Medikamente, welche die EMT revertieren, wieder sensitiv gegenüber dem anfänglich eingesetzten TKI Gefitinib werden. Zusätzlich können mögliche Unterschiede in der Wirkungsweise der Medikamente auf die durch Gefitinib induzierte im Vergleich zu der durch TGF- β 1 induzierten EMT betrachtet werden.

Zur Untersuchung der Unterschiede der resistenten Subpopulationen, die im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden, im Vergleich zu den Gefitinib-sensitiven HCC827-Zellen, wurden neben den oben beschriebenen morphologischen Änderungen auch Veränderungen in der Signaltransduktion nach Gefitinib-Behandlung betrachtet. Dabei waren die Zellen ohne Gefitinib im Wesentlichen durch eine vergleichbare Aktivierung der betrachteten Proteine charakterisiert. Lediglich der IGF1R war in den resistenten Populationen im Gegensatz zu den sensitiven unbehandelten HCC827-Zellen aktiviert. Zusätzlich zeigten nach Gefitinib-Behandlung auch die sensitiven Zellen eine Aktivierung dieses Rezeptors. Es wurde bereits mehrfach beschrieben, dass eine veränderte Aktivierung des IGF1R in Patienten mit einer Resistenz gefunden werden kann und mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Hurbin *et al.*, 2011; Agullo-Ortuno *et al.*, 2015). Hurbin und Kollegen beobachteten sogar, dass eine IGF1R-Inhibierung primär resistente NSCLC-Zellen sensitiv gegenüber Gefitinib macht (Hurbin *et al.*, 2011). Die veränderte Aktivierung von IGF1R in den hier beschriebenen Subpopulationen könnte somit einen Ansatzpunkt für eine Therapie darstellen. Weitere Unterschiede in der Signal-

transduktion zeigten sich zudem nach der Behandlung mit Gefitinib: pERK1/2 war nach der Therapie in den resistenten Zellen nicht so stark inaktiviert wie in den sensitiven Zellen. Zudem wiesen die HCCres A2 eine schwächere Inaktivierung des HGFR und die HCCres A3 von Akt im Vergleich zu den jeweils anderen zwei Zellpopulationen auf. Dies deutet daraufhin, dass die resistenten Zellen die Signaltransduktion über den EGFR kompensieren, indem sie auf andere RTKs ausweichen (z.B.: IGF1R oder HGFR) und dadurch eine Signalweiterleitung über den PI3K/Akt und den ERK1/2-Signalweg stattfinden kann. Eine Aktivierung von Akt, die in resistenten HCC-Zellen nach Gefitinib-Zugabe noch vorhanden ist, detektierten auch Engelman und andere (Engelman *et al.*, 2007). Zudem ist die Aktivierung des PI3K-Signalweges ein häufig beobachteter Resistenzmechanismus (Gomez *et al.*, 2013). Für das Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen der Resistenzentstehung und zur Identifizierung neuer Therapiestrategien bei Sekundärresistenzen, dienen die oben vorgestellten Daten nun als Grundlage für bioinformatische Simulationen. In Göttlich *et al.* (2016) wurde bereits eine Resistenzbildung aufgrund einer Koaktivierung des HGFR mit primärer *EGFR*-Mutation simuliert. Dabei wurde eine Kombinationstherapie mit PI3K- und MEK-Inhibitoren vorgeschlagen. Diese Inhibitoren sind auch hier vielversprechend, da diese Signalwege nach den Western Blot Ergebnissen in den resistenten Zellen noch aktiv sind. Jedoch muss das bioinformatische Modell für genauere Aussagen, unter der Berücksichtigung der DNA-Sequenzierungsdaten und der weiteren oben beschriebenen Ergebnisse, weiter angepasst werden.

6.4 Testung alternativer Therapiestrategien im 3D Tumormodell

Im Bereich der Onkologie haben in den letzten Jahren, neben den zielgerichteten Therapien, immuntherapeutische Strategien Erfolge in der Klinik erzielt. Dabei hat sich unter anderem der adoptive Transfer von genetisch modifizierten T-Zellen als vielversprechender Ansatz in der Behandlung von Krebs herausgestellt. Vor allem der Einsatz von CAR T-Zellen bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen hat herausragende Ergebnisse erzielt, mit dem Potenzial, dass Patienten auch nach langer Zeit tumorfrei sind (Kochenderfer *et al.*, 2012; Brentjens *et al.*, 2013). Ein Ziel ist es, diese Immuntherapie auch für solide Tumore zu etablieren, wobei einige Herausforderungen zu bewältigen sind. Diese reichen von der Identifizierung eines geeigneten Zielmoleküls, über die T-

Zell-Persistenz und Expansion bis hin zu Immunresistenzmechanismen in der Tumormikroumgebung (Newick *et al.*, 2016; Zhang, Qin, *et al.*, 2016). Eines der größten Hindernisse stellt jedoch die Tatsache dar, dass die T-Zellen nicht nur zum Tumor gelangen, sondern auch tief in das Tumorgewebe infiltrieren müssen. Bisher gibt es keine geeigneten *in vitro* Modelle, um diese Fähigkeiten der genetisch veränderten T-Zellen hinreichend zu untersuchen. Herkömmliche 2D Modelle sind, wie bereits oben beschrieben, nicht in der Lage die *in vivo* Situation adäquat abzubilden. Es kann zwar gezeigt werden, dass die CAR T-Zellen grundsätzlich spezifisch mit den Tumorzellen interagieren (Kalaitidou *et al.*, 2015), jedoch fehlen den Modellen neben einer physiologischen Gewebearchitektur vor allem Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen sowie eine Grenze zwischen Tumor- und T-Zellen, wie etwa eine Endothelbarriere. Diese Parameter können die Effektivität der T-Zellen erheblich beeinflussen. Weiterhin erlauben die 2D Modelle lediglich die Analyse von kurzzeitigen Effekten und nicht die für die Immuntherapie häufig wichtigeren Langzeitwirkungen.

In dem hier vorgestellten 3D Lungentumor-Testsystem, das eine komplexe Gewebestruktur besitzt, sollte deshalb untersucht werden, ob es für eine Testung von neuartigen Therapiestrategien wie der CAR T-Zell-Therapie geeignet ist. In ersten Versuchen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass sowohl untransduzierte KT-Zellen als auch Zellen, die einen chimären Antigenrezeptor tragen mit den Tumorzellen interagieren und die CAR T-Zellen in dem statischen Modell zu einer dosisabhängigen Lyse der Tumorzellen führen. Die KT-Zellen desselben Spenders lösten hingegen keine Tumorzellyse aus. Falls es gelingt, die im Modell verwendeten Dosen in Zukunft mit denen im Patienten zu korrelieren, würde das Tumormodell eine Plattform zur Toxizitätstestung bieten, in denen „*on-target, on-tumor*“-Effekte untersucht werden können. Eine Kokultur mit gesunden Zellen würde eine erweiterte Aussage bezüglich der „*off-tumor*“-Toxizität liefern. Aus diesen resultieren besonders schwere Nebenwirkungen einer CAR T-Zelltherapie, die bis zum Tod des Patienten führen können (Kalaitidou *et al.*, 2015). Deshalb ist es essentiell ein Zielmolekül für die Therapie zu wählen, das auf den Tumorzellen, jedoch möglichst nicht oder nur in geringem Maß auf gesunden Zellen im Körper vorkommt.

Ein Antigen, welches diese Anforderungen erfüllt und gegen welches die hier verwendeten CAR T-Zellen gerichtet sind, ist das Oberflächenprotein ROR1. Diese RTK wird während der Embryogenese in vielen Geweben, in einer Reihe verschiedener humaner

Karzinome (Zhang, Chen, Wang-Rodriguez, *et al.*, 2012), unter anderem in Adenokarzinomen der Lunge (Liu *et al.*, 2015) sowie in zahlreichen Krebszelllinien exprimiert. Im normalen, adulten Gewebe kommt ROR1 jedoch nur in sehr geringen Konzentrationen in dem Pankreas, der Lunge, in B-Zell-Vorläufern und in Adipozyten vor (Hudecek *et al.*, 2010). In Tumoren ist ROR1 mit einem gesteigerten Wachstum assoziiert (Zhang, Chen, Cui, *et al.*, 2012), weshalb es ein geeignetes Zielmolekül in der Krebstherapie darstellt. Tatsächlich konnte beobachtet werden, dass ROR1-CAR T-Zellen einen Effekt auf das Wachstum und das Überleben solider Tumorzellen in B-Zell-Lymphomen (Hudecek *et al.*, 2010) sowie in Sarkom-Modellen der Maus (Huang *et al.*, 2015) haben. Zur Testung der ROR1-CAR T-Zellen in dem *in vitro* Tumortestsystem, wurde das Modell mit A549-Zellen aufgebaut, da diese sowohl in 2D (Liu *et al.*, 2015) als auch in 3D das Antigen exprimieren und deshalb auf die Therapie ansprechen sollten. Nachdem, wie oben beschrieben, eine dosisabhängige Lyse der Tumorzellen nach ROR1-CAR T-Zell-Zugabe im statischen Modell beobachtet werden konnte, wurde im nächsten Schritt eine Therapie im Bioreaktor angewendet. Das dynamische System ermöglicht eine bessere Beurteilung der Tumorzielsteuerung und der Tumordinfiltration durch die T-Zellen, da diese zum Zeitpunkt der Zugabe keinen Kontakt mit den Tumorzellen haben. Nach fünf Tagen Behandlung konnten CD45-positive T-Zellen in dem Tumorgewebe nachgewiesen und ein Anstieg der Apoptose in den Tumorzellen, die mit ROR1-CAR T-Zellen behandelt wurden, detektiert werden. Dies belegt, dass die ROR1-spezifischen CAR T-Zellen in der Lage sind aktiv an dem Tumor zu adhären, diesen zu infiltrieren und anschließend die Tumorzellen zu lysieren. Neben der Analyse des Therapieeffektes auf die Tumorzellen, können in dem Modell ebenfalls die Eigenschaften der T-Zellen untersucht werden. So wurde neben einer spezifischen Aktivierung und Zytokinausschüttung der ROR1-CAR T-Zellen ermittelt, dass diese eine höhere Proliferationsrate im Vergleich zu KT-Zellen besaßen und damit in der Lage waren, in dem Tumor zu persistieren und zu expandieren – wichtige Eigenschaften in der späteren Anwendung im Patienten (Zhang, Ye, *et al.*, 2016).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das komplexe 3D Tumortestsystem, vor allem im dynamischen System, ein vielversprechendes Modell zur Testung und Verbesserung von immuntherapeutischen Ansätzen, insbesondere der CAR T-Zelltherapie ist.

7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, das humane 3D Lungentumor-Testsystem weiter zu entwickeln und dessen Anwendbarkeit zur Untersuchung verschiedener Fragestellungen zu zeigen. Zukünftig könnte das vorgestellte Modell in der präklinischen Entwicklung von Krebsmedikamenten verwendet werden. Die dafür notwendige weitere Validierung wird im Rahmen des vom BMBF geförderten Projekts Remis 3R, Förderkennzeichen 031L0129B, stattfinden. Gegenstand dieses Projektes ist die Validierung des *in vitro* Modells, besonders in der Kombination mit den *in silico* Vorhersagen, in weiteren Studien im Vergleich zur Klinik und zu Tiermodellen. Untersucht werden sollen dabei weitere zielgerichtete Therapiestrategien wie eine Testung von Crizotinib bei *ALK*-Translokation im Vergleich zu *ALK*-Wildtyp. Zusätzlich werden *in silico* Vorhersagen zur Therapie *KRAS*-mutierter Tumore *in vitro* getestet und die Ergebnisse mit Testungen in PDX-Mausmodellen verglichen. Ebenfalls erfolgt die Untersuchung von Therapiestrategien für die Gefitinib-resistenten Subpopulationen im 3D Modell und im Mausmodell.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Entwicklung von realistischeren Tumormodellen ist neben einer 3D Umgebung die Kokultur mit anderen Zelltypen. In vielen Studien wurde gezeigt, dass die Interaktion mit Stromazellen eine wichtige Rolle bei dem Wachstum und der Differenzierung der Tumorzellen spielt und die Resistenz gegenüber Medikamenten entscheidend beeinflusst. Da das hier vorgestellte Modell modular aufgebaut ist, können je nach Fragestellung verschiedene Zelltypen hinzugefügt werden. Dabei sind zunächst besonders Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen interessant, da sie den Tumor auf vielfältigste Weise beeinflussen. Besonders im Hinblick auf die Testung verschiedener Immuntherapien ist es notwendig die Zell-Zell-Interaktionen zwischen den Tumor- und Stromazellen abzubilden, da es eine Reihe immunregulatorischer Mechanismen zu berücksichtigen gilt, die das Ergebnis der Therapie verändern können. Zudem können durch die Integrierung von Endothelzellen und damit der Vaskularisierung der Tumormodelle *in vivo* relevante Barrieren dargestellt werden, welche z.B. CAR T-Zellen überwinden müssen, bevor sie in das Tumorgewebe eindringen können.

Besonders interessant bei der Betrachtung immuntherapeutischer Ansätze ist auch die Austestung von Kombinationstherapien, z.B. mit Immuncheckpointinhibitoren wie PD-1/PDL-1- oder CTLA-4-Inhibitoren, da sich diese in den letzten Jahren als vielversprechende Medikamente in der Bekämpfung von Krebserkrankungen herausgestellt haben. Diese Antikörper wirken nicht direkt auf die Krebszellen, sondern greifen in die Steuerung der Immunantwort gegen den Tumor ein und können somit eine Blockade der Immunabwehr wieder aufheben. Es wäre denkbar diese Immuncheckpointinhibitoren in Kombination mit CAR T-Zellen oder zielgerichteten Therapien in dem 3D Modell zu testen.

Weiterhin wird es in Zukunft ebenfalls wichtig sein, nicht nur die Tumormikroumgebung abzubilden, sondern auch gesunde Zellen in das Testsystem zu integrieren, die eine Untersuchung möglicher toxischer Effekte ermöglichen.

Letztendlich ist es besonders interessant primäre Tumorzellen in die Modelle einzubringen und damit personalisierte Tumormodelle aufzubauen. Um dies zu gewährleisten müssten die bereits vorhandenen Isolationsprotokolle sowie die Kultur dieser Zellen auf der Matrix weiter optimiert werden.

Das Modell kann durch dessen Modularität nicht nur zur Austestung verschiedenster Therapiestrategien dienen, sondern es könnte auch einen entscheidenden Beitrag in der Grundlagenforschung liefern. Durch sukzessive Erhöhung der Komplexität der Modelle können Effekte, welche die einzelnen Komponenten auf das Gesamtsystem haben, möglicherweise besser verstanden werden, als bei der Betrachtung von *in vivo* Tumoren.

Literatur

- Acquaviva, J.; Smith, D. L.; Sang, J.; Friedland, J. C.; He, S.; Sequeira, M.; Zhang, C.; Wada, Y. und Proia, D. A. (2012). „Targeting KRAS-mutant non-small cell lung cancer with the Hsp90 inhibitor ganetespib", *Mol Cancer Ther* 11, S. 2633-2643.
- Agullo-Ortuno, M. T.; Diaz-Garcia, C. V.; Agudo-Lopez, A.; Perez, C.; Cortijo, A.; Paz-Ares, L.; Lopez-Rios, F., *et al.* (2015). „Relevance of insulin-like growth factor 1 receptor gene expression as a prognostic factor in non-small-cell lung cancer", *J Cancer Res Clin Oncol* 141, S. 43-53.
- Al-Saad, S.; Al-Shibli, K.; Donnem, T.; Persson, M.; Bremnes, R. M. und Busund, L. T. (2008). „The prognostic impact of NF-kappaB p105, vimentin, E-cadherin and Par6 expression in epithelial and stromal compartment in non-small-cell lung cancer", *Br J Cancer* 99, S. 1476-1483.
- Albert, B; Johnson, A; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Walter, P (2008). *Molecular Biology of the Cell 5th edition* (Garland Science).
- Albini, A.; Iwamoto, Y.; Kleinman, H. K.; Martin, G. R.; Aaronson, S. A.; Kozlowski, J. M. und McEwan, R. N. (1987). „A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells", *Cancer Res* 47, S. 3239-3245.
- Algarra, I.; Collado, A. und Garrido, F. (1997). „Altered MHC class I antigens in tumors", *Int J Clin Lab Res* 27, S. 95-102.
- Alitalo, K. und Carmeliet, P. (2002). „Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease", *Cancer Cell* 1, S. 219-227.
- Anagnostou, V. K. und Brahmer, J. R. (2015). „Cancer immunotherapy: a future paradigm shift in the treatment of non-small cell lung cancer", *Clin Cancer Res* 21, S. 976-984.
- Arteaga, C. L. (2003). „ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer", *Exp Cell Res* 284, S. 122-130.
- Badylak, S. F.; Taylor, D. und Uygun, K. (2011). „Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds", *Annu Rev Biomed Eng* 13, S. 27-53.
- Baker, B. M. und Chen, C. S. (2012). „Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues", *J Cell Sci* 125, S. 3015-3024.
- Balak, M. N.; Gong, Y.; Riely, G. J.; Somwar, R.; Li, A. R.; Zakowski, M. F.; Chiang, A., *et al.* (2006). „Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors", *Clin Cancer Res* 12, S. 6494-6501.
- Banyard, J. und Bielenberg, D. R. (2015). „The role of EMT and MET in cancer dissemination", *Connect Tissue Res* 56, S. 403-413.
- Barr, S.; Thomson, S.; Buck, E.; Russo, S.; Petti, F.; Sujka-Kwok, I.; Eyzaguirre, A., *et al.* (2008). „Bypassing cellular EGF receptor dependence through epithelial-to-mesenchymal-like transitions", *Clin Exp Metastasis* 25, S. 685-693.
- Baselga, J.; Rischin, D.; Ranson, M.; Calvert, H.; Raymond, E.; Kieback, D. G.; Kaye, S. B., *et al.* (2002). „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* 20, S. 4292-4302.

- Bastid, J. (2012). „EMT in carcinoma progression and dissemination: facts, unanswered questions, and clinical considerations", *Cancer Metastasis Rev* 31, S. 277-283.
- Beatty, G. L. und O'Hara, M. (2016). „Chimeric antigen receptor-modified T cells for the treatment of solid tumors: Defining the challenges and next steps", *Pharmacol Ther.*
- Benton, G.; George, J.; Kleinman, H. K. und Arnaoutova, I. P. (2009). „Advancing science and technology via 3D culture on basement membrane matrix", *J Cell Physiol* 221, S. 18-25.
- Bergers, G.; Brekken, R.; McMahon, G.; Vu, T. H.; Itoh, T.; Tamaki, K.; Tanzawa, K., *et al.* (2000). „Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis", *Nat Cell Biol* 2, S. 737-744.
- Bhattacharjee, Y. (2012). „Biomedicine. Pharma firms push for sharing of cancer trial data", *Science* 338, S. 29.
- Bhattacharya, S.; Socinski, M. A. und Burns, T. F. (2015). „KRAS mutant lung cancer: progress thus far on an elusive therapeutic target", *Clin Transl Med* 4, S. 35.
- Bierie, B. und Moses, H. L. (2006). „Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer", *Nat Rev Cancer* 6, S. 506-520.
- Bissell, M. J. und Radisky, D. (2001). „Putting tumours in context", *Nat Rev Cancer* 1, S. 46-54.
- Boyden, S. (1962). „The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes", *J Exp Med* 115, S. 453-466.
- Bray, F.; Ren, J. S.; Masuyer, E. und Ferlay, J. (2013). „Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008", *Int J Cancer* 132, S. 1133-1145.
- Brentjens, R. J.; Davila, M. L.; Riviere, I.; Park, J.; Wang, X.; Cowell, L. G.; Bartido, S., *et al.* (2013). „CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia", *Sci Transl Med* 5, S. 177ra138.
- Breslin, S. und O'Driscoll, L. (2013). „Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery", *Drug Discov Today* 18, S. 240-249.
- Broers, J. L.; Rot, M. K.; Oostendorp, T.; Bepler, G.; De Leij, L.; Carney, D. N.; Vooijs, G. P. und Ramaekers, F. C. (1988). „Spontaneous changes in intermediate filament protein expression patterns in lung cancer cell lines", *J Cell Sci* 91 (Pt 1), S. 91-108.
- Bronte, G.; Rizzo, S.; La Paglia, L.; Adamo, V.; Siragusa, S.; Ficarella, C.; Santini, D., *et al.* (2010). „Driver mutations and differential sensitivity to targeted therapies: a new approach to the treatment of lung adenocarcinoma", *Cancer Treat Rev* 36 Suppl 3, S. S21-29.
- Brooks, P. C.; Stromblad, S.; Sanders, L. C.; von Schalscha, T. L.; Aimes, R. T.; Stetler-Stevenson, W. G.; Quigley, J. P. und Cheresch, D. A. (1996). „Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3", *Cell* 85, S. 683-693.
- Brower, M.; Carney, D. N.; Oie, H. K.; Gazdar, A. F. und Minna, J. D. (1986). „Growth of cell lines and clinical specimens of human non-small cell lung cancer in a serum-free defined medium", *Cancer Res* 46, S. 798-806.
- Brychtova, V.; Mohtar, A.; Vojtesek, B. und Hupp, T. R. (2015). „Mechanisms of anterior gradient-2 regulation and function in cancer", *Semin Cancer Biol* 33, S. 16-24.

- Burke, J. F.; Yannas, I. V.; Quinby, W. C., Jr.; Bondoc, C. C. und Jung, W. K. (1981). „Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury", *Ann Surg* 194, S. 413-428.
- Caponigro, G. und Sellers, W. R. (2011). „Advances in the preclinical testing of cancer therapeutic hypotheses", *Nat Rev Drug Discov* 10, S. 179-187.
- Cavarga, I.; Kocan, P.; Boor, A.; Belak, J.; Zak, V.; Kluchova, Z.; Slavik, L. und Tkacova, R. (2009). „Immunohistochemical markers of proliferation and vascularisation in preneoplastic bronchial lesions and invasive non-small cell lung cancer", *Neoplasma* 56, S. 414-421.
- „Ceritinib gains FDA approval for lung cancer" (2014). *Cancer Discov* 4, S. 753-754.
- Chang, J. C. (2016). „Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance", *Medicine (Baltimore)* 95, S. S20-25.
- Chatterjee, S.; Bhattacharya, S.; Socinski, M. A. und Burns, T. F. (2016). „HSP90 inhibitors in lung cancer: promise still unfulfilled", *Clin Adv Hematol Oncol* 14, S. 346-356.
- Chen, K.; Huang, Y. H. und Chen, J. L. (2013). „Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges", *Acta Pharmacol Sin* 34, S. 732-740.
- Chen, X.; Xu, H.; Wan, C.; McCaigue, M. und Li, G. (2006). „Bioreactor expansion of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells", *Stem Cells* 24, S. 2052-2059.
- Chikaishi, Y.; Uramoto, H. und Tanaka, F. (2011). „The EMT status in the primary tumor does not predict postoperative recurrence or disease-free survival in lung adenocarcinoma", *Anticancer Res* 31, S. 4451-4456.
- Cragg, M. S.; Kuroda, J.; Puthalakath, H.; Huang, D. C. und Strasser, A. (2007). „Gefitinib-induced killing of NSCLC cell lines expressing mutant EGFR requires BIM and can be enhanced by BH3 mimetics", *PLoS Med* 4, S. 1681-1689; discussion 1690.
- Cree, I. A.; Glaysher, S. und Harvey, A. L. (2010). „Efficacy of anti-cancer agents in cell lines versus human primary tumour tissue", *Curr Opin Pharmacol* 10, S. 375-379.
- Cross, D. A.; Ashton, S. E.; Ghiorghiu, S.; Eberlein, C.; Nebhan, C. A.; Spitzler, P. J.; Orme, J. P., *et al.* (2014). „AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer", *Cancer Discov* 4, S. 1046-1061.
- Dauphin, M.; Barbe, C.; Lemaire, S.; Nawrocki-Raby, B.; Lagonotte, E.; Delepine, G.; Birembaut, P.; Gilles, C. und Polette, M. (2013). „Vimentin expression predicts the occurrence of metastases in non small cell lung carcinomas", *Lung Cancer* 81, S. 117-122.
- David, L.; Dulong, V.; Le Cerf, D.; Cazin, L.; Lamacz, M. und Vannier, J. P. (2008). „Hyaluronan hydrogel: an appropriate three-dimensional model for evaluation of anticancer drug sensitivity", *Acta Biomater* 4, S. 256-263.
- de Castro Carpeno, J. und Belda-Iniesta, C. (2013). „KRAS mutant NSCLC, a new opportunity for the synthetic lethality therapeutic approach", *Transl Lung Cancer Res* 2, S. 142-151.
- De Raedt, T.; Walton, Z.; Yecies, J. L.; Li, D.; Chen, Y.; Malone, C. F.; Maertens, O., *et al.* (2011). „Exploiting cancer cell vulnerabilities to develop a combination therapy for ras-driven tumors", *Cancer Cell* 20, S. 400-413.

- Dong, Z.; Ren, L.; Lin, L.; Li, J.; Huang, Y. und Li, J. (2015). „Effect of microRNA-21 on multidrug resistance reversal in A549/DDP human lung cancer cells", *Mol Med Rep* 11, S. 682-690.
- Dumont, N.; Wilson, M. B.; Crawford, Y. G.; Reynolds, P. A.; Sigaroudinia, M. und Tlsty, T. D. (2008). „Sustained induction of epithelial to mesenchymal transition activates DNA methylation of genes silenced in basal-like breast cancers", *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, S. 14867-14872.
- Eberhard, D. A.; Johnson, B. E.; Amler, L. C.; Goddard, A. D.; Heldens, S. L.; Herbst, R. S.; Ince, W. L., *et al.* (2005). „Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib", *J Clin Oncol* 23, S. 5900-5909.
- Egeblad, M. und Werb, Z. (2002). „New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression", *Nat Rev Cancer* 2, S. 161-174.
- Eger, A.; Stockinger, A.; Schaffhauser, B.; Beug, H. und Foisner, R. (2000). „Epithelial mesenchymal transition by c-Fos estrogen receptor activation involves nuclear translocation of beta-catenin and upregulation of beta-catenin/lymphoid enhancer binding factor-1 transcriptional activity", *J Cell Biol* 148, S. 173-188.
- Engelman, J. A.; Zejnullahu, K.; Mitsudomi, T.; Song, Y.; Hyland, C.; Park, J. O.; Lindeman, N., *et al.* (2007). „MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling", *Science* 316, S. 1039-1043.
- Ettinger, D. S. (2012). „Ten years of progress in non-small cell lung cancer", *J Natl Compr Canc Netw* 10, S. 292-295.
- Fallica, B.; Maffei, J. S.; Villa, S.; Makin, G. und Zaman, M. (2012). „Alteration of cellular behavior and response to PI3K pathway inhibition by culture in 3D collagen gels", *PLoS One* 7, S. e48024.
- Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D. M.; Forman, D. und Bray, F. (2015). „Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012", *Int J Cancer* 136, S. E359-386.
- Ferrarini, M.; Heltai, S.; Zocchi, M. R. und Rugarli, C. (1992). „Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells", *Int J Cancer* 51, S. 613-619.
- Fidler, I. J. (1991). „Orthotopic implantation of human colon carcinomas into nude mice provides a valuable model for the biology and therapy of metastasis", *Cancer Metastasis Rev* 10, S. 229-243.
- Fischbach, C.; Chen, R.; Matsumoto, T.; Schmelzle, T.; Brugge, J. S.; Polverini, P. J. und Mooney, D. J. (2007). „Engineering tumors with 3D scaffolds", *Nat Methods* 4, S. 855-860.
- Fischer, K. R.; Durrans, A.; Lee, S.; Sheng, J.; Li, F.; Wong, S. T.; Choi, H., *et al.* (2015). „Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance", *Nature* 527, S. 472-476.
- Fong, E. L.; Lamhamedi-Cherradi, S. E.; Burdett, E.; Ramamoorthy, V.; Lazar, A. J.; Kasper, F. K.; Farach-Carson, M. C., *et al.* (2013). „Modeling Ewing sarcoma tumors in vitro with 3D scaffolds", *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, S. 6500-6505.
- Friedl, P. und Alexander, S. (2011). „Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity", *Cell* 147, S. 992-1009.
- Friedrich, J.; Seidel, C.; Ebner, R. und Kunz-Schughart, L. A. (2009). „Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach", *Nat Protoc* 4, S. 309-324.

- Fuchs, J. R.; Nasser, B. A. und Vacanti, J. P. (2001). „Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction", *Ann Thorac Surg* 72, S. 577-591.
- Fukuoka, M.; Wu, Y. L.; Thongprasert, S.; Sunpaweravong, P.; Leong, S. S.; Sriuranpong, V.; Chao, T. Y., *et al.* (2011). „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* 29, S. 2866-2874.
- Garofalo, M.; Romano, G.; Di Leva, G.; Nuovo, G.; Jeon, Y. J.; Ngankeu, A.; Sun, J., *et al.* (2011). „EGFR and MET receptor tyrosine kinase-altered microRNA expression induces tumorigenesis and gefitinib resistance in lung cancers", *Nat Med* 18, S. 74-82.
- Gazdar, A. F.; Gao, B. und Minna, J. D. (2010). „Lung cancer cell lines: Useless artifacts or invaluable tools for medical science?", *Lung Cancer* 68, S. 309-318.
- Gazdar, A. F.; Girard, L.; Lockwood, W. W.; Lam, W. L. und Minna, J. D. (2010). „Lung cancer cell lines as tools for biomedical discovery and research", *J Natl Cancer Inst* 102, S. 1310-1321.
- Gerdes, J.; Lemke, H.; Baisch, H.; Wacker, H. H.; Schwab, U. und Stein, H. (1984). „Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67", *J Immunol* 133, S. 1710-1715.
- Ghosh, J. C.; Dohi, T.; Kang, B. H. und Altieri, D. C. (2008). „Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis", *J Biol Chem* 283, S. 5188-5194.
- Giard, D. J.; Aaronson, S. A.; Todaro, G. J.; Arnstein, P.; Kersey, J. H.; Dosik, H. und Parks, W. P. (1973). „In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors", *J Natl Cancer Inst* 51, S. 1417-1423.
- Gilpin, A. und Yang, Y. (2017). „Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications", *Biomed Res Int* 2017, S. 9831534.
- Girard, L.; Zochbauer-Muller, S.; Virmani, A. K.; Gazdar, A. F. und Minna, J. D. (2000). „Genome-wide allelotyping of lung cancer identifies new regions of allelic loss, differences between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer, and loci clustering", *Cancer Res* 60, S. 4894-4906.
- Goffin, J. R. und Zbuk, K. (2013). „Epidermal growth factor receptor: pathway, therapies, and pipeline", *Clin Ther* 35, S. 1282-1303.
- Gomez, G. G.; Wykosky, J.; Zanca, C.; Furnari, F. B. und Cavenee, W. K. (2013). „Therapeutic resistance in cancer: microRNA regulation of EGFR signaling networks", *Cancer Biol Med* 10, S. 192-205.
- Gong, C.; Yao, Y.; Wang, Y.; Liu, B.; Wu, W.; Chen, J.; Su, F.; Yao, H. und Song, E. (2011). „Up-regulation of miR-21 mediates resistance to trastuzumab therapy for breast cancer", *J Biol Chem* 286, S. 19127-19137.
- Gong, L.; Wu, D.; Zou, J.; Chen, J.; Chen, L.; Chen, Y.; Ni, C. und Yuan, H. (2016). „Prognostic impact of serum and tissue MMP-9 in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis", *Oncotarget* 7, S. 18458-18468.
- Gonzalez, D. M. und Medici, D. (2014). „Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition", *Sci Signal* 7, S. re8.
- Goodman, T. T.; Ng, C. P. und Pun, S. H. (2008). „3-D tissue culture systems for the evaluation and optimization of nanoparticle-based drug carriers", *Bioconjug Chem* 19, S. 1951-1959.

- Goodwin, T. J.; Prewett, T. L.; Wolf, D. A. und Spaulding, G. F. (1993). „Reduced shear stress: a major component in the ability of mammalian tissues to form three-dimensional assemblies in simulated microgravity", *J Cell Biochem* 51, S. 301-311.
- Gottardi, C. J.; Wong, E. und Gumbiner, B. M. (2001). „E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner", *J Cell Biol* 153, S. 1049-1060.
- Göttlich, C.; Muller, L. C.; Kunz, M.; Schmitt, F.; Walles, H.; Walles, T.; Dandekar, T.; Dandekar, G. und Nietzer, S. L. (2016). „A Combined 3D Tissue Engineered In Vitro/In Silico Lung Tumor Model for Predicting Drug Effectiveness in Specific Mutational Backgrounds", *J Vis Exp*.
- Guarino, M.; Micheli, P.; Pallotti, F. und Giordano, F. (1999). „Pathological relevance of epithelial and mesenchymal phenotype plasticity", *Pathol Res Pract* 195, S. 379-389.
- Gupta, A.; Dong, A. und Lowe, A. W. (2012). „AGR2 gene function requires a unique endoplasmic reticulum localization motif", *J Biol Chem* 287, S. 4773-4782.
- Gupta, P. B.; Chaffer, C. L. und Weinberg, R. A. (2009). „Cancer stem cells: mirage or reality?", *Nat Med* 15, S. 1010-1012.
- Hammerman, P. S.; Janne, P. A. und Johnson, B. E. (2009). „Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer", *Clin Cancer Res* 15, S. 7502-7509.
- Han, M.; Liu, M.; Wang, Y.; Chen, X.; Xu, J.; Sun, Y.; Zhao, L.; Qu, H.; Fan, Y. und Wu, C. (2012). „Antagonism of miR-21 reverses epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotype through AKT/ERK1/2 inactivation by targeting PTEN", *PLoS One* 7, S. e39520.
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A. (2011). „Hallmarks of cancer: the next generation", *Cell* 144, S. 646-674.
- Hanna, N.; Johnson, D.; Temin, S.; Baker, S., Jr.; Brahmer, J.; Ellis, P. M.; Giaccone, G., *et al.* (2017). „Systemic Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update", *J Clin Oncol*, S. Jco2017746065.
- Hansmann, J.; Groeber, F.; Kahlig, A.; Kleinhans, C. und Walles, H. (2013). „Bioreactors in tissue engineering - principles, applications and commercial constraints", *Biotechnol J* 8, S. 298-307.
- Hatley, M. E.; Patrick, D. M.; Garcia, M. R.; Richardson, J. A.; Bassel-Duby, R.; van Rooij, E. und Olson, E. N. (2010). „Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21", *Cancer Cell* 18, S. 282-293.
- Herbst, R. S.; Heymach, J. V. und Lippman, S. M. (2008). „Lung cancer", *N Engl J Med* 359, S. 1367-1380.
- Herrmann, R.; Fayad, W.; Schwarz, S.; Berndtsson, M. und Linder, S. (2008). „Screening for compounds that induce apoptosis of cancer cells grown as multicellular spheroids", *J Biomol Screen* 13, S. 1-8.
- Hirt, C.; Papadimitropoulos, A.; Muraro, M. G.; Mele, V.; Panopoulos, E.; Cremonesi, E.; Ivanek, R., *et al.* (2015). „Bioreactor-engineered cancer tissue-like structures mimic phenotypes, gene expression profiles and drug resistance patterns observed "in vivo"", *Biomaterials* 62, S. 138-146.
- Hongisto, V.; Jernstrom, S.; Fey, V.; Mpindi, J. P.; Kleivi Sahlberg, K.; Kallioniemi, O. und Perala, M. (2013). „High-throughput 3D screening reveals differences in

- drug sensitivities between culture models of JIMT1 breast cancer cells", *PLoS One* 8, S. e77232.
- Hostein, I.; Robertson, D.; DiStefano, F.; Workman, P. und Clarke, P. A. (2001). „Inhibition of signal transduction by the Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin results in cytostasis and apoptosis", *Cancer Res* 61, S. 4003-4009.
- Hua, J. und Muschel, R. J. (1996). „Inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression by a ribozyme blocks metastasis in a rat sarcoma model system", *Cancer Res* 56, S. 5279-5284.
- Huang, X.; Park, H.; Greene, J.; Pao, J.; Mulvey, E.; Zhou, S. X.; Albert, C. M., *et al.* (2015). „IGF1R- and ROR1-Specific CAR T Cells as a Potential Therapy for High Risk Sarcomas", *PLoS One* 10, S. e0133152.
- Hudecek, M.; Schmitt, T. M.; Baskar, S.; Lupo-Stanghellini, M. T.; Nishida, T.; Yamamoto, T. N.; Bleakley, M., *et al.* (2010). „The B-cell tumor-associated antigen ROR1 can be targeted with T cells modified to express a ROR1-specific chimeric antigen receptor", *Blood* 116, S. 4532-4541.
- Hurbin, A.; Wislez, M.; Busser, B.; Antoine, M.; Tenaud, C.; Rabbe, N.; Dufort, S., *et al.* (2011). „Insulin-like growth factor-1 receptor inhibition overcomes gefitinib resistance in mucinous lung adenocarcinoma", *J Pathol* 225, S. 83-95.
- Husmann, D.; Madsen, A. T.; Jakobsen, K. R.; Luo, Y.; Sorensen, B. S. und Nielsen, A. L. (2017). „IGF1R depletion facilitates MET-amplification as mechanism of acquired resistance to erlotinib in HCC827 NSCLC cells", *Oncotarget*.
- Hutchinson, L. und Kirk, R. (2011). „High drug attrition rates--where are we going wrong?", *Nat Rev Clin Oncol* 8, S. 189-190.
- Hutmacher, D. W.; Loessner, D.; Rizzi, S.; Kaplan, D. L.; Mooney, D. J. und Clements, J. A. (2010). „Can tissue engineering concepts advance tumor biology research?", *Trends Biotechnol* 28, S. 125-133.
- Hynes, N. E. und Lane, H. A. (2005). „ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors", *Nat Rev Cancer* 5, S. 341-354.
- Illemann, M.; Hansen, U.; Nielsen, H. J.; Andreasen, P. A.; Hoyer-Hansen, G.; Lund, L. R.; Dano, K. und Nielsen, B. S. (2004). „Leading-edge myofibroblasts in human colon cancer express plasminogen activator inhibitor-1", *Am J Clin Pathol* 122, S. 256-265.
- Ingber, D. E. (2008). „Can cancer be reversed by engineering the tumor microenvironment?", *Semin Cancer Biol* 18, S. 356-364.
- Irmer, D.; Funk, J. O. und Blaukat, A. (2007). „EGFR kinase domain mutations - functional impact and relevance for lung cancer therapy", *Oncogene* 26, S. 5693-5701.
- Ivascu, A. und Kubbies, M. (2006). „Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis", *J Biomol Screen* 11, S. 922-932.
- Jackman, D. M.; Yeap, B. Y.; Sequist, L. V.; Lindeman, N.; Holmes, A. J.; Joshi, V. A.; Bell, D. W., *et al.* (2006). „Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib", *Clin Cancer Res* 12, S. 3908-3914.
- Jakobsen, K. R.; Demuth, C.; Sorensen, B. S. und Nielsen, A. L. (2016). „The role of epithelial to mesenchymal transition in resistance to epidermal growth factor

- receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer", *Transl Lung Cancer Res* 5, S. 172-182.
- Jansson, M. D. und Lund, A. H. (2012). „MicroRNA and cancer", *Mol Oncol* 6, S. 590-610.
- Jedeszko, C.; Sameni, M.; Olive, M. B.; Moin, K. und Sloane, B. F. (2008). „Visualizing protease activity in living cells: from two dimensions to four dimensions", *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 4, S. Unit 4 20.
- Jemal, A.; Bray, F.; Center, M. M.; Ferlay, J.; Ward, E. und Forman, D. (2011). „Global cancer statistics", *CA Cancer J Clin* 61, S. 69-90.
- Jhaveri, K. und Modi, S. (2015). „Ganetespib: research and clinical development", *Onco Targets Ther* 8, S. 1849-1858.
- Jorge, S. E.; Kobayashi, S. S. und Costa, D. B. (2014). „Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in lung cancer: preclinical and clinical data", *Braz J Med Biol Res* 47, S. 929-939.
- Kalaitidou, M.; Kueberuwa, G.; Schutt, A. und Gilham, D. E. (2015). „CAR T-cell therapy: toxicity and the relevance of preclinical models", *Immunotherapy* 7, S. 487-497.
- Kalluri, R. und Weinberg, R. A. (2009). „The basics of epithelial-mesenchymal transition", *J Clin Invest* 119, S. 1420-1428.
- Kalos, M.; Levine, B. L.; Porter, D. L.; Katz, S.; Grupp, S. A.; Bagg, A. und June, C. H. (2011). „T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia", *Sci Transl Med* 3, S. 95ra73.
- Kapsimali, M. (2017). „Epithelial cell behaviours during neurosensory organ formation", *Development* 144, S. 1926-1936.
- Karlsson, H.; Fryknas, M.; Larsson, R. und Nygren, P. (2012). „Loss of cancer drug activity in colon cancer HCT-116 cells during spheroid formation in a new 3-D spheroid cell culture system", *Exp Cell Res* 318, S. 1577-1585.
- Kelland, L. R. (2004). „Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development", *Eur J Cancer* 40, S. 827-836.
- Kelm, J. M.; Timmins, N. E.; Brown, C. J.; Fussenegger, M. und Nielsen, L. K. (2003). „Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types", *Biotechnol Bioeng* 83, S. 173-180.
- Kenny, P. A. (2007). „Three-dimensional extracellular matrix culture models of EGFR signalling and drug response", *Biochem Soc Trans* 35, S. 665-668.
- Khong, H. T. und Restifo, N. P. (2002). „Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes", *Nat Immunol* 3, S. 999-1005.
- Khoshnoodi, J.; Pedchenko, V. und Hudson, B. G. (2008). „Mammalian collagen IV", *Microsc Res Tech* 71, S. 357-370.
- Kim, H. J.; Litzenburger, B. C.; Cui, X.; Delgado, D. A.; Grabiner, B. C.; Lin, X.; Lewis, M. T., *et al.* (2007). „Constitutively active type I insulin-like growth factor receptor causes transformation and xenograft growth of immortalized mammary epithelial cells and is accompanied by an epithelial-to-mesenchymal transition mediated by NF-kappaB and snail", *Mol Cell Biol* 27, S. 3165-3175.
- Kim, J. B. (2005). „Three-dimensional tissue culture models in cancer biology", *Semin Cancer Biol* 15, S. 365-377.
- Kim, J. H.; Jang, Y. S.; Eom, K. S.; Hwang, Y. I.; Kang, H. R.; Jang, S. H.; Kim, C. H., *et al.* (2007). „Transforming growth factor beta1 induces epithelial-to-mesenchymal transition of A549 cells", *J Korean Med Sci* 22, S. 898-904.

- Kim, J.; Yu, W.; Kovalski, K. und Ossowski, L. (1998). „Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay", *Cell* 94, S. 353-362.
- Kim, V. N. und Nam, J. W. (2006). „Genomics of microRNA", *Trends Genet* 22, S. 165-173.
- Kleinman, H. K.; McGarvey, M. L.; Hassell, J. R.; Star, V. L.; Cannon, F. B.; Laurie, G. W. und Martin, G. R. (1986). „Basement membrane complexes with biological activity", *Biochemistry* 25, S. 312-318.
- Kloosterman, W. P. und Plasterk, R. H. (2006). „The diverse functions of microRNAs in animal development and disease", *Dev Cell* 11, S. 441-450.
- Kobayashi, S.; Boggon, T. J.; Dayaram, T.; Janne, P. A.; Kocher, O.; Meyerson, M.; Johnson, B. E.; Eck, M. J.; Tenen, D. G. und Halmos, B. (2005). „EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib", *N Engl J Med* 352, S. 786-792.
- Kochenderfer, J. N.; Dudley, M. E.; Feldman, S. A.; Wilson, W. H.; Spaner, D. E.; Maric, I.; Stetler-Stevenson, M., *et al.* (2012). „B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells", *Blood* 119, S. 2709-2720.
- Kokubo, Y.; Gemma, A.; Noro, R.; Seike, M.; Kataoka, K.; Matsuda, K.; Okano, T., *et al.* (2005). „Reduction of PTEN protein and loss of epidermal growth factor receptor gene mutation in lung cancer with natural resistance to gefitinib (IRESSA)", *Br J Cancer* 92, S. 1711-1719.
- Kramer, R. H.; Bensch, K. G. und Wong, J. (1986). „Invasion of reconstituted basement membrane matrix by metastatic human tumor cells", *Cancer Res* 46, S. 1980-1989.
- Krummel, M. F. und Allison, J. P. (1995). „CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation", *J Exp Med* 182, S. 459-465.
- Kufe, D.; Inghirami, G.; Abe, M.; Hayes, D.; Justi-Wheeler, H. und Schlom, J. (1984). „Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumors", *Hybridoma* 3, S. 223-232.
- Kufe, D. W. (2009). „Mucins in cancer: function, prognosis and therapy", *Nat Rev Cancer* 9, S. 874-885.
- Kunz-Schughart, L. A.; Freyer, J. P.; Hofstaedter, F. und Ebner, R. (2004). „The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model", *J Biomol Screen* 9, S. 273-285.
- Kunz, M. (2016). „Systembiologische Analysen von Interaktionen: Zytokine (Pflanzenpathogene), 3D-Zellkulturen (Krebstherapie) und Drugtargets.", Doktorarbeit, Universität Würzburg, Lehrstuhl für Bioinformatik.
- Kurokawa, M.; Ise, N.; Omi, K.; Goishi, K. und Higashiyama, S. (2013). „Cisplatin influences acquisition of resistance to molecular-targeted agents through epithelial-mesenchymal transition-like changes", *Cancer Sci* 104, S. 904-911.
- Kwak, E. L.; Sordella, R.; Bell, D. W.; Godin-Heymann, N.; Okimoto, R. A.; Brannigan, B. W.; Harris, P. L., *et al.* (2005). „Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib", *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, S. 7665-7670.
- Ladanyi, M. und Pao, W. (2008). „Lung adenocarcinoma: guiding EGFR-targeted therapy and beyond", *Mod Pathol* 21 Suppl 2, S. S16-22.
- Langer, R. und Vacanti, J. P. (1993). „Tissue engineering", *Science* 260, S. 920-926.

- Lara-Guerra, H.; Chung, C. T.; Schwock, J.; Pintilie, M.; Hwang, D. M.; Leighl, N. B.; Waddell, T. K. und Tsao, M. S. (2012). „Histopathological and immunohistochemical features associated with clinical response to neoadjuvant gefitinib therapy in early stage non-small cell lung cancer", *Lung Cancer* 76, S. 235-241.
- Lau, S. K.; Weiss, L. M. und Chu, P. G. (2004). „Differential expression of MUC1, MUC2, and MUC5AC in carcinomas of various sites: an immunohistochemical study", *Am J Clin Pathol* 122, S. 61-69.
- Leak, L. V. (1976). „The structure of lymphatic capillaries in lymph formation", *Fed Proc* 35, S. 1863-1871.
- Lee, J. M.; Dedhar, S.; Kalluri, R. und Thompson, E. W. (2006). „The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease", *J Cell Biol* 172, S. 973-981.
- Li, X.; Lewis, M. T.; Huang, J.; Gutierrez, C.; Osborne, C. K.; Wu, M. F.; Hilsenbeck, S. G., *et al.* (2008). „Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy", *J Natl Cancer Inst* 100, S. 672-679.
- Li, Z.; Yin, S.; Zhang, L.; Liu, W. und Chen, B. (2017). „Prognostic value of reduced E-cadherin expression in breast cancer: a meta-analysis", *Oncotarget* 8, S. 16445-16455.
- Lieber, M.; Smith, B.; Szakal, A.; Nelson-Rees, W. und Todaro, G. (1976). „A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells", *Int J Cancer* 17, S. 62-70.
- Lin, R. Z. und Chang, H. Y. (2008). „Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research", *Biotechnol J* 3, S. 1172-1184.
- Lindahl, A.; Brittberg, M. und Peterson, L. (2003). „Cartilage repair with chondrocytes: clinical and cellular aspects", *Novartis Found Symp* 249, S. 175-186; discussion 186-179, 234-178, 239-141.
- Linke, K.; Schanz, J.; Hansmann, J.; Walles, T.; Brunner, H. und Mertsching, H. (2007). „Engineered liver-like tissue on a capillarized matrix for applied research", *Tissue Eng* 13, S. 2699-2707.
- Liu, D.; Rudland, P. S.; Sibson, D. R.; Platt-Higgins, A. und Barraclough, R. (2005). „Human homologue of cement gland protein, a novel metastasis inducer associated with breast carcinomas", *Cancer Res* 65, S. 3796-3805.
- Liu, Y.; Yang, H.; Chen, T.; Luo, Y.; Xu, Z.; Li, Y. und Yang, J. (2015). „Silencing of Receptor Tyrosine Kinase ROR1 Inhibits Tumor-Cell Proliferation via PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Lung Adenocarcinoma", *PLoS One* 10, S. e0127092.
- Loessner, D.; Stok, K. S.; Lutolf, M. P.; Hutmacher, D. W.; Clements, J. A. und Rizzi, S. C. (2010). „Bioengineered 3D platform to explore cell-ECM interactions and drug resistance of epithelial ovarian cancer cells", *Biomaterials* 31, S. 8494-8506.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951). „Protein measurement with the Folin phenol reagent", *J Biol Chem* 193, S. 265-275.
- Luca, A. C.; Mersch, S.; Deenen, R.; Schmidt, S.; Messner, I.; Schafer, K. L.; Baldus, S. E., *et al.* (2013). „Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines", *PLoS One* 8, S. e59689.

- Lynch, T. J.; Bell, D. W.; Sordella, R.; Gurubhagavatula, S.; Okimoto, R. A.; Brannigan, B. W.; Harris, P. L., *et al.* (2004). „Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib", *N Engl J Med* 350, S. 2129-2139.
- Macdonald, C.; Michael, A.; Colston, K. und Mansi, J. (2004). „Heterogeneity of immunostaining for tumour markers in non-small cell lung carcinoma", *Eur J Cancer* 40, S. 461-466.
- Maemondo, M.; Inoue, A.; Kobayashi, K.; Sugawara, S.; Oizumi, S.; Isobe, H.; Gemma, A., *et al.* (2010). „Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR", *N Engl J Med* 362, S. 2380-2388.
- Mak, I. W.; Evaniew, N. und Ghert, M. (2014). „Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment", *Am J Transl Res* 6, S. 114-118.
- Mak, K. M. und Mei, R. (2017). „Basement Membrane Type IV Collagen and Laminin: An Overview of Their Biology and Value as Fibrosis Biomarkers of Liver Disease", *Anat Rec (Hoboken)*.
- Malhotra, J.; Jabbour, S. K. und Aisner, J. (2017). „Current state of immunotherapy for non-small cell lung cancer", *Transl Lung Cancer Res* 6, S. 196-211.
- Maloney, A. und Workman, P. (2002). „HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds", *Expert Opin Biol Ther* 2, S. 3-24.
- Mani, S. A.; Guo, W.; Liao, M. J.; Eaton, E. N.; Ayyanan, A.; Zhou, A. Y.; Brooks, M., *et al.* (2008). „The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells", *Cell* 133, S. 704-715.
- Mascaux, C.; Iannino, N.; Martin, B.; Paesmans, M.; Berghmans, T.; Dusart, M.; Haller, A., *et al.* (2005). „The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis", *Br J Cancer* 92, S. 131-139.
- Massague, J.; Seoane, J. und Wotton, D. (2005). „Smad transcription factors", *Genes Dev* 19, S. 2783-2810.
- Mazzoccoli, G.; Pazienza, V.; Panza, A.; Valvano, M. R.; Benegiamo, G.; Vinciguerra, M.; Andriulli, A. und Piepoli, A. (2012). „ARNTL2 and SERPINE1: potential biomarkers for tumor aggressiveness in colorectal cancer", *J Cancer Res Clin Oncol* 138, S. 501-511.
- McDermott, U.; Sharma, S. V.; Dowell, L.; Greninger, P.; Montagut, C.; Lamb, J.; Archibald, H., *et al.* (2007). „Identification of genotype-correlated sensitivity to selective kinase inhibitors by using high-throughput tumor cell line profiling", *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, S. 19936-19941.
- McKeage, K. (2015). „Alectinib: a review of its use in advanced ALK-rearranged non-small cell lung cancer", *Drugs* 75, S. 75-82.
- Mehta, G.; Hsiao, A. Y.; Ingram, M.; Luker, G. D. und Takayama, S. (2012). „Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy", *J Control Release* 164, S. 192-204.
- Mellinghoff, I. K.; Cloughesy, T. F. und Mischel, P. S. (2007). „PTEN-mediated resistance to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors", *Clin Cancer Res* 13, S. 378-381.
- Mertsching, H.; Schanz, J.; Steger, V.; Schandar, M.; Schenk, M.; Hansmann, J.; Dally, I.; Friedel, G. und Walles, T. (2009). „Generation and transplantation of an autologous vascularized bioartificial human tissue", *Transplantation* 88, S. 203-210.

- Mertsching, H.; Walles, T.; Hofmann, M.; Schanz, J. und Knapp, W. H. (2005). „Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation", *Biomaterials* 26, S. 6610-6617.
- Mishra, D. K.; Thrall, M. J.; Baird, B. N.; Ott, H. C.; Blackmon, S. H.; Kurie, J. M. und Kim, M. P. (2012). „Human lung cancer cells grown on acellular rat lung matrix create perfusable tumor nodules", *Ann Thorac Surg* 93, S. 1075-1081.
- Miyauchi, E.; Ichinose, M. und Inoue, A. (2017). „Successful Osimertinib Rechallenge in a Patient with T790M-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer after Osimertinib-Induced Interstitial Lung Disease", *J Thorac Oncol* 12, S. e59-e61.
- Miyoshi, A.; Kitajima, Y.; Sumi, K.; Sato, K.; Hagiwara, A.; Koga, Y. und Miyazaki, K. (2004). „Snail and SIP1 increase cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells", *Br J Cancer* 90, S. 1265-1273.
- Mok, T. S.; Wu, Y. L.; Thongprasert, S.; Yang, C. H.; Chu, D. T.; Saijo, N.; Sunpaweravong, P., *et al.* (2009). „Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma", *N Engl J Med* 361, S. 947-957.
- Moll, C.; Reboredo, J.; Schwarz, T.; Appelt, A.; Schurlein, S.; Walles, H. und Nietzer, S. (2013). „Tissue engineering of a human 3D in vitro tumor test system", *J Vis Exp*.
- Morgillo, F.; Della Corte, C. M.; Fasano, M. und Ciardiello, F. (2016). „Mechanisms of resistance to EGFR-targeted drugs: lung cancer", *ESMO Open* 1, S. e000060.
- Mougiakakos, D.; Choudhury, A.; Lladser, A.; Kiessling, R. und Johansson, C. C. (2010). „Regulatory T cells in cancer", *Adv Cancer Res* 107, S. 57-117.
- Mukohara, T.; Engelman, J. A.; Hanna, N. H.; Yeap, B. Y.; Kobayashi, S.; Lindeman, N.; Halmos, B., *et al.* (2005). „Differential effects of gefitinib and cetuximab on non-small-cell lung cancers bearing epidermal growth factor receptor mutations", *J Natl Cancer Inst* 97, S. 1185-1194.
- Nair, A. G.; Asnani, H. T.; Mehta, V. C.; Mehta, S. V.; Pathak, R. S.; Palkar, A. H. und Gopinathan, I. (2017). „Tyrosine Kinase Inhibitors in the Treatment of Choroidal Metastases from Non-Small-Cell Lung Cancer: A Case Report and Review of Literature", *Ocul Oncol Pathol* 3, S. 28-33.
- Neckers, L.; Schulte, T. W. und Mimnaugh, E. (1999). „Geldanamycin as a potential anti-cancer agent: its molecular target and biochemical activity", *Invest New Drugs* 17, S. 361-373.
- Nelson, K. M. und Weiss, G. J. (2008). „MicroRNAs and cancer: past, present, and potential future", *Mol Cancer Ther* 7, S. 3655-3660.
- Newick, K.; Moon, E. und Albelda, S. M. (2016). „Chimeric antigen receptor T-cell therapy for solid tumors", *Mol Ther Oncolytics* 3, S. 16006.
- Nietzer, S.; Baur, F.; Sieber, S.; Hansmann, J.; Schwarz, T.; Stoffer, C.; Hafner, H., *et al.* (2016). „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* 22, S. 621-635.
- Noro, R.; Gemma, A.; Kosaihira, S.; Kokubo, Y.; Chen, M.; Seike, M.; Kataoka, K., *et al.* (2006). „Gefitinib (IRESSA) sensitive lung cancer cell lines show phosphorylation of Akt without ligand stimulation", *BMC Cancer* 6, S. 277.
- Norris, A. M.; Gore, A.; Balboni, A.; Young, A.; Longnecker, D. S. und Korc, M. (2013). „AGR2 is a SMAD4-suppressible gene that modulates MUC1 levels and promotes the initiation and progression of pancreatic intraepithelial neoplasia", *Oncogene* 32, S. 3867-3876.

- O'Reilly, M. A.; Gazdar, A. F.; Morris, R. E. und Whitsett, J. A. (1988). „Differential effects of glucocorticoid on expression of surfactant proteins in a human lung adenocarcinoma cell line", *Biochim Biophys Acta* 970, S. 194-204.
- Obacz, J.; Takacova, M.; Brychtova, V.; Dobes, P.; Pastorekova, S.; Vojtesek, B. und Hrstka, R. (2015). „The role of AGR2 and AGR3 in cancer: similar but not identical", *Eur J Cell Biol* 94, S. 139-147.
- Ogino, A.; Kitao, H.; Hirano, S.; Uchida, A.; Ishiai, M.; Kozuki, T.; Takigawa, N.; Takata, M.; Kiura, K. und Tanimoto, M. (2007). „Emergence of epidermal growth factor receptor T790M mutation during chronic exposure to gefitinib in a non small cell lung cancer cell line", *Cancer Res* 67, S. 7807-7814.
- Okazaki, T. und Honjo, T. (2007). „PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application", *Int Immunol* 19, S. 813-824.
- Ostrand-Rosenberg, S. und Sinha, P. (2009). „Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer", *J Immunol* 182, S. 4499-4506.
- Oxnard, G. R.; Arcila, M. E.; Chmielecki, J.; Ladanyi, M.; Miller, V. A. und Pao, W. (2011). „New strategies in overcoming acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in lung cancer", *Clin Cancer Res* 17, S. 5530-5537.
- Paez, J. G.; Janne, P. A.; Lee, J. C.; Tracy, S.; Greulich, H.; Gabriel, S.; Herman, P., *et al.* (2004). „EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy", *Science* 304, S. 1497-1500.
- Pao, W. und Chmielecki, J. (2010). „Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer", *Nat Rev Cancer* 10, S. 760-774.
- Pao, W. und Miller, V. A. (2005). „Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions", *J Clin Oncol* 23, S. 2556-2568.
- Pao, W.; Miller, V. A.; Politi, K. A.; Riely, G. J.; Somwar, R.; Zakowski, M. F.; Kris, M. G. und Varmus, H. (2005). „Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain", *PLoS Med* 2, S. e73.
- Pao, W.; Miller, V.; Zakowski, M.; Doherty, J.; Politi, K.; Sarkaria, I.; Singh, B., *et al.* (2004). „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* 101, S. 13306-13311.
- Pao, W.; Wang, T. Y.; Riely, G. J.; Miller, V. A.; Pan, Q.; Ladanyi, M.; Zakowski, M. F.; Heelan, R. T.; Kris, M. G. und Varmus, H. E. (2005). „KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib", *PLoS Med* 2, S. e17.
- Papageorgis, P. (2015). „TGFbeta Signaling in Tumor Initiation, Epithelial-to-Mesenchymal Transition, and Metastasis", *J Oncol* 2015, S. 587193.
- Pardoll, D. M. (2012). „The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy", *Nat Rev Cancer* 12, S. 252-264.
- Park, J. H.; Choi, Y. J.; Kim, S. Y.; Lee, J. E.; Sung, K. J.; Park, S.; Kim, W. S., *et al.* (2016). „Activation of the IGF1R pathway potentially mediates acquired resistance to mutant-selective 3rd-generation EGF receptor tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small cell lung cancer", *Oncotarget* 7, S. 22005-22015.

- Paszek, M. J.; Zahir, N.; Johnson, K. R.; Lakins, J. N.; Rozenberg, G. I.; Gefen, A.; Reinhart-King, C. A., *et al.* (2005). „Tensional homeostasis and the malignant phenotype", *Cancer Cell* 8, S. 241-254.
- Pelaseyed, T.; Bergstrom, J. H.; Gustafsson, J. K.; Ermund, A.; Birchenough, G. M.; Schutte, A.; van der Post, S., *et al.* (2014). „The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system", *Immunol Rev* 260, S. 8-20.
- Peled, N.; Wynes, M. W.; Ikeda, N.; Ohira, T.; Yoshida, K.; Qian, J.; Ilouze, M., *et al.* (2013). „Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) as a biomarker for resistance to the tyrosine kinase inhibitor gefitinib in non-small cell lung cancer", *Cell Oncol (Dordr)* 36, S. 277-288.
- Peng, B. und Gong, J. (2017). „Sunitinib Enables a Clinical and Pathological Complete Remission of Metastatic Renal Cell Carcinoma (mRCC)", *Urol Case Rep* 12, S. 78-80.
- Pickl, M. und Ries, C. H. (2009). „Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab", *Oncogene* 28, S. 461-468.
- Planchard, D.; Besse, B.; Groen, H. J.; Souquet, P. J.; Quoix, E.; Baik, C. S.; Barlesi, F., *et al.* (2016). „Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial", *Lancet Oncol* 17, S. 984-993.
- Poincloux, R.; Lizarraga, F. und Chavrier, P. (2009). „Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia", *J Cell Sci* 122, S. 3015-3024.
- Pollok, J. M.; Kluth, D.; Cusick, R. A.; Lee, H.; Utsunomiya, H.; Ma, P. X.; Langer, R.; Broelsch, C. E. und Vacanti, J. P. (1998). „Formation of spheroidal aggregates of hepatocytes on biodegradable polymers under continuous-flow bioreactor conditions", *Eur J Pediatr Surg* 8, S. 195-199.
- Polyak, K. und Weinberg, R. A. (2009). „Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits", *Nat Rev Cancer* 9, S. 265-273.
- Qiu, X.; Guo, S.; Wu, H.; Chen, J. und Zhou, Q. (2012). „Identification of Wnt pathway, uPA, PAI-1, MT1-MMP, S100A4 and CXCR4 associated with enhanced metastasis of human large cell lung cancer by DNA microarray", *Minerva Med* 103, S. 151-164.
- Rafei, H.; El-Bahesh, E.; Finianos, A.; Nassereddine, S. und Tabbara, I. (2017). „Immune-based Therapies for Non-small Cell Lung Cancer", *Anticancer Res* 37, S. 377-387.
- Rastogi, I.; Rajanna, S.; Webb, A.; Chhabra, G.; Foster, B.; Webb, B. und Puri, N. (2016). „Mechanism of c-Met and EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance through epithelial mesenchymal transition in non-small cell lung cancer", *Biochem Biophys Res Commun* 477, S. 937-944.
- Reya, T.; Morrison, S. J.; Clarke, M. F. und Weissman, I. L. (2001). „Stem cells, cancer, and cancer stem cells", *Nature* 414, S. 105-111.
- Rintoul, R. C. und Sethi, T. (2002). „Extracellular matrix regulation of drug resistance in small-cell lung cancer", *Clin Sci (Lond)* 102, S. 417-424.
- Rizvi, I.; Gurkan, U. A.; Tasoglu, S.; Alagic, N.; Celli, J. P.; Mensah, L. B.; Mai, Z.; Demirci, U. und Hasan, T. (2013). „Flow induces epithelial-mesenchymal transition, cellular heterogeneity and biomarker modulation in 3D ovarian cancer nodules", *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, S. E1974-1983.

- RKI (2016). „Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland ", *Robert Koch-Institut*.
- Roe, S. M.; Prodromou, C.; O'Brien, R.; Ladbury, J. E.; Piper, P. W. und Pearl, L. H. (1999). „Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin", *J Med Chem* 42, S. 260-266.
- Rong, S.; Bodescot, M.; Blair, D.; Dunn, J.; Nakamura, T.; Mizuno, K.; Park, M.; Chan, A.; Aaronson, S. und Vande Woude, G. F. (1992). „Tumorigenicity of the met proto-oncogene and the gene for hepatocyte growth factor", *Mol Cell Biol* 12, S. 5152-5158.
- Rosell, R.; Carcereny, E.; Gervais, R.; Vergnenegre, A.; Massuti, B.; Felip, E.; Palmero, R., *et al.* (2012). „Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial", *Lancet Oncol* 13, S. 239-246.
- Sabeh, F.; Shimizu-Hirota, R. und Weiss, S. J. (2009). „Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: three-dimensional amoeboid movement revisited", *J Cell Biol* 185, S. 11-19.
- Saif, M. W.; Erlichman, C.; Dragovich, T.; Mendelson, D.; Toft, D.; Burrows, F.; Storgard, C. und Von Hoff, D. (2013). „Open-label, dose-escalation, safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of intravenously administered CNF1010 (17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin [17-AAG]) in patients with solid tumors", *Cancer Chemother Pharmacol* 71, S. 1345-1355.
- Saito, M.; Schetter, A. J.; Mollerup, S.; Kohno, T.; Skaug, V.; Bowman, E. D.; Mathe, E. A., *et al.* (2011). „The association of microRNA expression with prognosis and progression in early-stage, non-small cell lung adenocarcinoma: a retrospective analysis of three cohorts", *Clin Cancer Res* 17, S. 1875-1882.
- Samarakoon, R.; Higgins, C. E.; Higgins, S. P. und Higgins, P. J. (2009). „TGF-beta1-Induced Expression of the Poor Prognosis SERPINE1/PAI-1 Gene Requires EGFR Signaling: A New Target for Anti-EGFR Therapy", *J Oncol* 2009, S. 342391.
- Santisteban, M.; Reiman, J. M.; Asiedu, M. K.; Behrens, M. D.; Nassar, A.; Kalli, K. R.; Haluska, P., *et al.* (2009). „Immune-induced epithelial to mesenchymal transition in vivo generates breast cancer stem cells", *Cancer Res* 69, S. 2887-2895.
- Santo, V. E.; Rebelo, S. P.; Estrada, M. F.; Alves, P. M.; Boghaert, E. und Brito, C. (2017). „Drug screening in 3D in vitro tumor models: overcoming current pitfalls of efficacy read-outs", *Biotechnol J* 12.
- Schmitt, F (2015). „Characterization of a 3D lung tumour test system under invasive and non-invasive conditions", Masterarbeit, Universität Würzburg, Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin.
- Schreiber, R. D.; Old, L. J. und Smyth, M. J. (2011). „Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion", *Science* 331, S. 1565-1570.
- Schultheiss, D.; Gabouev, A. I.; Cebotari, S.; Tudorache, I.; Walles, T.; Schlote, N.; Wefer, J., *et al.* (2005). „Biological vascularized matrix for bladder tissue engineering: matrix preparation, reseeding technique and short-term implantation in a porcine model", *J Urol* 173, S. 276-280.
- Schweinlin, M.; Wilhelm, S.; Schwedhelm, I.; Hansmann, J.; Rietscher, R.; Jurowich, C.; Walles, H. und Metzger, M. (2016). „Development of an Advanced Primary

- Human In Vitro Model of the Small Intestine", *Tissue Eng Part C Methods* 22, S. 873-883.
- Seike, M.; Goto, A.; Okano, T.; Bowman, E. D.; Schetter, A. J.; Horikawa, I.; Mathe, E. A., *et al.* (2009). „MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers", *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, S. 12085-12090.
- Sequist, L. V.; Waltman, B. A.; Dias-Santagata, D.; Digumarthy, S.; Turke, A. B.; Fidias, P.; Bergethon, K., *et al.* (2011). „Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors", *Sci Transl Med* 3, S. 75ra26.
- Sequist, L. V.; Yang, J. C.; Yamamoto, N.; O'Byrne, K.; Hirsh, V.; Mok, T.; Geater, S. L., *et al.* (2013). „Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations", *J Clin Oncol* 31, S. 3327-3334.
- Shao, J. B.; Gao, Z. M.; Huang, W. Y. und Lu, Z. B. (2017). „The mechanism of epithelial-mesenchymal transition induced by TGF-beta1 in neuroblastoma cells", *Int J Oncol* 50, S. 1623-1633.
- Shaw, A. T.; Kim, D. W.; Nakagawa, K.; Seto, T.; Crino, L.; Ahn, M. J.; De Pas, T., *et al.* (2013). „Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer", *N Engl J Med* 368, S. 2385-2394.
- Shaw, A. T.; Ou, S. H.; Bang, Y. J.; Camidge, D. R.; Solomon, B. J.; Salgia, R.; Riely, G. J., *et al.* (2014). „Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer", *N Engl J Med* 371, S. 1963-1971.
- Shen, H.; Zhu, F.; Liu, J.; Xu, T.; Pei, D.; Wang, R.; Qian, Y., *et al.* (2014). „Alteration in Mir-21/PTEN expression modulates gefitinib resistance in non-small cell lung cancer", *PLoS One* 9, S. e103305.
- Shi, Y. und Massague, J. (2003). „Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus", *Cell* 113, S. 685-700.
- Shi, Y.; Wu, H.; Zhang, M.; Ding, L.; Meng, F. und Fan, X. (2013). „Expression of the epithelial-mesenchymal transition-related proteins and their clinical significance in lung adenocarcinoma", *Diagn Pathol* 8, S. 89.
- Singh, A.; Greninger, P.; Rhodes, D.; Koopman, L.; Violette, S.; Bardeesy, N. und Settleman, J. (2009). „A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival", *Cancer Cell* 15, S. 489-500.
- Singh, S. K.; Pal Bhadra, M.; Girschick, H. J. und Bhadra, U. (2008). „MicroRNAs--micro in size but macro in function", *FEBS J* 275, S. 4929-4944.
- Socinski, M. A.; Goldman, J.; El-Hariry, I.; Koczywas, M.; Vukovic, V.; Horn, L.; Paschold, E., *et al.* (2013). „A multicenter phase II study of ganetespib monotherapy in patients with genotypically defined advanced non-small cell lung cancer", *Clin Cancer Res* 19, S. 3068-3077.
- Soltermann, A.; Tischler, V.; Arbogast, S.; Braun, J.; Probst-Hensch, N.; Weder, W.; Moch, H. und Kristiansen, G. (2008). „Prognostic significance of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition protein expression in non-small cell lung cancer", *Clin Cancer Res* 14, S. 7430-7437.
- Sos, M. L.; Michel, K.; Zander, T.; Weiss, J.; Frommolt, P.; Peifer, M.; Li, D., *et al.* (2009). „Predicting drug susceptibility of non-small cell lung cancers based on genetic lesions", *J Clin Invest* 119, S. 1727-1740.

- Steel, G. G.; Courtenay, V. D. und Peckham, M. J. (1983). „The response to chemotherapy of a variety of human tumour xenografts", *Br J Cancer* 47, S. 1-13.
- Steinke, M.; Dally, I.; Friedel, G.; Walles, H. und Walles, T. (2015). „Host-integration of a tissue-engineered airway patch: two-year follow-up in a single patient", *Tissue Eng Part A* 21, S. 573-579.
- Stinchcombe, T. E. (2016). „Targeted Therapies for Lung Cancer", *Cancer Treat Res* 170, S. 165-182.
- Stratmann, A. T.; Fecher, D.; Wangorsch, G.; Gottlich, C.; Walles, T.; Walles, H.; Dandekar, T.; Dandekar, G. und Nietzer, S. L. (2014). „Establishment of a human 3D lung cancer model based on a biological tissue matrix combined with a Boolean in silico model", *Mol Oncol* 8, S. 351-365.
- Sun, S.; Schiller, J. H. und Gazdar, A. F. (2007). „Lung cancer in never smokers--a different disease", *Nat Rev Cancer* 7, S. 778-790.
- Tadokoro, A.; Kanaji, N.; Liu, D.; Yokomise, H.; Haba, R.; Ishii, T.; Takagi, T., *et al.* (2016). „Vimentin Regulates Invasiveness and Is a Poor Prognostic Marker in Non-small Cell Lung Cancer", *Anticancer Res* 36, S. 1545-1551.
- Takagi, A.; Watanabe, M.; Ishii, Y.; Morita, J.; Hirokawa, Y.; Matsuzaki, T. und Shiraishi, T. (2007). „Three-dimensional cellular spheroid formation provides human prostate tumor cells with tissue-like features", *Anticancer Res* 27, S. 45-53.
- Thiery, J. P. (2002). „Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression", *Nat Rev Cancer* 2, S. 442-454.
- Tian, M. und Schiemann, W. P. (2009). „The TGF-beta paradox in human cancer: an update", *Future Oncol* 5, S. 259-271.
- Tian, X.; Liu, Z.; Niu, B.; Zhang, J.; Tan, T. K.; Lee, S. R.; Zhao, Y.; Harris, D. C. und Zheng, G. (2011). „E-cadherin/beta-catenin complex and the epithelial barrier", *J Biomed Biotechnol* 2011, S. 567305.
- Tracy, S.; Mukohara, T.; Hansen, M.; Meyerson, M.; Johnson, B. E. und Janne, P. A. (2004). „Gefitinib induces apoptosis in the EGFR L858R non-small-cell lung cancer cell line H3255", *Cancer Res* 64, S. 7241-7244.
- Tse, J. C. und Kalluri, R. (2007). „Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment", *J Cell Biochem* 101, S. 816-829.
- Tsoukalas, N.; Aravantinou-Fatorou, E.; Tolia, M.; Giaginis, C.; Galanopoulos, M.; Kiakou, M.; Kostakis, I. D., *et al.* (2017). „Epithelial-Mesenchymal Transition in Non Small-cell Lung Cancer", *Anticancer Res* 37, S. 1773-1778.
- Unger, C.; Kramer, N.; Walzl, A.; Scherzer, M.; Hengstschlager, M. und Dolznig, H. (2014). „Modeling human carcinomas: physiologically relevant 3D models to improve anti-cancer drug development", *Adv Drug Deliv Rev* 79-80, S. 50-67.
- Vacanti, J. P. und Langer, R. (1999). „Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation", *Lancet* 354 Suppl 1, S. SI32-34.
- Vansteenkiste, J.; De Ruyscher, D.; Eberhardt, W. E.; Lim, E.; Senan, S.; Felip, E. und Peters, S. (2013). „Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up", *Ann Oncol* 24 Suppl 6, S. vi89-98.

- Villaruz, L. C.; Burns, T. F.; Ramfidis, V. S. und Socinski, M. A. (2013). „Personalizing therapy in advanced non-small cell lung cancer", *Semin Respir Crit Care Med* 34, S. 822-836.
- Virmani, A. K.; Fong, K. M.; Kodagoda, D.; McIntire, D.; Hung, J.; Tonk, V.; Minna, J. D. und Gazdar, A. F. (1998). „Allelotyping demonstrates common and distinct patterns of chromosomal loss in human lung cancer types", *Genes Chromosomes Cancer* 21, S. 308-319.
- Vleminckx, K.; Vakaet, L., Jr.; Mareel, M.; Fiers, W. und van Roy, F. (1991). „Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role", *Cell* 66, S. 107-119.
- Volinia, S.; Calin, G. A.; Liu, C. G.; Ambs, S.; Cimmino, A.; Petrocca, F.; Visone, R., et al. (2006). „A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets", *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, S. 2257-2261.
- Vunjak-Novakovic, G.; Martin, I.; Obradovic, B.; Treppo, S.; Grodzinsky, A. J.; Langer, R. und Freed, L. E. (1999). „Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage", *J Orthop Res* 17, S. 130-138.
- Walles, T.; Weimer, M.; Linke, K.; Michaelis, J. und Mertsching, H. (2007). „The potential of bioartificial tissues in oncology research and treatment", *Onkologie* 30, S. 388-394.
- Walter, A. O.; Sjin, R. T.; Haringsma, H. J.; Ohashi, K.; Sun, J.; Lee, K.; Dubrovskiy, A., et al. (2013). „Discovery of a mutant-selective covalent inhibitor of EGFR that overcomes T790M-mediated resistance in NSCLC", *Cancer Discov* 3, S. 1404-1415.
- Wang, H.; Huang, S.; Shou, J.; Su, E. W.; Onyia, J. E.; Liao, B. und Li, S. (2006). „Comparative analysis and integrative classification of NCI60 cell lines and primary tumors using gene expression profiling data", *BMC Genomics* 7, S. 166.
- Wang, Z.; Juttermann, R. und Soloway, P. D. (2000). „TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 in vivo", *J Biol Chem* 275, S. 26411-26415.
- Warth, A.; Cortis, J.; Soltermann, A.; Meister, M.; Budczies, J.; Stenzinger, A.; Goepfert, B., et al. (2014). „Tumour cell proliferation (Ki-67) in non-small cell lung cancer: a critical reappraisal of its prognostic role", *Br J Cancer* 111, S. 1222-1229.
- Wen, Song; Zhou, Wei; Li, Chun-ming; Hu, Juan; Hu, Xiao-ming; Chen, Ping; Shao, Guo-liang und Guo, Wu-hua (2015). „Ki-67 as a prognostic marker in early-stage non-small cell lung cancer in Asian patients: a meta-analysis of published studies involving 32 studies", *BMC Cancer* 15, S. 520.
- Wendt, M. K.; Smith, J. A. und Schiemann, W. P. (2010). „Transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition facilitates epidermal growth factor-dependent breast cancer progression", *Oncogene* 29, S. 6485-6498.
- Wessel, D. und Flugge, U. I. (1984). „A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids", *Anal Biochem* 138, S. 141-143.
- Wiemer, E. A. (2007). „The role of microRNAs in cancer: no small matter", *Eur J Cancer* 43, S. 1529-1544.
- Wistuba, II; Bryant, D.; Behrens, C.; Milchgrub, S.; Virmani, A. K.; Ashfaq, R.; Minna, J. D. und Gazdar, A. F. (1999). „Comparison of features of human lung cancer cell lines and their corresponding tumors", *Clin Cancer Res* 5, S. 991-1000.

- Witta, S. E.; Gemmill, R. M.; Hirsch, F. R.; Coldren, C. D.; Hedman, K.; Ravdel, L.; Helfrich, B., *et al.* (2006). „Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines", *Cancer Res* 66, S. 944-950.
- Wolf, B.; Kuonen, P.; Dandekar, T. und Atlan, D. (2015). „DNAseq Workflow in a Diagnostic Context and an Example of a User Friendly Implementation", *Biomed Res Int* 2015, S. 403497.
- Workman, P. (2002). „Pharmacogenomics in cancer drug discovery and development: inhibitors of the Hsp90 molecular chaperone", *Cancer Detect Prev* 26, S. 405-410.
- Xu, X.; Farach-Carson, M. C. und Jia, X. (2014). „Three-dimensional in vitro tumor models for cancer research and drug evaluation", *Biotechnol Adv* 32, S. 1256-1268.
- Xue, C.; Plieth, D.; Venkov, C.; Xu, C. und Neilson, E. G. (2003). „The gatekeeper effect of epithelial-mesenchymal transition regulates the frequency of breast cancer metastasis", *Cancer Res* 63, S. 3386-3394.
- Yang, L.; Pang, Y. und Moses, H. L. (2010). „TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression", *Trends Immunol* 31, S. 220-227.
- Yano, S.; Wang, W.; Li, Q.; Matsumoto, K.; Sakurama, H.; Nakamura, T.; Ogino, H., *et al.* (2008). „Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations", *Cancer Res* 68, S. 9479-9487.
- Yarden, Y. und Sliwkowski, M. X. (2001). „Untangling the ErbB signalling network", *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, S. 127-137.
- Yauch, R. L.; Januario, T.; Eberhard, D. A.; Cavet, G.; Zhu, W.; Fu, L.; Pham, T. Q., *et al.* (2005). „Epithelial versus mesenchymal phenotype determines in vitro sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients", *Clin Cancer Res* 11, S. 8686-8698.
- Yeo, W. L.; Riely, G. J.; Yeap, B. Y.; Lau, M. W.; Warner, J. L.; Bodio, K.; Huberman, M. S., *et al.* (2010). „Erlotinib at a dose of 25 mg daily for non-small cell lung cancers with EGFR mutations", *J Thorac Oncol* 5, S. 1048-1053.
- Yu, Q. und Stamenkovic, I. (1999). „Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion", *Genes Dev* 13, S. 35-48.
- Yu, Q. und Stamenkovic, I. (2000). „Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis", *Genes Dev* 14, S. 163-176.
- Yu, S.; Li, A.; Liu, Q.; Li, T.; Yuan, X.; Han, X. und Wu, K. (2017). „Chimeric antigen receptor T cells: a novel therapy for solid tumors", *J Hematol Oncol* 10, S. 78.
- Yun, C. H.; Mengwasser, K. E.; Toms, A. V.; Woo, M. S.; Greulich, H.; Wong, K. K.; Meyerson, M. und Eck, M. J. (2008). „The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP", *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, S. 2070-2075.
- Zalcman, G.; Bergot, E. und Lechapt, E. (2010). „Update on nonsmall cell lung cancer", *Eur Respir Rev* 19, S. 173-185.
- Zeisberg, M. und Neilson, E. G. (2009). „Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions", *J Clin Invest* 119, S. 1429-1437.

- Zhang, B. L.; Qin, D. Y.; Mo, Z. M.; Li, Y.; Wei, W.; Wang, Y. S.; Wang, W. und Wei, Y. Q. (2016). „Hurdles of CAR-T cell-based cancer immunotherapy directed against solid tumors", *Sci China Life Sci* 59, S. 340-348.
- Zhang, H.; Ye, Z. L.; Yuan, Z. G.; Luo, Z. Q.; Jin, H. J. und Qian, Q. J. (2016). „New Strategies for the Treatment of Solid Tumors with CAR-T Cells", *Int J Biol Sci* 12, S. 718-729.
- Zhang, J. G.; Wang, J. J.; Zhao, F.; Liu, Q.; Jiang, K. und Yang, G. H. (2010). „MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC)", *Clin Chim Acta* 411, S. 846-852.
- Zhang, J.; Jin, Y.; Xu, S.; Zheng, J.; Zhang, Q. I.; Wang, Y.; Chen, J.; Huang, Y.; He, X. und Zhao, Z. (2016). „AGR2 is associated with gastric cancer progression and poor survival", *Oncol Lett* 11, S. 2075-2083.
- Zhang, S.; Chen, L.; Cui, B.; Chuang, H. Y.; Yu, J.; Wang-Rodriguez, J.; Tang, L.; Chen, G.; Basak, G. W. und Kipps, T. J. (2012). „ROR1 is expressed in human breast cancer and associated with enhanced tumor-cell growth", *PLoS One* 7, S. e31127.
- Zhang, S.; Chen, L.; Wang-Rodriguez, J.; Zhang, L.; Cui, B.; Frankel, W.; Wu, R. und Kipps, T. J. (2012). „The onco-embryonic antigen ROR1 is expressed by a variety of human cancers", *Am J Pathol* 181, S. 1903-1910.
- Zhang, Y. E. (2009). „Non-Smad pathways in TGF-beta signaling", *Cell Res* 19, S. 128-139.
- Zhao, B. X.; Wang, J.; Song, B.; Wei, H.; Lv, W. P.; Tian, L. M.; Li, M. und Lv, S. (2015). „Establishment and biological characteristics of acquired gefitinib resistance in cell line NCI-H1975/gefitinib-resistant with epidermal growth factor receptor T790M mutation", *Mol Med Rep* 11, S. 2767-2774.
- Zhao, F.; Grayson, W. L.; Ma, T. und Irsigler, A. (2009). „Perfusion affects the tissue developmental patterns of human mesenchymal stem cells in 3D scaffolds", *J Cell Physiol* 219, S. 421-429.
- Zheng, X.; Carstens, J. L.; Kim, J.; Scheible, M.; Kaye, J.; Sugimoto, H.; Wu, C. C.; LeBleu, V. S. und Kalluri, R. (2015). „Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer", *Nature* 527, S. 525-530.
- Zhou, X.; Ren, Y.; Moore, L.; Mei, M.; You, Y.; Xu, P.; Wang, B., *et al.* (2010). „Downregulation of miR-21 inhibits EGFR pathway and suppresses the growth of human glioblastoma cells independent of PTEN status", *Lab Invest* 90, S. 144-155.
- Zhu, Z. und Chai, Y. (2016). „Complete remission of liver metastasis in a lung cancer patient with epidermal growth factor mutation achieved with Icotinib", *Thorac Cancer* 7, S. 681-683.

Anhang

SOP Aufbau statisches Tumormodell.....	165
SOP Stimulation und Behandlung statischer Tumormodelle	167
Makros zur Bestimmung der Proliferationsrate.....	169
Abbildung S 1: Austestung der Kulturbedingungen.....	177
Abbildung S 2: RealTime-Glo™ MT-Assay nach Behandlung mit 17-AAG.....	178
Abbildung S 3: Phospho-RTK-Arrays nach Behandlung mit 17-AAG	179
Abbildung S 4: PK-Array nach Behandlung mit 17-AAG	180
Abbildung S 5: Western Blot-Quantifizierung nach 17-AAG-Behandlung	181
Abbildung S 6: Western Blot-Quantifizierung der HCCres	181
Abbildung S 7: Behandlung mit ROR1-CAR T-Zellen im statischen Modell	182
Abbildung S 8: Apoptose im statischen Modell nach CAR T-Zellbehandlung	183
Tabelle S 1: Puffer und Lösungen für REM und TEM.....	174
Tabelle S 2: Aufarbeitung der Proben für REM	174
Tabelle S 3: Aufarbeitung der Proben für TEM	174
Tabelle S 4: Arbeitsschritte des <i>TruSight One Sequencing Panel Kit</i>	175

SOP Aufbau statisches Tumormodell**1. Materialien**

- Zellkronen (zusammenpassende Anzahl an inneren und äußeren Ringen mit Füßchen)
- SISmuc/SISser
- Pinzetten (zwei gebogene, eine große gerade)
- Skalpell
- Skalpellklingen
- Pipetten
- Pasteurpipette
- 12-Well Platte

2. Geräte

- Sicherheitswerkbank
- Zentrifuge
- Zählkammer
- Absaugpumpe
- Pipettierhilfe

3. Chemikalien und Lösungen

- zellspezifisches Medium
- PBS-/EDTA
- Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung (0,05 % Trypsin in PBS-/EDTA)
- FCS

4. Durchführung

Tag -1:

- Anzahl an Zellkronen in ein Becherglas geben, mit Alufolie abdecken und autoklavieren lassen

Tag 0:

Bespannen der Zellkronen:

- SISmuc mit gerader Pinzette aus dem Behälter nehmen und in Petrischale überführen, mit gebogener Pinzette der Länge nach auslegen und vorsichtig glatt streichen. Überprüfen, ob auf der Außenseite kleine Gefäßreste zu sehen sind (siehe Bemerkungen).
- Mit dem Skalpell einen dünnen Streifen an einer Seite entfernen, sodass sich die SIS aufklappen lässt.
- Vorsichtig mit den gebogenen Pinzetten aufklappen, sodass die Lumenseite aufgedeckt liegt.
- Mit dem Skalpell in zwei bis vier Stücke schneiden (Die Innenteile der Zellkronen können zum Abmessen der benötigten Matrixstücke auf die Matrix aufgesetzt werden.).
- Die passende Anzahl an Zellkronen mit gerader Pinzette entnehmen und in dem Deckel der Petrischale vorbereiten.
- Matrixstück mit der Lumenseite nach unten über den inneren Ring der Zellkronen ziehen.
- Den äußeren Ring der Zellkrone mit den Füßchen nach oben über den inneren Ring mit der SIS stülpen und langsam herunter drücken bis beide ineinander stecken.
- Eventuell herausragende Matrixstücke mit dem Skalpell abschneiden.

- Die Zellkronen mit der fixierten SIS umdrehen und in ein Well einer 12-Well Platte überführen.
- Anschließend mit einer Glaspipette alle Wells innerhalb der Zellkrone mit 1 ml und außerhalb der Zellkrone mit 1,5 ml zellspezifischem Medium auffüllen (Gesamtvolumen: 2,5 ml)
- 2 h oder über Nacht im Inkubator inkubieren.

Besiedelung:

- Zellen ablösen und Zellzahl bestimmen (siehe SOP Zellen passagieren)
- Zellsuspension für die entsprechende Anzahl an Zellkronen (plus eine Zellkrone als Reserve) vorbereiten: pro Zellkrone $1 \cdot 10^5$ Zellen in 500 μ l Medium (z.B. für fünf Zellkronen: 3 ml Zellsuspension mit insgesamt $6 \cdot 10^5$ Zellen)
- Medium in und um die Zellkronen mit einer Pasteurpipette absaugen.
- Je 500 μ l der Zellsuspension in die Innenseite der Zellkronen pipettieren.
- Für 2 h im Inkubator adhären lassen.
- Dann jede Zellkrone mit Hilfe einer Glaspipette mit je 2 ml Medium auf insgesamt 2,5 ml Medium auffüllen: Innen 1 ml und Außen 1 ml Medium zugeben.
- Medienwechsel alle 48 h und übers Wochenende nach 72 h
- zusätzlich sollten die Zellen regelmäßig parallel zum Besiedeln auf der Matrix auch in 2D auf Glasplättchen ausgesät werden und auf spezifische Marker, welche die Zellen identifizieren können, gefärbt werden (Kollagen 1: Fibroblasten, CD31: Endothelzellen, pan-Zytokeratin: homogen epithelial, ...)

5. Bemerkungen

- SISmuc/SISser-Länge variiert je nach Präparator. Stücke müssen so geschnitten werden, dass sie über die Zellkrone gespannt werden können. Die Anzahl der Stücke muss daher der Länge der Matrix angepasst werden.
- Auf der Außenseite der Matrix befinden sich kleinere Gefäßreste. Bevor die Matrix aufgeschnitten wird, sollte die Außenseite auf das Vorhandensein solcher Reste überprüft werden. Sollten keine Gefäßreste auf der Außenseite, dafür aber nach dem Aufschneiden auf der Innenseite der Matrix gefunden werden, dann hat sich die Matrix während der Präparation umgestülpt und muss umgekehrt aufgezoogen werden.
- Große Luftblasen unterhalb der Zellkrone müssen vermieden werden, da hierdurch keine ausreichende Versorgung der Zellen mit Medium gewährleistet werden kann. Deshalb beim Auffüllen die Well-Platte einfach kippen und das Medium langsam neben der Zellkrone einlaufen lassen (Luftblasen laufen nach oben hin unter der Zellkrone heraus). Falls das noch nicht ausreicht, kann mit einer sterilen Pinzette an der Zellkrone „gerüttelt“ oder die Zellkrone angehoben werden.

SOP Stimulation und Behandlung statischer Tumormodelle**1. Materialien**

- Tumormodelle in 12-Well Platte
- Sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße
- Eppendorf-Pipetten
- Pasteurpipetten

2. Geräte

- Sicherheitswerkbank
- Pipettierhilfe

3. Chemikalien und Lösungen

- zellspezifisches Medium
- TGF- β 1-Stammlösung (hTGF- β 1 mit Carrier, Cell Signaling Technology, 8915LC)
- Inhibitor:
 - o Gefitinib-Stammlösung (Selleckchem, S1025)
 - o 17-AAG-Stammlösung (Selleckchem, 8132)
 - o ...

4. DurchführungTGF- β 1-Stimulation:

- Tumormodelle wie in SOP „Aufbau von statischen Tumormodellen“ beschrieben herstellen.
- Ab Tag 3 Kultivierung in TGF- β -Medium: zellspezifisches Medium mit TGF- β 1 versetzen, so dass die Endkonzentration 2 ng/ml beträgt und das Medium innerhalb und außerhalb der Zellkrone wechseln.
- Medienwechsel alle zwei bis drei Tage mit TGF- β 1 Medium. Das Medium immer frisch am Tag des Medienwechsels mit TGF- β 1 versetzen.

Behandlung des Tumormodells mit Sammeln von Überständen (für M30-ELISA):

- Tumormodelle wie in SOP „Aufbau von statischen Tumormodellen“ beschrieben herstellen.
- Tag 10: Medienwechsel zu der Uhrzeit, zu der an den folgenden Tagen die Behandlung/die Probenahme erfolgt.
- Tag 11: Zellspezifisches Medium mit dem Inhibitor versetzen. Vor dem Medienwechsel 100 μ l Medium aus dem Inneren der Zellkrone entnehmen und bei -80 °C in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß lagern (= T0: Behandlungsbeginn). Das Medium innen und außen wechseln.
- Tag 12: 100 μ l Überstand aus dem Inneren der Zellkrone entnehmen und bei -80 °C in Eppendorf-Reaktionsgefäß lagern (= T1: 24 h nach Behandlungsbeginn).
- Tag 13: Zellspezifisches Medium mit dem Inhibitor versetzen. Vor dem Medienwechsel 100 μ l Medium aus dem Inneren der Zellkrone entnehmen und bei -80 °C in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß lagern (= T2: 48 h nach Behandlungsbeginn). Das Medium innen und außen wechseln.
- Tag 14: 100 μ l Überstand aus dem Inneren der Zellkrone entnehmen und bei -80 °C in Eppendorf-Reaktionsgefäß lagern (= T3: 24 h II, nach der M30-Messung werden T2 und T3 zu einem

72-h Wert nach Behandlungsbeginn addiert). Tumormodelle für Histologie oder andere Auswerteparameter aufarbeiten.

Behandlungsschema:

Kulturdauer [d]	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Wochentag	Fr	Sa	So	Mo	Di	Mi	Do	Fr	Sa	So	Mo	Di	Mi	Do	Fr
	Besiedelung			1.MW		2.MW		3.MW			4.MW	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
												Behandlung für 3 Tage			
												↓	↓	↓	↓
												T0	24 h	48 h	72 h
												Apoptose (M30-ELISA)			

MW...Medienwechsel

5. Bemerkungen

- Immer eine nicht-stimulierte/unbehandelte Kontrolle mit denselben Bedingungen mitführen.
- Am letzten Tag des Versuches Medium außerhalb der Zellkrone mit einer Pasteurpipette entnehmen, in Wells einer 24-Well Platte überführen und lichtmikroskopisch auf Kontaminationen überprüfen.
- Die Konzentration der Inhibitoren, die in den statischen Tumormodellen eingesetzt werden, sind der Literatur zu entnehmen oder sollten sich an der IC50 orientieren. Diese kann zuvor für jede Zelllinie in 2D mit Hilfe des CellTiter-Glo® Assays ermittelt werden.
- Die Kulturdauer verlängert sich mit TGF-β1-Stimulation auf insgesamt 17 Tage, da die Zellen zunächst drei Tage anwachsen und ab Tag 3 mit TGF-β1 stimuliert werden.
- Die TGF-β1- sowie die Inhibitor-Stammlösungen können für eine Woche bei 4 °C gelagert werden.
- Für statistisch signifikante Ergebnisse muss das Experiment mindestens zweimal im Duplikat durchgeführt werden, um mindestens n = 4 zu erreichen (Schwankungen zwischen den Zellkronen sind meist höher als zwischen den Ansätzen). Statistische Auswertung mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummentest.

Makros zur Bestimmung der Proliferationsrate

In Abhängigkeit der verwendeten Zelllinie sowie der Färbeintensität mussten jeweils einige Einstellungen für die einzelnen Versuche angepasst werden. Diese sind in blau dargestellt.

Makro zur automatischen Zählung DAPI-gefärbter Zellkerne in 2D:

```
dir=getDirectory("choose dir");
fileList = getFileList(dir);
for(i=0; i<fileList.length; i++) { open(dir+fileList[i]);
image=getTitle(); dir=getDirectory("image");
selectWindow(image);
run("Duplicate...", "title=["+image + "_copy]");
duplicate=getTitle();
selectWindow(image);
run("Split Channels");
close(image+" (green)");
selectWindow(image + " (red)");
close(image + " (red)");
selectWindow(image + " (blue)");
blue= getTitle();
selectWindow(blue);
run("Pseudo flat field correction", "blurring=100");
close();
run("Subtract Background...", "rolling=10");
run("Enhance Contrast...", "saturated=0 normalize");
run("Median...", "radius=2");
run("Auto Threshold", "method=RenyiEntropy white");
run("EDM Binary Operations", "iterations=2 operation=open");
run("Watershed Irregular Features", "erosion=20 convexity_threshold=0");
run("Analyze Particles...", "size=0.01-Infinity show=Masks summarize exclude in_situ");
saveAs("tiff", dir + File.separator + image + "_extracted");
run("Close All");
```

Makro zur automatischen Zählung Ki67-positiver und DAPI-gefärbter Zellkerne im dynamischen 3D Tumormodell:

```
dir=getDirectory("choose dir");
fileList = getFileList(dir);
for(i=0; i<fileList.length; i++) {
open(dir+fileList[i]);
image=getTitle();
dir=getDirectory("image");
selectWindow(image);
run("Duplicate...", "title=["+image + "_copy]");
duplicate=getTitle();
selectWindow(image);
run("Split Channels");
close(image+" (green)");
selectWindow(image + " (blue)");
blue= getTitle();
selectWindow(image + " (red)");
red= getTitle();
selectWindow(blue);
run("Pseudo flat field correction", "blurring=100");
close();
run("Subtract Background...", "rolling=10");
run("Enhance Contrast...", "saturated=0 normalize");
run("Median...", "radius=2");
run("Auto Threshold", "method=RenyiEntropy white");
run("EDM Binary Operations", "iterations=2 operation=open");
run("Watershed Irregular Features", "erosion=20 convexity_threshold=0");
run("Analyze Particles...", "size=0.0-Infinity show=Masks exclude in_situ");
selectWindow(red);
run("Pseudo flat field correction", "blurring=100");
close();
selectWindow(red);
run("Subtract Background...", "rolling=10");
run("Enhance Contrast...", "saturated=1 normalize");
run("Auto Threshold", "method=RenyiEntropy white");
```

```
run("Binary Feature Extractor", "objects=["+blue+"] selector=["+red+"] object_overlap=0
count");
saveAs("tiff", dir //+ "Zählung"
+ File.separator + image + "_extracted");      }
IJ.renameResults("BFE_Results", "Results");
selectWindow("Results");
saveAs("Results", dir + File.separator + "results_table.tsv");
run("Close All");
```

Makro zur automatischen Zählung von Ki67-positiven und DAPI-gefärbten Tumorzellkernen in PCK-positiven Zellen von Xenografts und Biopsaten:

```
dir=getDirectory("choose dir");
fileList = getFileList(dir);
for(i=0; i<fileList.length; i++) {
open(dir+fileList[i]);
image=getTitle();
dir=getDirectory("image");
selectWindow(image);
run("Duplicate...", "title=["+image + "_copy]");
duplicate=getTitle();
selectWindow(image);
run("Split Channels");
selectWindow(image+" (green)");
green=getTitle();
run("Pseudo flat field correction", "blurring=20");
selectWindow(green + "_background");
close();
selectWindow(green);
run("Subtract Background...", "rolling=37");
run("Auto Threshold", "method=MinError(I) white");
run("Fill Holes");
run("EDM Binary Operations", "iterations=2 operation=open");
run("EDM Binary Operations", "iterations=2 operation=close");
run("Fill Holes");
run("Create Selection");
```

```
roiManager("reset");
roiManager("add");
selectWindow(image+" (blue)");
blue=getTitle();
run("Pseudo flat field correction", "blurring=20");
selectWindow(blue + "_background");
close();
selectWindow(blue);
roiManager("select",0);
run("Clear Outside");
run("Select All");
run("Median...", "radius=1");
run("Unsharp Mask...", "radius=2 mask=0.60");
run("Auto Threshold", "method=Otsu white");
run("Fill Holes");
run("EDM Binary Operations", "iterations=1 operation=open");
run("Watershed Irregular Features", "erosion=20 convexity_threshold=0");
selectWindow(image+" (red)");
red=getTitle();
run("Unsharp Mask...", "radius=1 mask=0.60");
run("Auto Threshold", "method=Triangle white");
run("Analyze Particles...", "size=0.001-Infinity show=Masks in_situ");
run("Binary Feature Extractor", "objects=["+blue+"] selector=["+red+"] object_overlap=0 combine count");
selectWindow("Extracted_"+blue+"-1");
run("Create Selection");
selectWindow(duplicate);
run("Restore Selection");
run("Overlay Options...", "stroke=yellow width=0 fill=none");
run("Add Selection...");
selectWindow(blue);
run("Create Selection");
selectWindow(duplicate);
run("Restore Selection");
run("Overlay Options...", "stroke=red width=0 fill=none");
run("Add Selection...");
```

```
run("Select None");
run("To ROI Manager");
saveAs("tiff",dir+File.separator+image+ "_overlay");
overlay=getTitle();
close(overlay);
selectWindow("Extracted_"+blue+"-1");
run("Close");
selectWindow(blue);
run("Close");
selectWindow(red);
run("Close");
selectWindow(green);
run("Close");
close(fileList[i]);}
IJ.renameResults("BFE_Results", "Results");
selectWindow("Results");
saveAs("Results", dir+ File.separator + "results_table.tsv");
```

Tabelle S 1: Puffer und Lösungen für REM und TEM

Puffer	Zusammensetzung
Sörensen-Puffer 100 mM	Lösung A: 100 mM KH_2PO_4 , 12,2 ml Lösung B: 100 mM Na_2HPO_4 , 81,8 ml
2,5 % Glutaraldehyd-Lösung	2,5 % Glutaraldehyd in 50 mM Cacodylate pH 7.2 50 mM KCl 2,5 mM MgCl_2
6,5 % Glutaraldehyd-Lösung	6,5 % Glutaraldehyd in 100 mM Sörensen-Puffer
2 % gepuffertes Osmium (VIII)-oxid	2 % OsO_4 In 50 mM Cacodylate pH 7.2
Epon 812	Bestandteil A (weich): 97,1 g Epon 812 + 130,8 g Dodecenylnadecanhydrid Bestandteil B (hart): 90 g Epon 812 + 81,37 g Methylnadecanhydride Je nach Probe in gewünschten Anteilen mischen.

Tabelle S 2: Aufarbeitung der Proben für REM

Schritt	Lösung	Zeit/Bedingungen
Waschen	Sörensen-Puffer	5 min
Entwässerung	30 % Aceton	15 min
	50 % Aceton	20 min
	70 % Aceton	30 min
	90 % Aceton	45 min
	100 % Aceton	5-mal 30 s
	100 % Aceton	bis zur weiteren Verarbeitung

Tabelle S 3: Aufarbeitung der Proben für TEM

Schritt	Lösung	Zeit/Bedingungen
Waschen	50 mM Cacodylatpuffer pH 7,2	Fünfmal 3 min, 4 °C
Fixierung	2 % gepuffertes Osmium(VIII)-oxid	90 bis 120 min, 4 °C
Waschen	Reinstwasser	Fünfmal 3 min, 4 °C

Schritt	Lösung	Zeit/Bedingungen
Kontrast herstellen	0,5 % Uranylacetat	Über Nacht, 4 °C
Waschen	Reinstwasser	Fünfmal 3 min, 4 °C
Entwässern	50 % Ethanol	30 min, 4 °C
	70 % Ethanol	30 min, 4 °C
	90 % Ethanol	30 min, 4 °C
	96 % Ethanol	30 min, 4 °C
	100 % Ethanol	30 min, 4 °C
	100 % Ethanol	60 min, Rt
Einbetten	Propylenoxid	Dreimal 30 min, Rt
	Epon 812 in Propylenoxid 1:2	Über Nacht
	Epon	2 h
	Epon	2 h
	Epon in Einbettform	1 h
Polymerisation		Mindestens 48 h, 60 °C

Tabelle S 4: Arbeitsschritte des *TruSight One Sequencing Panel Kit*

Schritt	Ziel
Tagment genomische DNA	Fragmentieren der gDNA und Anlagern der Adaptermoleküle an beiden Enden der Fragmente durch Nextera Transposom
Reinigung der tagmentierten DNA	Aufreinigung der markierten gDNA-Fragmente über <i>Sample Purification Beads</i> , Entfernen des Nextera Transposoms
PCR-Amplifizierung I	Anreicherung der gereinigten, markierten gDNA Fragmente über eine PCR mit zehn Zyklen, Anhängen von Indexsequenzen (jede Probe erhält ein Index) sowie gemeinsamer Adapter
PCR-Reinigung I	Aufreinigung der DNA-Bibliothek über <i>Sample Purification Beads</i>
Hybridisierung I	Binden von sog. <i>Capture probes</i> an spezifische Zielregionen, Poolen der mit unterschiedlichen Indizes gekennzeichneten Bibliotheken

Schritt	Ziel
Bindung I	Binden der <i>Capture probes</i> gekoppelten Zielregionen an Streptavidin-Beads, Entfernen von unspezifischen Bindungen durch 2 Waschschrte, Eluieren der angereicherten Bibliothek
Hybridisierung II	Binden von zusätzlichen <i>Capture probes</i> an spezifische Zielregionen
Bindung II	Binden der <i>Capture probes</i> gekoppelten Zielregionen an Streptavidin-Beads, Entfernen von unspezifischen Bindungen durch 2 Waschschrte, Eluieren der angereicherten Bibliothek
Probenaufreinigung	Aufreinigung der <i>Capture Probes</i> gekoppelten Bibliothek über <i>Sample Purification Beads</i>
PCR-Amplifizierung II	Anreicherung der Bibliothek über eine PCR mit zehn Zyklen
PCR-Reinigung II	Aufreinigung der Bibliothek über <i>Sample Purification Beads</i>
Bestimmen und Einstellen der DNA-Konzentration in der Bibliothek	Zur Sequenzierung am MiSeq wird eine Bibliothek mit einer Konzentration von 4 nM DNA benötigt.

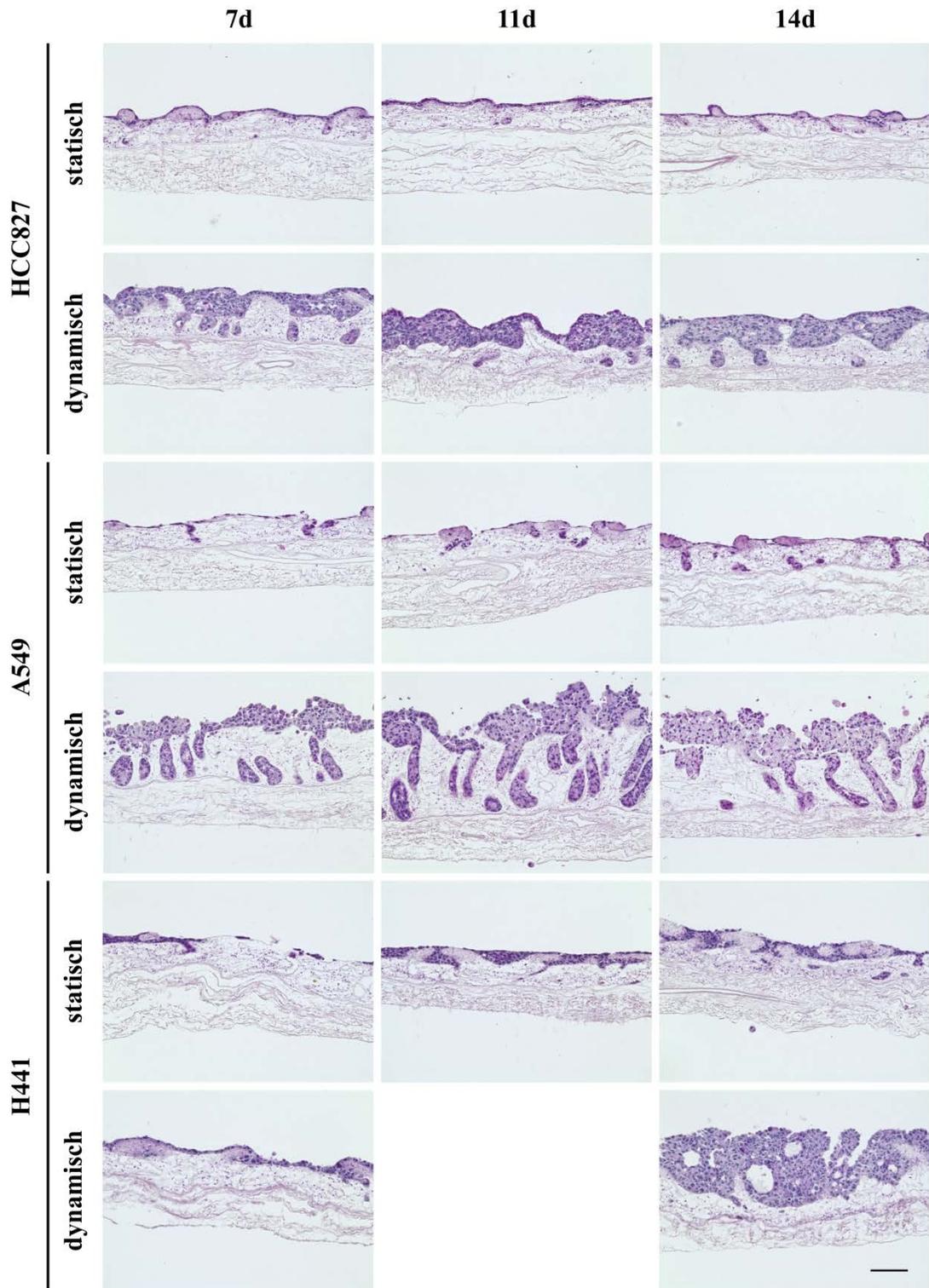


Abbildung S 1: Austestung der Kulturbedingungen

Die Zellen wurden jeweils für sieben, elf und 14 d unter statischen bzw. dynamischen Bedingungen kultiviert, anschließend fixiert und in Paraffin eingebettet. Von den Paraffinblöcken wurden Schnitte angefertigt und diese H&E gefärbt. Maßstabsbalken: 100 μ m.

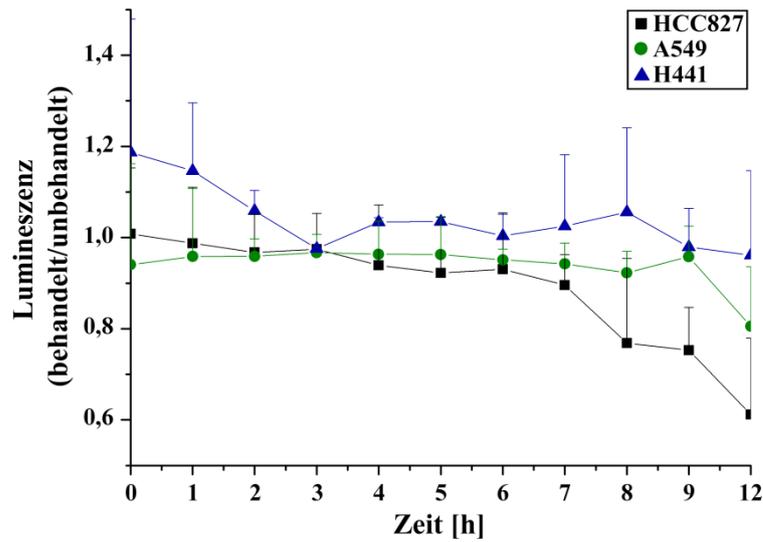


Abbildung S 2: RealTime-Glo™ MT Assay nach Behandlung mit 17-AAG

Die Zelllinien HCC827, A549 und H441 zeigten im RealTime-Glo™ MT Zellvitalitätsassay eine differenzierte Antwort innerhalb der ersten 12 h nach Zugabe des HSP90-Inhibitors 17-AAG. n = 2.

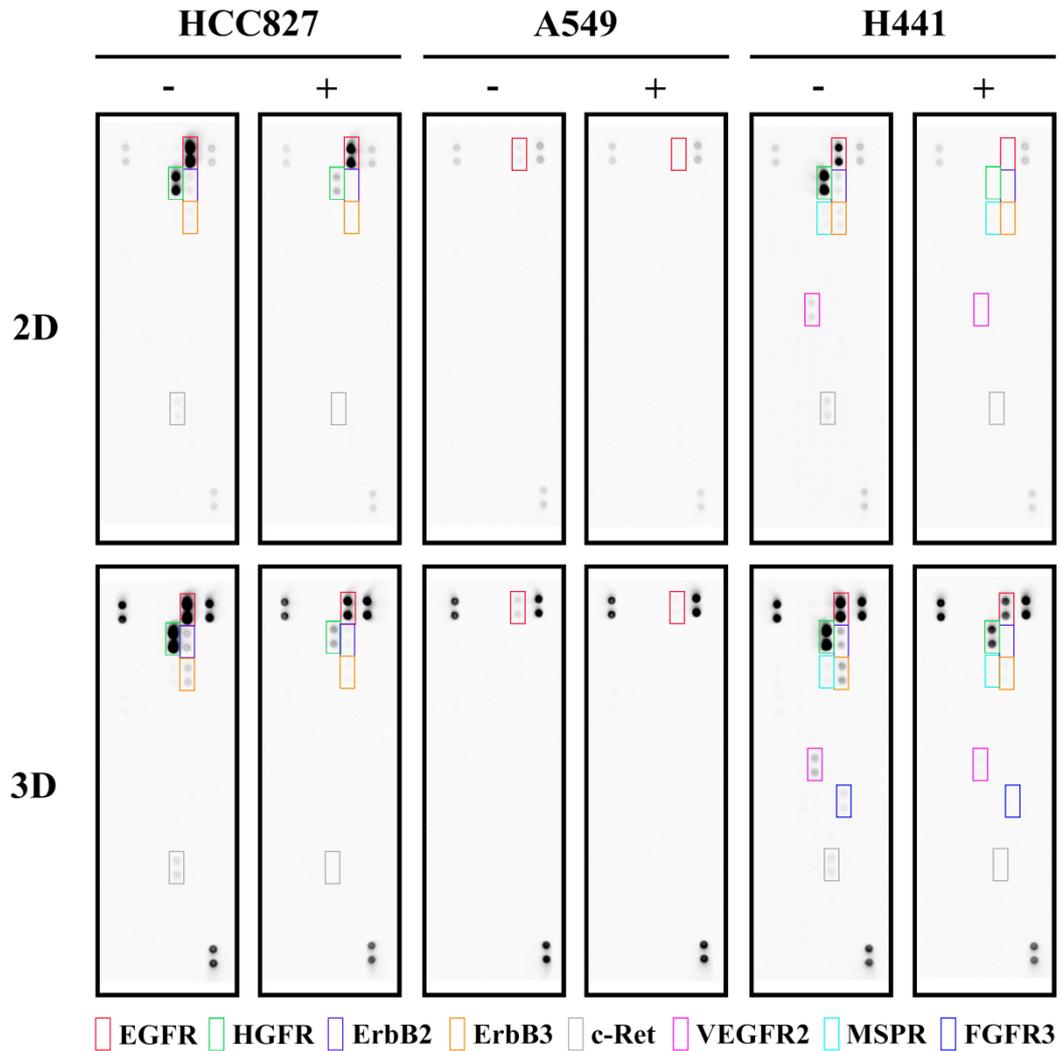


Abbildung S 3: Phospho-RTK-Arrays nach Behandlung mit 17-AAG

Die Abbildung zeigt phospho-RTK-Arrays der Zelllysate von HCC827-, A549- und H441-Zellen, die in 2D und 3D kultiviert und für 72 h mit 0,25 μ M 17-AAG behandelt wurden. Auf den Array-Membranen sind jeweils 49 Antikörperspots in Duplikaten aufgebracht, die spezifisch RTK binden. Dabei werden nur die phosphorylierten Kinasen über den HRP-konjugierten Detektionsantikörper detektiert und können mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden.

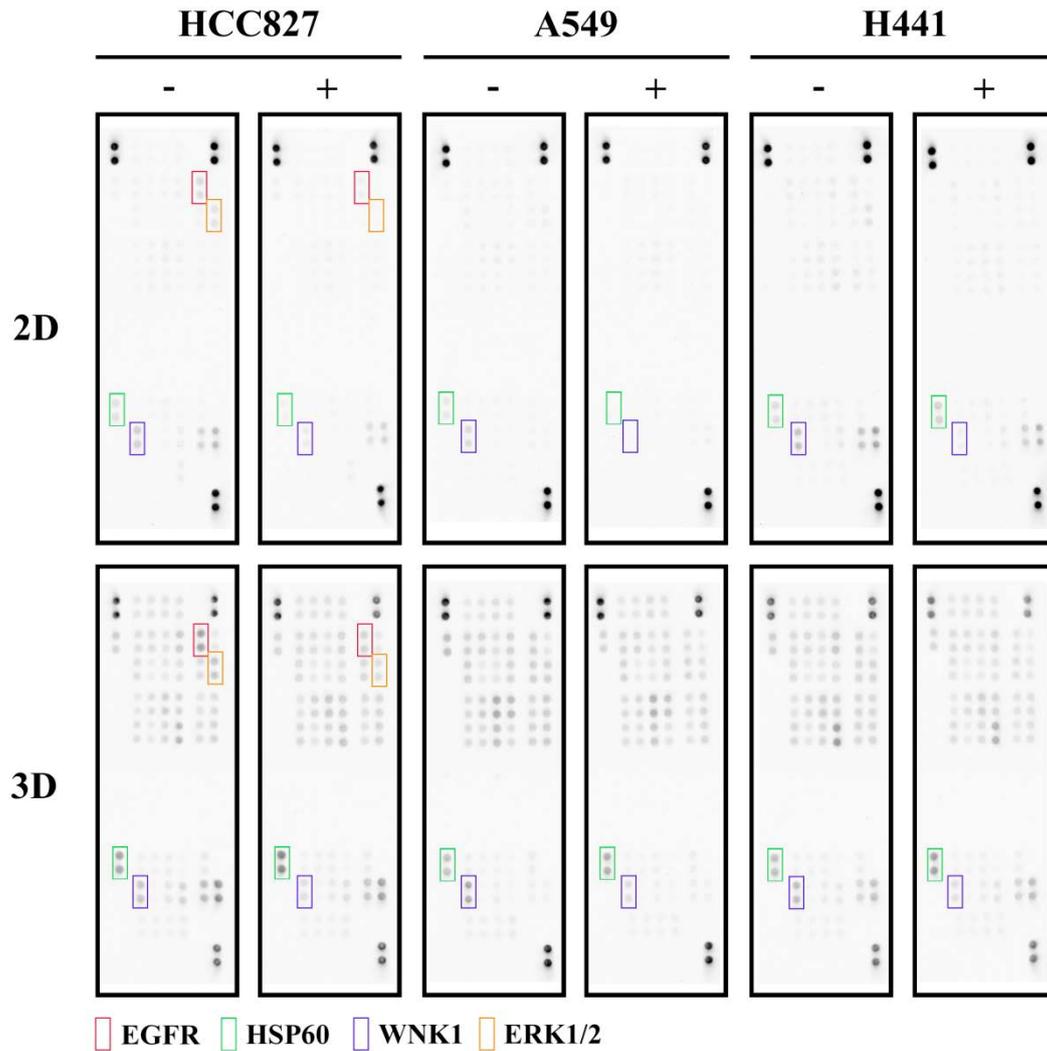


Abbildung S 4: PK-Array nach Behandlung mit 17-AAG

Die Abbildung zeigt PK-Arrays der Zelllysate von HCC827-, A549- und H441-Zellen, die in 2D und 3D kultiviert und für 72 h mit 0,25 μ M 17-AAG behandelt wurden. Der Array detektiert die Phosphorylierung von 43 humanen Kinasen und die Gesamtmenge von zwei zugehörigen Proteinen

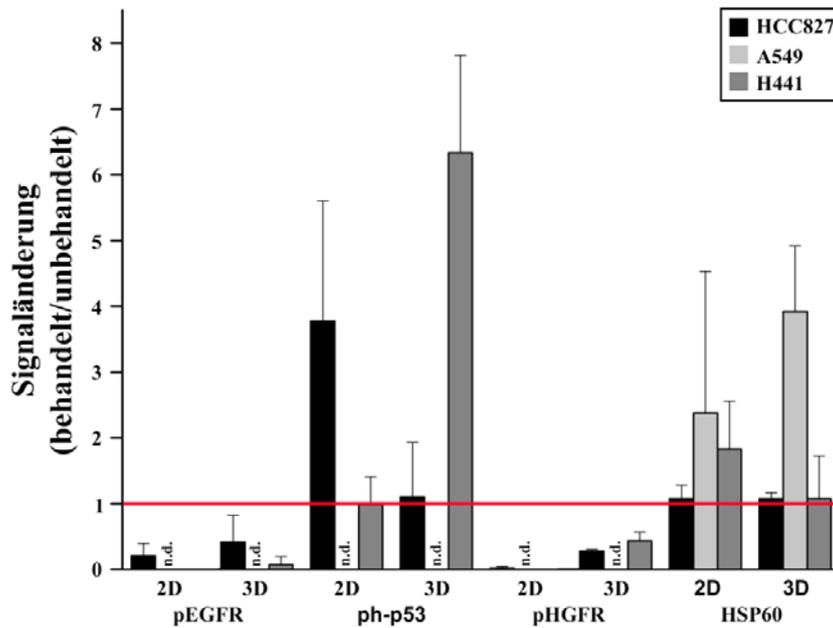


Abbildung S 5: Western Blot-Quantifizierung nach 17-AAG-Behandlung

Die Signalintensität von phospho-EGFR, phospho-p53, phospho-HGFR und HSP60 von 17-AAG-behandelten Proben wurde quantifiziert und auf die jeweilige Signalintensität der unbehandelten Proben bezogen (rote Linie). n = 3.

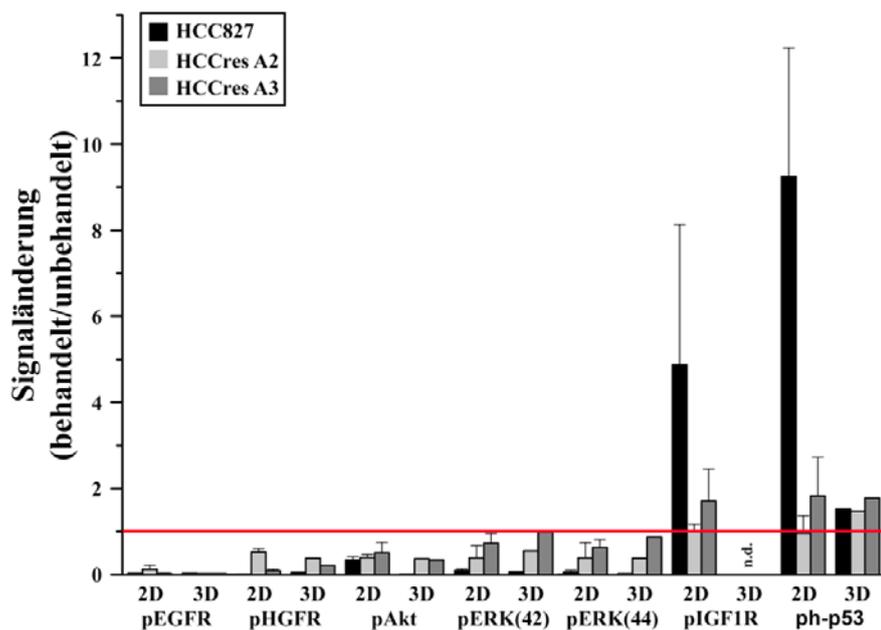


Abbildung S 6: Western Blot-Quantifizierung der HCCres

Die Signalintensität von phospho-EGFR, phospho-HGFR, phospho-Akt, phospho-ERK, phospho-IGF1R und phospho-p53 von Gefitinib-behandelten Proben wurde quantifiziert und auf die jeweilige Signalintensität der unbehandelten Proben bezogen (rote Linie). n = 3 (2D), n = 1 (3D).

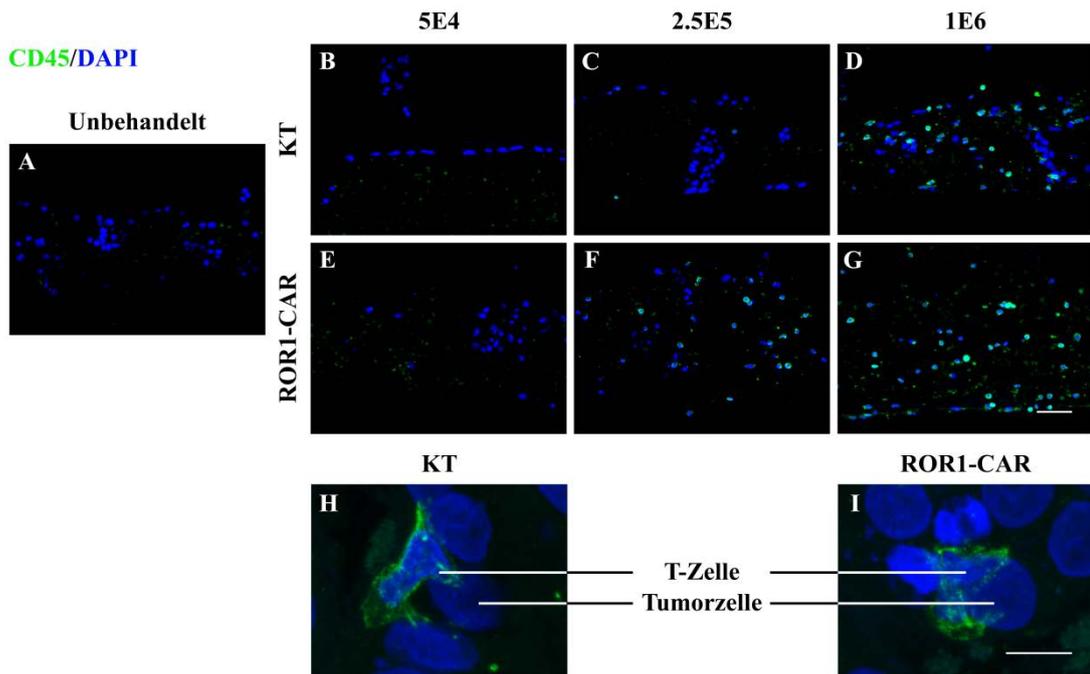


Abbildung S 7: Behandlung mit ROR1-CAR T-Zellen im statischen Modell

Die ROR1-spezifischen CAR und KT-Zellen wandern dosisabhängig in die 3D Tumormodelle ein und interagieren mit den Tumorzellen. A–G) A549-Zellen wurden elf Tage lang auf der SISmuc kultiviert und anschließend 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an ROR1-CAR T-Zellen (ROR1-CAR) bzw. KT-Zellen (KT) behandelt. Die Modelle wurden danach fixiert, in Paraffin eingebettet und eine Immunfluoreszenzfärbung gegen den T-Zellmarker CD45 durchgeführt. Dargestellt ist die Gegenfärbung mit DAPI. Maßstabsbalken: 50 μm . H, I) Die Nahaufnahme der CD45-Immunfluoreszenzfärbung zeigt, dass sowohl die ROR1-CAR T-Zellen als auch die KT-Zellen mit den Tumorzellen interagieren. Maßstabsbalken: 10 μm .

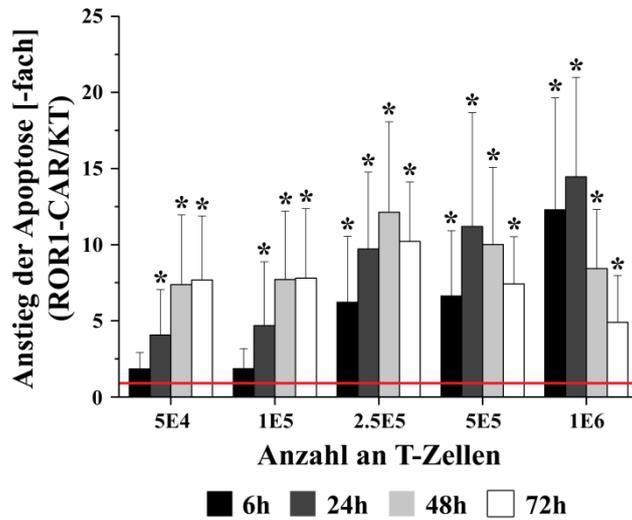


Abbildung S 8: Apoptose im statischen Modell nach CAR T-Zellbehandlung

Die Apoptose steigt nach Zugabe der ROR1-CAR T-Zellen dosisabhängig an. Die Bestimmung des Anstiegs der Apoptose erfolgte mit Hilfe des M30 CytoDeath™ ELISAs. Dafür wurden Überstände der unbehandelten und behandelten Proben direkt vor (T0-Probe) sowie 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlung gesammelt. Die Konzentrationen an M30 nach der Behandlung mit ROR1 spezifischen CAR T-Zellen wurden auf die jeweiligen T0-Werte normalisiert und anschließend auf die KT-Zellen (rote Linie) bezogen. * $p < 0.05$, $n = 4$.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Etablierung eines humanen 3D Lungentumor-Testsystems zur Analyse von Behandlungseffekten“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „Establishment of a human 3D lung tumor test system applied for the analysis of treatment effects” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

Danksagung

Ich möchte mich herzlichst bei allen bedanken, die mich in den vergangenen Jahren im Rahmen dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Heike Walles für die Möglichkeit, meine Dissertation am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin des Universitätsklinikums Würzburg anfertigen zu dürfen. Ich bedanke mich für die wertvollen Ideen und Anregungen sowie für die vielen hilfreichen Gespräche, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Außerdem möchte ich mich für die Möglichkeit zur Teilnahme an zahlreichen wissenschaftlichen Kongressen, durch die ich sehr viel lernen konnte, bedanken.

Prof. Dr. Thomas Dandekar danke ich für nützlichen Ratschläge, vor allem bei bioinformatischen Fragen, und die Betreuung meiner Doktorarbeit als Zweitgutachter.

Bei Prof. Dr. Dr. h.c. Hans Konrad Müller-Hermelink bedanke ich mich für die Betreuung meiner Arbeit als Mitglied des Promotionskomitees.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Gudrun Dandekar und Dr. Sarah Nietzer für die Betreuung meiner Arbeit, die stetige Unterstützung und die vielen Ideen und anregenden Gespräche. Ich danke Euch dafür, dass ihr Euer Wissen mit mir geteilt und mir stets ermöglicht habt, meine eigenen Ideen einzubringen. Außerdem danke ich Euch für Euer Vertrauen, mir wichtige und spannende Projekte zu übertragen.

Weiterhin möchte ich mich bei einer Reihe von Leuten bedanken, die durch ihre freundliche Kollaboration zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Prof. Dr. Georg Krohne, Daniela Bunsen und Claudia Gehrig danke ich für die kompetente Hilfe bei den REM- und TEM-Analysen und die Zeit, die sie sich dafür genommen haben.

Dr. Michael Hudecek und Lars Wallstabe danke ich für die Aufgeschlossenheit, die ROR1-CAR T-Zellen in unseren Modellen zu testen.

Ich bedanke mich bei PD Dr. Simone Rost, Ann-Kathrin Zaum und Michaela Hofrichter für die Durchführung der DNA-Sequenzierung.

Dr. Meik Kunz danke ich für die Auswertung der Sequenzierungsdaten und die Hilfe beim Verständnis der bioinformatischen Analysen.

Prof. Dr. Harald Schulze danke ich für die Hilfe bei der microRNA-Analyse.

Zudem danke ich allen Mitgliedern des Lehrstuhls TERM für die großartige Zeit.

Lena Nelke, ich danke Dir für deine Freundschaft und die vielen lustigen Momente im Labor, wenn wieder mal alles schief ging und wir das Ding trotzdem irgendwie geschaukelt haben – wir haben auch noch ein paar Fläschchen offen ;-).

Florentin Baur, Du hast ein enormes Wissen – vielen Dank, dass Du etwas davon mit mir geteilt hast und mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hast.

Ich danke dem „Doktorandenzimmer“ für den Spaß, den ich mit Euch hatte – ich habe den Sitzplatz nur ungern hergegeben. Besonders danke ich David Fecher für die guten Gespräche und die musikalische Untermalung, vor allem während der Weihnachtszeit.

Dr. Daniela Zdzieblo, Du hast mir den Umzug aus dem „Doktorandenzimmer“ erleichtert. Ich danke Dir für die vielen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Ratschläge, den Spaß und deine Anwesenheit im Büro, auch wenn der Flur und die Labore schon leer waren.

Ich bedanke mich bei Heide Häfner für die Durchführung der PCR-Analysen.

Dipl.-Ing. Thomas Schwarz danke ich für die Unterstützung bei technischen Fragen bezüglich des Bioreaktors.

Dr. Sebastian Schürlein, ich danke Dir für die zahlreichen Tipps und Deine Hilfe in den vielen Notlagen, in denen Inkubatoren gesponnen oder Objektträger ins Mikroskop gefallen sind.

Sabine Gätzner danke ich, dass sie immer einen Inkubatorplatz für mich frei hatte.

Zudem möchte ich mich bei allen Studenten bedanken, die ich während meiner Zeit als Doktorandin betreuen durfte. Franziska Schmitt, Elena Weigl, Michaela Baier und Theresa Mößer, es war mir eine Freude, mein Wissen mit Euch zu teilen und Euch in die Welt der 3D Tumormodelle einführen zu dürfen.

Zum Schluss, möchte ich mich aus tiefstem Herzen bei meiner Familie, vor allem bei meinen Eltern und bei meinem Bruder, für Ihre stetige Unterstützung, den Rückhalt und ihr Vertrauen in mich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dir, Patrick. Danke für Deine Liebe, dass Du immer an mich glaubst und für mich da bist.

Nicht fehlen darf ein „Danke“ an das wohl fröhlichste Wesen in meinem Leben. Danke, Tysi, dass Du nach einem anstrengenden Tag wieder für Ausgeglichenheit sorgst.

Lebenslauf

Claudia Göttlich

Ausbildung

10/2013–heute	Doktorand an der Graduate School of Life Science, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
10/2010–03/2013	Master of Science in Pharmaceutical Biotechnology, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Titel der Masterarbeit: „Functional Relevance of N-terminal modified chemokines CCL15 and CCL16“
10/2005–09/2008	Bachelor of Science in Biotechnologie, Fachhochschule Zittau-Görlitz Titel der Bachelorarbeit: „Development of assay-systems for characterisation of Alzheimer’s disease based on new biomarkers“
08/1997–05/2005	Abitur am Oberland-Gymnasium Seifhennersdorf Hauptfächer: Mathematik, Biologie

Berufserfahrung

05/2013–heute	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Universitätsklinikum Würzburg, Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin
04/2013	Wissenschaftliche Hilfskraft, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie
10/2008–09/2012	Technische Mitarbeiterin, Probiodrug AG, Halle (Saale), Arbeitsgruppe Assay Development
05/2008–08/2008	Praktikum, Probiodrug AG, Halle (Saale), Arbeitsgruppe Assay Development

Publikationen

während der Promotion

Eingereicht: **Göttlich, C.***; Kunz, M.*; Zapp, C.; Nietzer, S.; Walles, H.; Dandekar, T., Dandekar, G. (2017) „Improving patient stratification in personalized medicine: a combined tissue engineered 3D – *in silico* tool for *KRAS* signature development in NSCLC”, *Oncogene*

Kunz, M.; **Göttlich, C.**; Walles, T.; Nietzer, S.; Dandekar, G. und Dandekar, T. (2017). „MicroRNA-21 *versus* microRNA-34: Lung cancer promoting and inhibitory microRNAs analysed *in silico* and *in vitro* and their clinical impact”, *Tumour Biol* 39, S. 1010428317706430.

Göttlich, C.*; Müller, L. C.*; Kunz, M.*; Schmitt, F.; Walles, H.; Walles, T.; Dandekar, T.; Dandekar, G. und Nietzer, S. L. (2016). „A Combined 3D Tissue Engineered *In Vitro/In Silico* Lung Tumor Model for Predicting Drug Effectiveness in Specific Mutational Backgrounds”, *J Vis Exp*.

Stratmann, A. T.*; Fecher, D.*; Wangorsch*, G.; **Göttlich, C.**; Walles, T.; Walles, H.; Dandekar, T.; Dandekar, G. und Nietzer, S. L. (2014). „Establishment of a human 3D lung cancer model based on a biological tissue matrix combined with a Boolean *in silico* model”, *Mol Oncol* 8, S. 351-365.

*Erstautoren

sonstige

Kleinschmidt, M.; Schoenfeld, R.; **Göttlich, C.**; Bittner, D.; Metzner, J. E.; Leplow, B. und Demuth, H. U. (2015). „Characterizing Aging, Mild Cognitive Impairment, and Dementia with Blood-Based Biomarkers and Neuropsychology”, *J Alzheimers Dis* 50, S. 111-126.

Patent: Martin Kleinschmidt, **Claudia Göttlich**, Hans-Ulrich Demuth, Jens-Ulrich Rahfeld (2011): Novel Diagnostic Method, patent number: US 20110166035 A1

Patent: Martin Kleinschmidt, **Claudia Göttlich**, Hans-Ulrich Demuth (2011): Novel assay, patent number: US 20110091910 A1