



**„Der Einfluss der extrazellulären Matrix auf den Phänotyp, die
Gen- und Proteinexpression und die EGFR Inhibition bei
kolorektalen Tumorzelllinien“**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anna Clarissa Luca
aus Duisburg

Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Kinderchirurgie des
Universitätsklinikum der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Nikolas H. Stoecklein

Koreferent: Prof. Dr. William Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Tumore des Menschen.....	1
1.2 Das kolorektale Karzinom.....	2
1.3 Modelle zur Tumorentstehung des kolorektalen Karzinoms.....	3
1.4 Klinisches Staging des kolorektalen Karzinoms	7
1.5 Die Therapie des kolorektalen Karzinoms	8
1.6 Tyrphostine als EGFR Inhibitoren	12
1.7 Tumorzelllinien als Modellsysteme für humane Tumoren.....	15
1.8 Die ECM und Matrix assoziierte Moleküle.....	17
1.9 Kultivierung von Tumorzellen in einem IrECM Modell.....	23
1.10 Ziel der Arbeit	26
2 Material und Methoden	28
2.1 Material.....	28
2.1.1 Einwegartikel und Kunststoffgefäße	28
2.1.2 Chemikalien, Lösungen und Zellkulturlösungen.....	28
2.1.3 Medikamente	29
2.1.4 Antikörper für die Western Blot Analyse.....	30
2.1.4.1 Primärantikörper	30
2.1.4.2 Sekundärantikörper.....	31
2.1.5 Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung.....	31
2.1.5.1 Primärantikörper	31
2.1.5.2 Sekundärantikörper.....	31
2.1.6 Oligonukleotide	32
2.1.7 Molekularbiologische Kits	33
2.1.8 Zellbiologische Kits.....	33
2.1.9 Geräte.....	33
2.1.10 Humane kolorektale Adenokarzinomzelllinien	34
2.1.11 Software und Server	35
2.2 Methoden	36

2.2.1	Molekularbiologische Methoden	36
2.2.1.1	Short Tandem Repeat (STR) Analyse	36
2.2.1.2	<i>KRAS</i> und <i>BRAF</i> Mutationsanalyse.....	37
2.2.1.3	Isolation von RNA aus kolorektalen Adenokarzinomzelllinien.....	37
2.2.1.4	Photometrische Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	39
2.2.1.5	Reinheitsbestimmung von RNA mittels Nano Chip Analyse	39
2.2.1.6	cDNA Synthese durch Reverse Transkription (RT).....	40
2.2.1.7	Amplifikation von Gensequenzen aus cDNA (Real Time PCR)	41
2.2.1.8	Genexpressionsanalyse mittels Agilent Array Analyse.....	42
2.2.2	Zellbiologische Methoden	43
2.2.2.1	Kultivierung von humanen kolorektalen Adenokarzinomzelllinien.....	43
2.2.2.2	Kultivierung von humanen kolorektalen Adenokarzinomzelllinien in einer lamininreichen extrazellulären Matrix.....	44
2.2.2.3	Beurteilung der Tumorsphäroidstruktur	45
2.2.2.4	Bestimmung des 3D Zellmorphologietyps mittels Immunfluoreszenzfärbung und konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie.....	47
2.2.2.5	Rekultivierung von Tumorsphäroiden aus der IrECM auf Plastiksubstrat.....	48
2.2.2.6	Ablösen von adhärennten Zellen vom Zellkulturgefäß	48
2.2.2.7	Passagieren der Zellen	48
2.2.2.8	Kryokonservierung von humanen kolorektalen Adenokarzinomzellen: Einfriervorgang.....	49
2.2.2.9	Kryokonservierung von humanen kolorektalen Adenokarzinomzellen: Auftauen von Zellen	49
2.2.2.10	Bestimmung der Zellzahl mit dem Hemocytometer.....	50
2.2.2.11	Erstellen von Wachstumskinetiken	50
2.2.2.12	Inkubation von humanen kolorektalen Adenokarzinomzelllinien mit einem EGF-Rezeptor Inhibitor	51
2.2.2.13	Ermittlung der Zellproliferation mittels MTT-Assays	52
2.2.2.14	Bestimmung des IC ₅₀ Wertes nach EGF-Rezeptor Inhibition mittels MTT-Assays	53
2.2.2.15	Bestimmung der Zellmigration mittels „Fence“-Assay.....	54
2.2.2.16	Bestimmung der Zellinvasion mittels Boyden Chamber Assay.....	56
2.2.3	Biochemische Methoden	57
2.2.3.1	Herstellung von Proteinextrakten aus Säugerzellen	57

2.2.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	58
2.2.3.3	Western Blot	60
2.2.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	61
2.2.3.5	Proteintransfer	62
2.2.3.6	Immundetektion der transferierten Proteine	63
2.2.4	Statistik	64
3	Ergebnisse	65
3.1	Wachstumskinetiken der verwendeten Zelllinien.....	65
3.2	Charakterisierung von 3D Morphologietypen bei CRC Zelllinien	66
3.3	Untersuchung zur Rekultivierung von CRC Tumorsphäroiden auf Plastiksubstrat...73	
3.4	Untersuchung des Migrationsverhaltens von CRC Zelllinien und die Korrelation zum 3D Morphologietyp.....	74
3.4.1	Korrelation der 3D Zellmorphologie und dem Migrationspotential von CRC Zelllinien.....	75
3.4.2	Korrelation von invasiven Eigenschaften der CRC Zelllinien und ihrer 3D Morphologie	77
3.4.3	Der Zusammenhang zwischen der Zellproliferation und dem 3D Morphologietyp...80	
3.5	Der Einfluss der ECM auf die Zellproliferation.....	81
3.6	Die differenzielle Genregulation zwischen 2D und lrECM „on-top“ kultivierten Zellen	83
3.7	Untersuchung zur Proteinexpression in 2D und lrECM „on-top“ kultivierten Zellen	86
3.8	Integrinexpression und Lokalisation in 3D CRC Sphäroiden	87
3.9	Vergleichende Transkriptomanalyse von 2D und lrECM „on-top“ kultivierten Zellen	90
3.10	Die Wirksamkeit der EGF-Rezeptor Inhibition in dem 2D und lrECM „on-top“ Zellkulturmodell	98
3.11	Untersuchung des EGF-Rezeptorsignalwegs mittels Western Blots.....	102
4	Diskussion.....	105
4.1	Der Einfluss der lrECM auf die 3D Zellmorphologie von CRC Zelllinien.....	106
4.2	Die Korrelation der 3D Morphologie der untersuchten CRC Zelllinien und ihren zellbiologischen Eigenschaften	110

4.3	Die lrECM Kultivierung führt zu messbaren Veränderungen der Gen- und Proteinexpression.....	113
4.4	Die lrECM Kulturbedingung beeinflusst das Ansprechen auf EGF-Rezeptor Inhibition.....	120
4.5	Datenintegration und Perspektive.....	125
5	Zusammenfassung.....	127
6	Abstract.....	129
7	Abkürzungsverzeichnis.....	131
8	Literaturverzeichnis.....	135
	Anhang.....	154
	Danksagung.....	164
	Lebenslauf.....	167
	Eidesstattliche Erklärung.....	168

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Progression von normaler Darmmukosa zu einem metastasierenden CRC.....	5
Abbildung 2: EGF-Rezeptor Struktur und Inhibition über monoklonale Antikörper und Tyrosinkinase-Inhibitoren.	12
Abbildung 3: Schematische Darstellung des EGF-Rezeptors und den EGFR nachgeschalteten Signalwegen.	14
Abbildung 4: Strukturformel von Tyrphostin AG1478.	15
Abbildung 5: Bidirectionales Integrin Signalling.	21
Abbildung 6: Darstellung der verschiedenen Kultivierungsmöglichkeiten von Tumorzellen.	44
Abbildung 7: Klassifizierungssystem von Tumorsphäroiden in der IrECM.	46
Abbildung 8: Pipettierschema zur EGF-Rezeptor Inhibition mittels Tyrphostin AG1478 Behandlung im 96-well Format.	52
Abbildung 9: Aufbau eines 16mm-Edelstahl-Silikoneinsatzes („Fence“).	54
Abbildung 10: Untersuchung des Migrationspotentials der CRC Zelllinie HT-29 unter verschiedenen FBS-Konzentrationen.	55
Abbildung 11: Aufbau eines Boyden 2-Kammersystems.....	56
Abbildung 12: Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte eines Western Blots.	60
Abbildung 13: Wachstumskinetiken der verwendeten kolorektalen Adenokarzinomzelllinien SW-480, HT-29, DLD-1, LOVO, CACO-2, COLO 205 und COLO-206F.....	65
Abbildung 14: Morphologien der analysierten CRC Zelllinien in der 2D bzw. IrECM „on-top“ Kultur.	68
Abbildung 15: Vergleich von Morphologien der 2D und IrECM „on-top“ kultivierten CRC Zelllinien COLO-206F, LOVO und SW-480.	69
Abbildung 16: Der epitheliale Zelloberflächenmarker EPCAM wird von allen untersuchten CRC Sphäroiden exprimiert.....	71
Abbildung 17: Der epitheliale Zelloberflächenmarker EGFR wird von allen untersuchten CRC Sphäroiden exprimiert.	72
Abbildung 18: Rekultivierung von COLO 205 und HT-29 Tumorsphäroiden auf einem Plastiksubstrat.....	74

Abbildung 19: Repräsentative Ausschnitte des angefärbten Zellmonolayers eines Migrationsexperimentes der analysierten CRC Zelllinien.	75
Abbildung 20: Migrationsverhalten der Zelllinien CACO-2, DLD-1, HT-29, SW-480, LOVO, COLO 205 und COLO-206F.	76
Abbildung 21: Repräsentative Ausschnitte einer Membran eines Boyden 2-Kammer Versuches.	77
Abbildung 22: Untersuchung der Zellproliferation von CRC Zelllinien bei Kultivierung auf Plastiksubstrat.	81
Abbildung 23: Untersuchung des Einflusses der IrECM auf die Zellproliferation.	82
Abbildung 24: Veränderung der Genexpression von IrECM „on-top“ kultivierten CRC Zelllinien gegenüber 2D kultivierten Zellen.	84
Abbildung 25: Genexpression von CRC Zelllinien in 2D und IrECM „on-top“ Kulturen.....	85
Abbildung 26: Komparative Western Blot Analyse von Proteinextrakten der 2D und IrECM „on-top“ kultivierten CRC Zelllinien CACO-2, DLD-1, HT-29, SW-480, LOVO, COLO 205 und COLO-206F.	87
Abbildung 27: Komparative Western Blot Analyse von Integrin $\alpha 6$ in CRC Sphäroiden und 2D kultivierten Zellen.	88
Abbildung 28: Untersuchung der Expression und räumlichen Verteilung von Integrin $\alpha 6$ in CRC Sphäroiden mittels Immunfluoreszenzfärbung und konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie.....	89
Abbildung 29: Untersuchung der Expression und räumlichen Verteilung von Integrin $\beta 1$ in CRC Sphäroiden mittels Immunfluoreszenzfärbung und konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie.....	90
Abbildung 30: Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte zur Generierung der Transkriptomanalyse von 2D und IrECM „on-top“ kultivierten CRC Zelllinien.	91
Abbildung 31: Hierarchische Clusteranalyse von 2D und IrECM „on-top“ kultivierten CRC Zelllinien.	94
Abbildung 32: „Heatmap“ der statistisch signifikant differentiell regulierten Gene zwischen 2D und IrECM „on-top“ (3D) kultivierten CRC Zelllinien.	95
Abbildung 33: „Pathway“-Analyse der Gene die innerhalb der beiden Zellkulturmodelle, 2D versus IrECM „on-top“, signifikant differentiell reguliert sind.	97
Abbildung 34: Inhibition des EGF-Rezeptors in CACO-2 Zellen mittels AG1478 Behandlung im 2D versus IrECM „on-top“ Modell.....	99

Abbildung 35: Inhibition des EGF-Rezeptors in CACO-2 Zellen mittels AG1478 Behandlung im 2D versus IrECM „on-top“ Modell über einen Zeitraum von vier Tagen.....	100
Abbildung 36: EGF-Rezeptor Inhibition in DLD-1 Zellen durch AG1478 Behandlung im 2D versus IrECM „on-top“ Modell.	101
Abbildung 37: Inhibition des EGF-Rezeptors mittels AG1478 Behandlung in HT-29 Zellen im 2D und IrECM „on-top“ Modell.....	102
Abbildung 38: Western Blot Analyse von Akt1, Phospho-Akt, p44/42 MAPK und Phospho-p44/42 MAPK in HT-29, CACO-2 und SKBR3 Zellen.	104

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation der kolorektalen Karzinome.....	8
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Primärantikörper für die Western Blot Analyse.	30
Tabelle 3: Auflistung der für die Western Blot Analysen verwendeten Sekundärantikörper.....	31
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Primärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung.....	31
Tabelle 5: Auflistung der Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung.....	31
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide.....	32
Tabelle 7: Klinische und pathologische Beschreibung der verwendeten Zelllinien.....	34
Tabelle 8: Auflistung der URLs verwendeter Datenbanken.....	35
Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Server.	35
Tabelle 10: STR Analyse der verwendeten kolorektalen Adenokarzinomzelllinien.....	36
Tabelle 11: Ergebnisse der <i>KRAS</i> und <i>BRAF</i> Mutationsanalyse der verwendeten CRC Zelllinien.....	37
Tabelle 12: Kontingenztafel zur Berechnung des Fishers-Exact-Tests.	70
Tabelle 13: Bewertungsskala des berechneten Invasionsindex.....	78
Tabelle 14: Bewertung des Invasionsindex der untersuchten Zelllinien.....	78
Tabelle 15: Auflistung der „RNA Integrity Number“ (RIN) der RNA Proben.....	92
Tabelle 16: Auflistung der Anzahl der Proben, die für die „Agilent Human 8x60K High Density Oligonucleotide Microarray“ Analyse verwendet wurden.	93
Tabelle 17: Auflistung der Prozesse an denen die signifikant differentiell regulierten Gene zwischen dem 2D und dem IrECM „on-top“ Modell beteiligt sind.	96

1 Einleitung

1.1 Tumore des Menschen

Ein Tumor, auch als Neoplasie bezeichnet, stellt eine abnorme Gewebsmasse dar, die durch eine progressive, autonome und anormale Proliferation körpereigener Zellen hervorgerufen wird. Dabei gliedert sich der Tumor weder funktionell noch strukturell in das umliegende Normalgewebe ein. Bestimmte genetische Veränderungen führen dazu, dass sich die Zellen permanenten, körpereigenen Kontrollmechanismen entziehen können. Dies hat zur Folge, dass das Verhältnis zwischen Zellproliferation und dem programmierten Zelltod (Apoptose), in ein Ungleichgewicht gerät (Grundmann, 1992). Dabei spielt unter anderem die Hochregulation von Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, die durch Mutationen hervorgerufen werden, eine wichtige Rolle (Balmain *et al.*, 2003). Das Tumorsuppressorgen *TP53* (*Tumor Protein 53*) ist beispielsweise in 50 % aller humaner Tumore mutiert (Efeyan and Serrano, 2007; Hussain and Harris, 2006), was dazu führt, dass die Apoptose nicht eingeleitet werden kann (Hussain and Harris, 2006; Levine *et al.*, 1991) und es zur Ausbildung von Tumoren kommt. Eine weitere Gruppe von Genen, die als Stabilitätsgene bezeichnet werden, ist außerdem für die Tumorgenese verantwortlich (Vogelstein and Kinzler, 2004). Säugerzellen besitzen eine Vielzahl an Schutzvorrichtungen, die den Organismus vor möglichen lethalen Effekten, hervorgerufen durch Mutationen in einzelnen Genen, schützen. Es kann nur dann zu einer Ausbildung von invasiven Tumoren kommen, wenn mehrere Gendefekte vorliegen (Vogelstein and Kinzler, 2004). Mutationen, die Tumoren verursachen, können sowohl in Keimbahnzellen als auch in somatischen Zellen auftreten.

In vielen soliden Tumoren als auch bei Leukämien wurden in den letzten Jahren sogenannte Tumorstammzellen nachgewiesen. Diese Zellen besitzen Eigenschaften von normalen Stammzellen. Sie werden als die Zellen innerhalb des Tumors beschrieben, die das Potential der Selbsterneuerung besitzen und die Zellen, die die heterogene Tumormasse ausmachen, hervorbringen (Clarke *et al.*, 2006). Dieses Konzept wird als Tumorstammzell Modell betitelt. Nach diesem Konzept können Tumorstammzellen aus normalen Organzellen oder aus Stammzellen eines Organs durch Mutationen hervorgehen. Dabei können sie, müssen aber nicht, der Ursprung des Tumors sein (Clarke *et al.*, 2006).

Tumore können in jeder Art von Geweben entstehen, wobei man dabei zwischen zwei Arten von Tumoren unterscheidet: den nicht invasiven (benignen) und den invasiven, metastasierenden (malignen) Tumoren. Merkmale eines benignen Tumors sind ein autonomes

und lokal beschränktes Wachstum, wobei es nicht zur Infiltration von umliegendem Gewebe und der Ausbildung von Metastasen kommt. Im Unterschied zu den benignen Tumoren wachsen die malignen Tumore invasiv und grenzen sich wenn überhaupt nur schwer vom gesunden Gewebe ab. Die Zellkerne sind in ihrer Form, Anzahl und Größe stark verändert. Je undifferenzierter die Tumorzellen sind, desto höher ist ihr Malignitätsgrad (Hermanek, 1989). Viele maligne Tumoren bilden Metastasen aus, was maligne Tumore nach Herz-Kreislaufkrankungen auch zu der zweithäufigsten Todesursache bei Männern und Frauen in Deutschland macht. Die "Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V." (GEKID) hat im Jahre 2010, basierend auf Datensätzen des Jahres 2006, die relativen 5-Jahresüberlebensraten über alle Krebsarten für Frauen mit einem Wert zwischen 61- 62 % und für Männer zwischen 54 % und 57 % angegeben. Tumore, die aus dem Epithelgewebe entstehen, so genannte Karzinome, machen den größten Anteil von malignen Tumoren aus.

1.2 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom (ColoRectal Cancer, CRC) ist ein maligner Tumor epithelialer Herkunft, der über 95 % der bösartigen Darmtumore ausmacht. Tumore des Kolons und des Rektums sind weltweit die dritthäufigsten Krebserkrankungen und die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen und Männern. Das Verhältnis von Kolon- zu Rektum-Karzinomen beträgt in Industrieländern 2:1 (Arnold and Seufferlein, 2010; Labianca *et al.*, 2010). In Europa werden jährlich 250.000 neue CRC-Fälle beschrieben, was ca. 9 % aller diagnostizierten Malignitäten ausmacht. Über 70 % der Patienten mit einem CRC sind über 65 Jahre alt. Im Gegensatz dazu ist die Rate von Patienten unter 45 Jahren, die am Kolonkarzinom erkrankt sind, mit 2 pro 100.000/Jahr sehr gering. In der Altersgruppe von 45-54 Jahren liegt die Inzidenz von Kolontumoren bei ca. 20 pro 100.000/Jahr und steigt danach drastisch an; 55 pro 100.000/Jahr bei 55-64 jährigen Patienten, 150 in der Altersgruppe von 65-74 Jahren und >250 pro 100.000/Jahr für Patienten über 75 Jahren (Labianca *et al.*, 2010). In Deutschland ist Darmkrebs mit 16 % die zweithäufigste Krebserkrankung und mit 12 % bis 14 % auch die zweithäufigste Krebstodesursache. In den Jahren zwischen 1980 und 2006 hat die altersstandardisierte Inzidenz an Darmkrebs sowohl bei Männern als auch bei Frauen zugenommen: um 34 % bei den Männern und 26 % bei den Frauen. Hingegen nahmen die altersstandardisierten Sterberaten bei Frauen um 38 % und bei Männern um 24 % ab (Robert Koch Institut).

In den meisten Fällen tritt das CRC sporadisch auf, seltener als hereditäre Krebserkrankung, welche 2-5 % aller CRC-Fälle ausmachen (Jasperson *et al.*, 2010). Die bekanntesten unter den hereditären Formen sind die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre nichtpolypöse kolorektale Karzinom (HNPCC), auch Lynch Syndrom genannt. Sowohl FAP als auch HNPCC werden autosomal dominant vererbt (Jasperson *et al.*, 2010). Das Lynch Syndrom resultiert aus Keimbahnmutationen in den DNA-Mismatch-Repair-Genen *MSH2* (*mutS homolog 2*), *MLH1* (*mutL homolog 1*), *MSH6* (*mutS homolog 6*) und *PMS2* (*postmeiotic segregation increased 2*). FAP entwickelt sich auf Grund von Keimbahnmutationen im *APC* (*adenomatous polyposis coli*)-Gen und äußert sich in der Ausbildung von hundert bis zu tausenden von Adenomen im Dickdarm (Goss and Groden, 2000; Jasperson *et al.*, 2010; Kinzler and Vogelstein, 1996).

Die Einteilung des CRCs erfolgt primär nach seiner Lokalisation in Tumore des Kolon ascendens, Kolon transversum, Kolon deszendens, Sigma und Rektum. Von allen CRCs befinden sich 50 % im Rektum, 30 % der restlichen im Kolon ascendens, 15 % im Kolon transversum und 45 % im Sigma. Morphologisch betrachtet handelt es sich beim CRC mit 96 % hauptsächlich um Adenokarzinome, aber auch andere Subtypen sind bekannt. Zu ihnen gehören mit 2-4 % die Sigelringzellkarzinome (Labianca *et al.*, 2010), adenosquamöse Karzinome, undifferenzierte Karzinome und Plattenepithelkarzinome (Ponz de Leon and Di Gregorio, 2001).

Zu den Risikofaktoren, die mit der Entwicklung eines CRC assoziiert sind, gehören neben dem Tabak- und Alkoholkonsum, ballaststoffarme Kost und Verzehr von rotem Fleisch, mangelnde körperliche Bewegung und Adipositas, der chronische Gebrauch von nicht-steroidalen, Anti-inflammatorischen Medikamenten und Aspirin, das Alter, umweltbedingte Faktoren sowie genetische Prädispositionen (Labianca *et al.*, 2010).

1.3 Modelle zur Tumorentstehung des kolorektalen Karzinoms

Die Entwicklung von sporadischen kolorektalen Tumoren ist ein mehrstufiger Prozess, dem sukzessive Mutationen in verschiedenen Genen vorangehen (Cho and Vogelstein, 1992; Hanahan and Weinberg, 2000). Hierbei spielt das Konzept der Adenom-Karzinom-Sequenz nach Vogelstein und Fearon eine wichtige Rolle (Vogelstein *et al.*, 1988). Dieses Konzept besagt, dass die überwiegende Zahl an kolorektalen Karzinomen über Stufen genetischer Mutationen aus Adenomen, also gutartigen Geschwulsten der Schleimhaut, entstehen, wobei es nicht auf den zeitlichen Ablauf, sondern auf die Akkumulation genetischer Veränderungen

für die Progression vom Adenom zum Karzinom ankommt (Vogelstein *et al.*, 1988). Wie in Abbildung 1 dargestellt, bildet sich der Tumor aus epithelialen Zellen des Kolons, wobei die Erkrankung mit einem benignen, adenomatösen Polyp beginnt, der sich zu einem Adenom mit hochgradiger Dysplasie entwickelt und schließlich zu einem invasiven Tumor fortschreitet (Vogelstein *et al.*, 1988). Mechanismen wie genomische Instabilität, chromosomale Instabilität, DNA-Reparatur-Defekte und veränderte DNA-Methylierung/CpG-Insel Methylierung, Inaktivierung von Tumor-Suppressorgenen durch Mutationen (*APC*, *TP53* und *TGF- β* (*transforming growth factor β*)) sowie Aktivierung von Onkogen-Signalwegen *RAS* (*rat sarcoma viral oncogene homolog*), *BRAF* (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) und *PIK3CA* (*phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide*)) tragen zur Entstehung vom CRC bei (Markowitz and Bertagnoli, 2009).

Der häufigste Typ der genomischen Instabilität im CRC ist die chromosomale Instabilität, die eine Reihe an Veränderungen in der chromosomalen Kopienanzahl und der Struktur verursacht (Lengauer *et al.*, 1997). Sporadische CRCs sind in 65-70 % der Fälle chromosomal instabil (Pino and Chung, 2010). Zellen, die eine chromosomale Instabilität aufweisen, zeigen oftmals einen Verlust einer Wildtyp-Kopie von Tumorsuppressorgenen wie *APC*, *TP53* und *SMAD4* (*SMAD family member 4*) (Grady and Markowitz, 2002). In einer Subgruppe von Patienten mit CRC findet man eine Inaktivierung von Genen, die an der Reparatur von DNA Basen-Basen-Fehlpaarung, so genannten „Mismatch-Repair“ Genen, beteiligt sind. Diese Inaktivierung kann wie bei HNPCC Patienten hereditär vorliegen oder wie bei Tumoren mit Methylierungs-assoziiertem „Silencing“ von DNA „Mismatch-Repair“ Genen erworben sein. Der Verlust der „Mismatch-Repair“ Funktionen, z.B. von *MLH1* und *MSH2*, bei HNPCC Patienten beruht nicht allein auf der hereditären Inaktivierung der „Mismatch-Repair“ Gene, sondern zusätzlich findet auch noch eine somatische Inaktivierung von parentalen Wildtyp-Allelen statt (Boland *et al.*, 2008). Eine somatische Inaktivierung der „Mismatch-Repair“ Gene tritt bei 15 % der Patienten mit nicht hereditären CRC auf. Bei diesen Patienten werden die „Mismatch-Repair“ Gene durch ein biallelisches „Silencing“ der Promotorregion des *MLH1* Gens durch Promotor-Methylierung inaktiviert (Kane *et al.*, 1997; Veigl *et al.*, 1998).

Das epigenetische „Silencing“ von Genen, meistens verursacht durch eine veränderte DNA-Methylierung, ist ein weiterer Mechanismus der Gen-Inaktivierung bei Patienten mit CRC (Issa, 2004; Kondo and Issa, 2004). Der CpG-Insel-Methylierungs-Phänotyp (CIMP) führt zu einer Gen-Inaktivierung durch Hypermethylierung von CpG-Inseln, GC-reiche Regionen die in über der Hälfte aller humaner Gene in der 5'-Region vorkommen (Pino and

Chung, 2010). Diese Region umfasst oftmals den Promotor und die transkriptionelle Startstelle des Gens. Methylierungen an diesen Stellen verhindern, dass Transkriptionsfaktoren an den Promotor binden können, wodurch die Transkription des Gens verhindert wird (Pino and Chung, 2010).

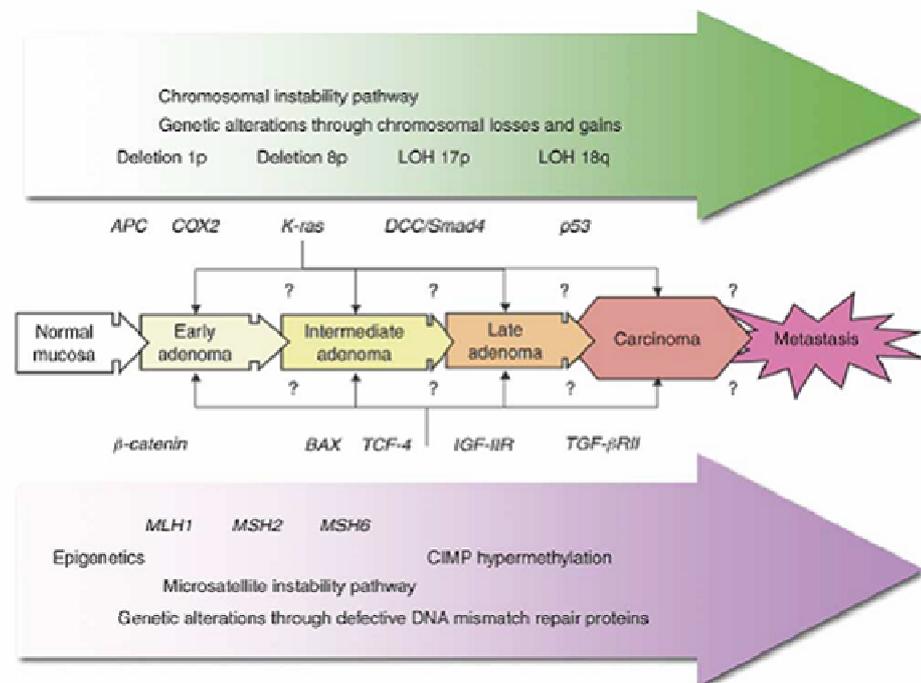


Abbildung 1: Die Progression von normaler Darmmucosa zu einem metastasierenden CRC. Mindestens drei verschiedene Signalwege sind an der Entstehung eines metastasierenden CRC beteiligt. Dazu gehört die chromosomale Instabilität, die Mikrosatelliten-Instabilität und der CpG-Insel Methylierungs-Signalweg. (Quelle: (Pino and Chung, 2010)).

Die Aktivierung des Wnt-Signalwegs ist offenbar bei vielen CRCs als das initiiierende Ereignis in der Tumorentwicklung angesehen (Goss and Groden, 2000). Hervorgerufen wird diese Aktivierung durch Mutationen im Tumorsuppressorgen *APC*, welches auf Chromosom 5q21 lokalisiert ist (Herrera *et al.*, 1986; Thliveris *et al.*, 1996). *APC*-Mutationen sind die am häufigsten vorkommende Mutation beim CRC. Ist *APC* mutiert, wird der Wnt-Signalweg konstitutiv aktiviert, da keine *APC*-vermittelte Degradation von β -catenin stattfindet (Goss and Groden, 2000). Mutationen im *APC*-Gen treten sowohl bei hereditären (FAP), als auch bei sporadischen, kolorektalen Tumoren auf (Markowitz and Bertagnolli, 2009).

Die Inaktivierung des p53-Signalwegs durch Mutation von *TP53* ist nach der *APC*-Mutation die zweithäufigste Mutation, die zu der Entstehung von CRC führt. In den meisten Tumoren sind beide *TP53*-Allele inaktiviert, das eine in der Regel durch eine „Missense“-Mutation, welche die transkriptionelle Aktivität von *TP53* inaktiviert, das andere

durch eine chromosomale Deletion von 17q (Baker *et al.*, 1989; Baker *et al.*, 1990a). Die Inaktivierung von *TP53* ist oftmals mit der Transition von einem großen Adenom in ein invasives Karzinom assoziiert (Baker *et al.*, 1990b).

Die Inaktivierung des TGF- β Signalwegs durch Mutation ist ein weiterer wichtiger Schritt in der CRC-Progression. In etwa einem Drittel aller CRCs, die eine Mikrosatelliteninstabilität aufweisen, liegt *TGFBR2* (*transforming growth factor, beta receptor II*) mutiert vor (Markowitz *et al.*, 1995). Vogelstein *et al.* identifizierten ein weiteres, mutiertes Tumorsuppressorgen, das *MCC*-Gen (*mutated in colorectal cancer*), welches ebenfalls auf Chromosom 5q21 lokalisiert ist und „loss of function“ Mutationen in kolorektalen Tumoren aufweist (Fearon, 2010; Kinzler *et al.*, 1991; Labianca *et al.*, 2010).

Neben der Inaktivierung von Tumorsuppressorgen spielt auch die Aktivierung von Onkogenen und deren Signalwegen eine entscheidende Rolle bei der CRC-Entstehung. Mutationen in *RAS* oder *BRAF*, die den Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) Signalweg aktivieren, treten in 37 % bzw. in 13 % aller CRCs auf (Bos *et al.*, 1987; Davies *et al.*, 2002; Nosho *et al.*, 2008; Rajagopalan *et al.*, 2002). *RAS*-Mutationen, hauptsächlich *KRAS* (*v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), aktivieren die GTPase-Aktivität, die wiederum direkte Signale an RAF weiterleitet. *BRAF*-Mutationen führen zu *BRAF* Serin-Threonin Kinase Aktivität, die wiederum die MAPK Signalkaskade induziert (Rajagopalan *et al.*, 2002; Siena *et al.*, 2009).

Ein weiteres Modell zur Entstehung von kolorektalen Karzinomen, das Tumorstammzell-Modell, beruht auf einer ähnlich alten Idee wie das Mutationsmodell (Wicha *et al.*, 2006) und postuliert, dass Tumore aus einer kleinen Fraktion von Tumorzellen entstehen, die Stammzeleigenschaften besitzen (Boman and Wicha, 2008). Diese Zellen werden Tumorstammzellen (Cancer Stem Cells, CSC) genannt und weisen vergleichbare Eigenschaften von Stammzellen auf: (1) aus ihnen geht eine Vielzahl der differenzierten Zellen hervor, die in dem Tumor vorhanden sind (2) sie sind langlebig (3) besitzen Selbsterneuerungspotential (4) weisen Apoptoseresistenz auf (Gil *et al.*, 2008; Papailiou *et al.*, 2010; Potten and Loeffler, 1990; Vermeulen *et al.*, 2008a).

Tumorstammzellen konnten erstmals in den späten 1990er Jahren bei Patienten mit akuter myeloider Leukämie isoliert und nachgewiesen werden (Bonnet and Dick, 1997). Mittlerweile wurden CSC bei verschiedensten Tumorarten in Geweben der Mamma (Nguyen *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2010), des Gehirns (Singh *et al.*, 2004), der Lunge (Kim *et al.*, 2005), der Leber (Ma *et al.*, 2007), dem Melanom (Schatten *et al.*, 2008), dem Pankreas (Li *et al.*, 2007) und dem Kolon (Pardal *et al.*, 2003) identifiziert. Ungeklärt bleibt bis zum heutigen

Zeitpunkt die Frage, ob CSC die direkten Nachfolger mutierter Stammzellen sind, oder ob reife Zellen Tumorstammzelleigenschaften während der Tumorformation erlangen (Papailiou *et al.*, 2010). Die Transformation einer Stammzelle in eine Tumorstammzelle beruht auf einer Akkumulation von genetischen Modifikationen. Dazu zählen Mutationen in Onkogenen, Tumorsuppressorgenen und „Mismatch-Repair“ Genen. Aber auch epigenetische Veränderungen in Form einer gestörten Methylierung oder Histonmodifikation führen zur Transformation der Stammzelle in eine Tumorstammzelle (Costa *et al.*, 2007) (Gil *et al.*, 2008).

1.4 Klinisches Staging des kolorektalen Karzinoms

Die pathologische Beurteilung und das Staging zum Zeitpunkt der Diagnose sind die wichtigsten prognostischen Indikatoren beim CRC. Nach ihrem Differenzierungsgrad unterscheidet man Tumoren, die mäßig differenziert sind (G1), mäßig differenzierte Karzinome (G2) und schlecht differenzierte Karzinome (G3) voneinander (Tannapfel and Wittekind, 2010). Außerdem spielt es eine Rolle, ob der Tumor bei einer Operation vollständig entfernt werden konnte. Darüber gibt die R-Klassifikation (R0, R1 und R2) Auskunft. Die Bezeichnung R0 gibt an, dass kein Residualtumor vorliegt, bei R1 kann ein Residualtumor mikroskopisch nachgewiesen werden und bei R2 handelt es sich um einen sichtbaren Residualtumor. Weiterhin erhalten die Tumore eine TNM-Klassifikation, welche die Tiefeninfiltration und die Tumorgöße bzw. die Infiltration in Nachbarorgane beinhaltet. Dabei steht „T“ für die Größe und Ausdehnung des Primärtumors und „N“ für die Anzahl der befallenen regionalen Lymphknoten, während „M“ das Auftreten und die Lokalisation von Fernmetastasen beschreibt. Die TNM-Klassifikation ist in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation der kolorektalen Karzinome. (Quelle: (Meyerhardt and Mayer, 2005)).

TNM	Beschreibung
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor infiltrierte die Submukosa
T2	Tumor infiltrierte die Muscularis propria
T3	Tumor infiltrierte die M. propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4	Tumor infiltrierte direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforierte das viszerale Peritoneum
Nx	Benachbarte (regionäre) Lymphknoten sind nicht beurteilbar
N0	Kein Anhalt für benachbarte Lymphknotenmetastasen (mindestens 12 Lymphknoten wurden untersucht)
N1	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
Mx	Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen treten am häufigsten in Leber, Lunge und Lymphknoten, seltener im Gehirn und im Skelett auf.

1.5 Die Therapie des kolorektalen Karzinoms

Obwohl in den letzten Jahren die Sterberate deutlich zurückgegangen ist, ist das CRC weltweit die zweithäufigste, krebsbedingte Todesursache sowohl bei Männern als auch bei Frauen (Arnold and Seufferlein, 2010).

Ausschlaggebend für die rückläufige Sterberate ist zum einen die Diagnose der Tumoren in sehr frühen Stadien im Rahmen von Darmkrebs Vorsorgeuntersuchungen, zum anderen wurde durch die Etablierung und breite Anwendung multimodaler Therapiekonzepte eine breitflächige Verbesserung der Therapiequalität erzielt. Dazu gehören neben chirurgischen Eingriffen auch eine Verbesserung der Chemotherapien und Radiotherapien (Arnold and Seufferlein, 2010).

Heutzutage wird die Behandlung des CRCs durch kurative Maßnahmen angegangen, in deren zentralem Mittelpunkt die Chirurgie steht. Ausschlaggebend für eine Heilung ist die erfolgreiche Operation, bei der eine komplette Resektion des Tumors und ggf. von

Lebermetastasen vorgenommen wird. Bei Patienten des Stadium III werden zusätzlich adjuvante Therapien in Form einer Chemotherapie angewandt, um Lymphknotenmetastasen zu behandeln. Bei Rektumkarzinomen ist häufig auch eine neoadjuvante Radiotherapie erforderlich.

Das Rückgrad der Chemotherapie-basierten CRC-Therapie bildet das Zytostatikum 5-Fluorouracil, welches zur Gruppe der Antimetabolite gehört und in den 1950er Jahren eingeführt wurde (Overman and Hoff, 2007). Es weist eine strukturelle Ähnlichkeit mit der Pyrimidinbase Uracil auf und wird an ihrer Stelle in die RNA eingebaut. Außerdem hemmt es die Thymidilat-Synthase, ein Schlüsselenzym der Pyrimidin-Biosynthese. Hierdurch wird die Umwandlung von Desoxyuridinmonophosphat (dUMP) in den DNA-Baustein Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) blockiert, was zu einer Hemmung des Zellwachstums führt (Sobrero *et al.*, 2000). Um die zytotoxische Aktivität zu erhöhen, wird 5-Fluorouracil häufig mit Leukovorin, einem reduzierten Folat, kombiniert (Meyerhardt and Mayer, 2005; Zhang *et al.*, 1992). Neben 5-Fluorouracil finden auch Irinotecan und Oxaliplatin bei der Chemotherapie des CRCs Anwendung. Irinotecan ist ein Topoisomerase I-Hemmer, der Brüche im DNA-Einzelstrang bewirkt (Iyer and Ratain, 1998). Oxaliplatin ist ein Platin-Derivat der dritten Generation und führt zur Ausbildung von voluminösen DNA-Addukten und induziert zelluläre Apoptose (Raymond *et al.*, 1998).

Neben der Chemotherapie spielt die so genannte „Targeted Therapy“, die molekulare Therapie, zunehmend eine wichtige Rolle bei der Behandlung von CRCs. Das Ziel dieser Therapiestrategie ist es, essentielle zelluläre Signalwege des Tumorwachstums und der Metastasenbildung zu inhibieren und dabei noch möglichst eine Reduktion der toxischen Effekte von Chemotherapien zu erzielen (Meyerhardt and Mayer, 2005).

In den onkogen wirkenden Signalwegen, die mit Hilfe der „Targeted Therapy“ gehemmt werden sollen, ist die Proteinphosphorylierung ein kritischer Prozess in der Signalübertragung. Daher sind Proteinkinasen die derzeit am häufigsten getesteten Zielstrukturen für die „Targeted Therapy“. Von den insgesamt über 500 Proteinkinasen des humanen Genoms werden bzw. wurden derzeit ca. 30 Kinasen als Zielstruktur für solche zielgerichteten Krebstherapien in klinischen Studien untersucht (Arnold and Seufferlein, 2010).

Rezeptortyrosinkinasen sind Transmembranglykoproteine, die eine essentielle Rolle bei der Signalweiterleitung in der Zelle spielen. Sie können über einen Antikörper, der den Rezeptor bindet und somit die Ligandenbindung blockiert, behandelt werden. Eine Alternative dazu ist die Anwendung eines Antikörpers, der an den Liganden bindet und seine

Interaktion mit dem Rezeptor verhindert. Eine weitere Option ist die Anwendung von „Köder“-Rezeptoren („decoy receptors“), die den Liganden binden und sogenannten „Small Molecules“, welche die Aktivität der Proteinkinase ebenfalls blockieren. Diese Inhibitoren werden in Typ I und Typ II unterteilt. Erstere erkennen die aktive Konformation des Proteins und letztere die inaktive Konformation. Sie konkurrieren mit ATP um die ATP-Bindestelle in der Gelenkregion („hinge region“) der Zielkinase, indem sie die Wasserstoffbindung nachahmen, die normalerweise vom Adeninring des ATPs gebildet wird (Liu and Gray, 2006; Zhang *et al.*, 2009). Andere Moleküle inhibieren allosterisch die katalytische Aktivität indem sie außerhalb der ATP-Bindestelle binden oder sie binden kovalent an die Aktivierungsdomäne der Kinase (Zhang *et al.*, 2009).

Zu der Gruppe der „Small Molecule“ Inhibitoren gehören Gefitinib, Erlotinib und Lapatinib. Bei Gefitinib handelt es sich um einen reversiblen EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI) der im Jahre 2003 zugelassen wurde und die Phosphorylierung der EGFR-Tyrosinkinase und damit den nachgeschalteten Signalweg inhibiert. Eine EGFR Internalisierung oder Degradation, wie sie bei der Antikörper basierten EGFR Inhibition stattfindet, tritt nicht auf (Overman and Hoff, 2007). Erlotinib ist ebenfalls ein reversibler TKI und wird im Gegensatz zu Gefitinib nur als Monotherapie im metastasierenden CRC angewendet. Es inhibiert ebenfalls die Phosphorylierung von EGFR, was *in vitro* bei humanen Tumorzelllinien zur verminderten Tumorzellproliferation, G1-Phase Zellzyklusarrest und Apoptose führt (Overman and Hoff, 2007). Bei Lapatinib handelt es sich um einen dualen TKI, der sowohl die Tyrosinkinaseaktivität von EGFR als auch von HER2 blockiert (Kruser and Wheeler, 2010).

In der klinischen Praxis werden derzeit beim CRC zwei Strategien der antikörperbasierten „Targeted Therapy“ verwendet: zum einen die Blockierung der Angiogenese mittels des monoklonalen Antikörpers Bevacizumab der gegen VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) gerichtet ist, zum anderen die Inhibition des EGF-Rezeptors über die monoklonalen Antikörper Cetuximab und Panitumumab.

Die Angiogenese, die Neubildung von Blutgefäßen, ist ein wichtiger Prozess in der Tumorentstehung und Progression. Daher gehört der Angiogenesehemmer Bevacizumab zu den wichtigsten Medikamenten in der CRC Therapie. Er ist ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF, welcher die Bildung von Blutgefäßen im Tumor stimuliert (Ferrara *et al.*, 2003). Bevacizumab wird in Kombination mit Standardchemotherapien eingesetzt (Heinemann and Hoff, 2010; Meyerhardt and Mayer, 2005).

Cetuximab ist ein monoklonaler Antikörper, der sich gegen die extrazelluläre Bindedomäne des EGF-Rezeptors richtet und wurde als erster dieser Inhibitoren in den USA zur Behandlung metastasierender CRC eingesetzt (Meyerhardt and Mayer, 2005).

Panitumumab ist ein komplett humaner, monoklonaler IgG2 Antikörper, der gegen EGFR gerichtet ist und war der erste, der in klinischen Studien zur Behandlung von soliden Tumoren eingesetzt wurde (Berardi *et al.*, 2010). Er induziert einen Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase des Zellzyklusses, während Cetuximab einen Arrest in der G1-Phase verursacht. Im Gegensatz zu Cetuximab induziert Panitumumab Antikörper-abhängige, zelluläre Zytotoxizität (Carteni *et al.*, 2007; Pfeiffer *et al.*, 2007).

Ein weiterer humanisierter IgG1 Anti-EGFR monoklonaler Antikörper ist Matuzumab, der in der Phase I von klinischen Studien Wirkung in fortgeschrittenen soliden Tumoren gezeigt hat (Overman and Hoff, 2007). *KRAS* Mutationsanalysen werden routinemäßig bei fortgeschrittenem CRC vor Beginn der monoklonalen Antikörpertherapie gegen den EGF-Rezeptor durchgeführt, damit nur die Patienten diese Therapie erhalten, die die höchsten Wahrscheinlichkeiten aufweisen von dieser Therapieform zu profitieren (Siena *et al.*, 2009).

Neben dem EGF-Rezeptor stellt EPCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) eine weitere molekulare Zielstruktur beim CRC dar. EPCAM ist ein Zelloberflächen-Glykoprotein das auf einigen normalen aber den meisten neoplastischen epithelialen Zellen exprimiert wird und Zelladhäsion vermittelt. Beim CRC ist es häufig überexprimiert (Arnold and Seufferlein, 2010). Ein trifunktionaler Antikörper, Catumaxomab, wird in der zielstrukturgerichteten Therapie gegen EPCAM eingesetzt. Die Bezeichnung trifunktional resultiert daraus, dass er sowohl an Tumorzellen, T-Zellen und akzessorische Zellen, wie z.B. Makrophagen oder natürliche Killerzellen binden kann (Seimetz *et al.*, 2010).

Die Wirkung von monoklonalen Antikörpern und TKI zur Therapie von CRCs ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

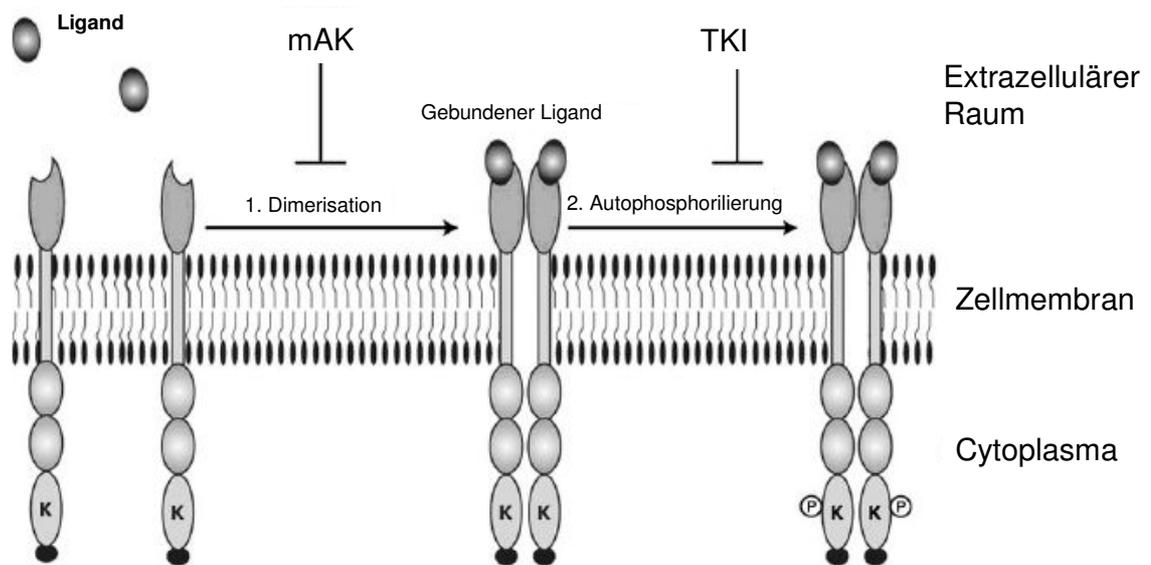


Abbildung 2: EGF-Rezeptor Struktur und Inhibition über monoklonale Antikörper und Tyrosinkinase-Inhibitoren. Monoklonale Antikörper verhindern die Dimerisierung von EGFR während TKIs die Autophosphorylierung des Rezeptors unterbinden. mAK = monoklonaler Antikörper, TKI = Tyrosinkinase-Inhibitor. (Quelle: verändert nach (Overman and Hoff, 2007)).

1.6 Tyrphostine als EGFR Inhibitoren

Wie bereits im vorigen Kapitel beschrieben hat die molekulare Therapie Einzug in die Klinik gefunden. Dabei spielen Protein-Tyrosinkinasen eine entscheidende Rolle. Tyrosinkinasen sind wichtige Signalproteine, welche bei abberanter Aktivierung häufig onkogen wirken und daher ein primäres Ziel in der onkologischen Therapie darstellen.

Tyrphostine (Tyrosin Phosphorylation Inhibitors) sind Tyrosin-Phosphorylierungs-Inhibitoren von geringem molekularen Gewicht, die erstmals als antiproliferierende Agenzien in den späten 1980er Jahren beschrieben wurden und zu der Gruppe der „Small Molecule Inhibitors“ gehören (Levitzki, 2002; Yaish *et al.*, 1988). Sie sind die erste Generation von Protein-Tyrosinkinase-Inhibitoren und besitzen die Fähigkeit, den EGF-Rezeptor und seine EGF-abhängige Autophosphorylierung spezifisch zu inhibieren. Dabei werden andere Rezeptortyrosinkinasen wie Insulin, die Insulin Rezeptorkinase oder die Proteinkinase A nur sehr geringfügig inhibiert (Yaish *et al.*, 1988).

Der EGF-Rezeptor ist ein 170 kDa Transmembrannglykoprotein, welcher in die Signalwege des Zellwachstums, der Differenzierung, der Proliferation und der Apoptose involviert ist (Baselga, 2002). Er gehört zu der HER-Rezeptorfamilie, die aus vier Mitgliedern besteht: EGFR (HER1/ERbB1) (Ullrich *et al.*, 1984), HER2 (ERbB2) (Coussens *et al.*, 1985; Schechter *et al.*, 1984), HER3 (ERbB3) (Kraus *et al.*, 1989; Plowman *et al.*, 1990) und HER4 (ERBb4) (Plowman *et al.*, 1993). Der EGF-Rezeptor besteht aus einer glykosylierten

und Disulfid-gebundenen extrazellulären Domäne, einer einzelnen hydrophoben Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne, die eine Kinasedomäne und diverse Phosphorylierungstellen besitzt. Die extrazelluläre Domäne des Rezeptors wird zusätzlich in vier verschiedene Bereiche unterteilt. Die Bereiche I und III stellen die Ligandenbindungsstellen dar, während die Domänen II und IV an der Rezeptordimerisierung beteiligt sind (Hynes and Lane, 2005). Die Aktivierung des EGF-Rezeptors erfolgt unter anderem über eine selektive und spezifische Interaktion mit Mitgliedern einer Peptidfamilie der Wachstumsfaktoren mit EGF-ähnlichem Motiv. Dazu gehören EGF (epidermal growth factor) (Gray *et al.*, 1983; Savage and Cohen, 1972), HB-EGF (heparin bindung EGF-like growth factor) (Higashiyama *et al.*, 1991), EPR (epiregulin) (Toyoda *et al.*, 1995), EPG (epigen) (Strachan *et al.*, 2001), TGF- α (transforming growth factor-a) (Derynck *et al.*, 1984), BTC (betacellulin) (Shing *et al.*, 1993) und AR (amphiregulin) (Shoyab *et al.*, 1989). Die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors führt zu einer Veränderung der Konformation des Rezeptors und Bildung von Rezeptordimeren. Folglich resultiert die Liganden-induzierte Rezeptordimerisierung in der Aktivierung der intrinsischen Kinasedomäne und Autophosphorylierung der Tyrosinreste der intrazellulären Domäne. Die nachfolgende Rekrutierung von Adaptorproteinen und Signalmolekülen an die phosphorylierten Tyrosinreste bewirkt die Aktivierung von nachgeschalteten Signalkaskaden (Avraham and Yarden, 2011; Mendelsohn and Baselga, 2006; Yarden and Sliwkowski, 2001). Zu diesen Signalkaskaden gehören (1) der RAS-RAF Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) Signalweg, (2) der Phosphatidylinositol-Akt Signalweg sowie (3) der Stress-aktivierte Protein Kinase C und JAK/STAT Signalweg (Avraham and Yarden, 2011; Mendelsohn and Baselga, 2006; Yarden and Sliwkowski, 2001). Der EGF-Rezeptor und die EGFR Signalwege sind schematisch in Abbildung 3 dargestellt. Der EGF-Rezeptor wird auf der Oberfläche von normalen Epithelien exprimiert und liegt außerdem in vielen Tumoren überexprimiert vor. Beim CRC wird EGFR in 60-80 % der Tumore überexprimiert (Mayer *et al.*, 1993; Overman and Hoff, 2007). Eine solche Überexpression wird beim CRC mit einer schlechten Prognose und erhöhter Metastasenbildung assoziiert (Hemming *et al.*, 1992; Mayer *et al.*, 1993).

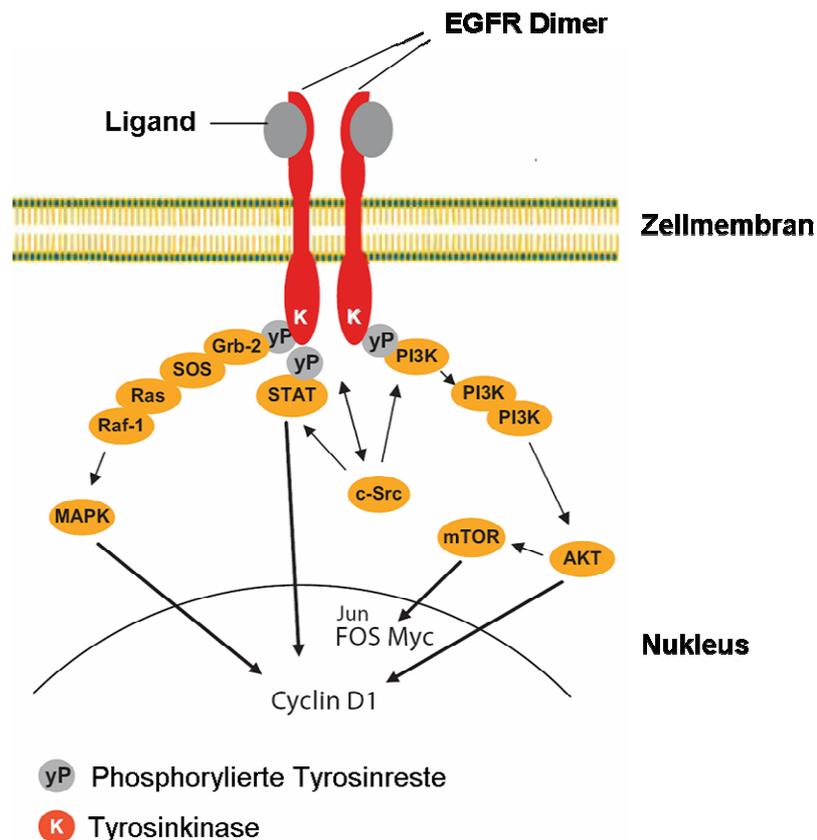


Abbildung 3: Schematische Darstellung des EGF-Rezeptors und den EGFR nachgeschalteten Signalwegen. Die Bindung eines Liganden an den EGF-Rezeptor bewirkt seine Dimerisierung und folglich die Aktivierung der Kinasedomäne, die zu einer Autophosphorylierung der Tyrosinreste der intrazellulären Domäne des EGFR führt. In Folge dessen werden verschiedene nachgeschaltete Signalwege induziert, die im Nucleus eine Reihe von Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen aktivieren. (Abb. verändert nach (Lurje and Lenz, 2009)).

In den frühen 1990er Jahren konnte nachgewiesen werden, dass Tyrphostine, die sich gegen die Adenosin Triphosphat (ATP)-Bindedomäne richten, eine hohe Spezifität für einen bestimmten Rezeptor aufweisen, während sie für einen anderen Rezeptor unspezifisch sind. So konnten bestimmte Tyrphostine entwickelt werden, die sich spezifisch gegen die ATP-Bindedomäne von EGFR/HER1 richten, allerdings nicht an die ATP-Bindestelle von HER2 gebunden werden können, obwohl deren Kinasedomänen zu 80 % identisch sind (Osherov *et al.*, 1993).

In Bezug auf den Wirkmechanismus der Tyrphostine unterscheidet man substratkompetitive, ATP-kompetitive, sowie gemischt ATP/substratkompetitive. Ein Vorteil der Tyrphostine gegenüber Chemotherapeutika sind ihre nicht-toxischen Eigenschaften, selbst bei hohen Konzentrationen (Levitzki, 2002).

Unter anderem ist AG1478 (4-(3-chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline oder Tyrphostin AG1478) ein solch spezifischer EGFR Inhibitor. Seine chemische Strukturformel ist in Abbildung 4 dargestellt.

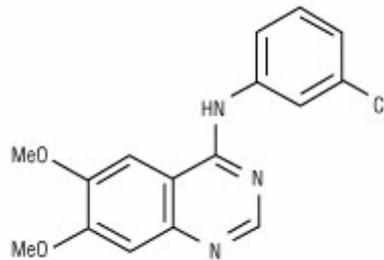


Abbildung 4: Strukturformel von Tyrphostin AG1478. (Quelle: Cell Signalling Data Sheet)

Seine Wirksamkeit beruht auf der kompetitiven Bindung an die ATP-Bindestelle der Tyrosinkinasedomäne des Rezeptors, wodurch die Phosphorylierung von Zielproteinen verhindert wird und damit die EGFR-Signaltransduktion unterbrochen ist. Sein Wirkstoff gehört zu der Gruppe der Quinazoline (Levitzki and Gazit, 1995). AG1478 inhibiert die Phosphorylierung von EGFR, ERK1/2 und Akt sowie die Zellproliferation in einem dosisabhängigen Verhalten bei Mammakarzinom Zellen (Zhang *et al.*, 2008). Außerdem fördert AG1478 den programmierten Zelltod, die Apoptose, und supprimiert die Telomeraseaktivität in Tumorzellen. Auch die Zellinvasion wird durch AG1478 inhibiert, indem die Matrixmetalloproteinase-9 herunterreguliert wird (Zhang *et al.*, 2008). Auch auf kolorektale Adenokarzinom Zelllinien wirkt sich die Verabreichung von AG1478 apoptotisch aus und die DNA-Synthese wird verhindert (Partik *et al.*, 1999). Die Gabe von Tyrphostin AG1478 wird oftmals mit anderen therapeutischen Agenzien kombiniert. Werden entweder Glioblastomazellen einer Gewebekultur (Nagane *et al.*, 1998) oder Tumoren *in vivo* (Nagane *et al.*, 2001), die eine Cisplatinresistenz ausgebildet haben, mit AG1478 behandelt, so werden sie gegenüber Cisplatin wieder re-sensitiv.

1.7 Tumorzelllinien als Modellsysteme für humane Tumoren

Permanente Tumorzelllinien bieten eine nahezu unbeschränkte Quelle für Zellen mit ähnlichen Genotypen und Phänotypen (Masters, 2000) und sind daher im Wesentlichen die einzige Option, um mechanistische Studien an humanen Tumorzellen unter kontrollierten Bedingungen durchzuführen (Kenny *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu primären humanen Geweben sind sie nicht mit Stromazellen kontaminiert (Volchenboum *et*

al., 2009). Außerdem bestehen sichere Hinweise darauf, dass die Zelllinien den Tumor aus dem sie ursprünglich isoliert wurden, repräsentieren (Douglas *et al.*, 2004). Eine Analyse einer kolorektalen Zelllinie, die in zwei verschiedenen Laboratorien kultiviert wurde, wies in einer vergleichenden Mutationsanalyse das selbe Mutationsspektrum auf und Transkriptomanalysen mittels Microarray-Technologie ergaben beinahe identische Expressionsprofile (Yeung *et al.*, 2010), was für eine andauernde Stabilität der Zelllinien spricht. Aus diesen Gründen werden humane Tumorzelllinien weltweit als *in vitro* Modelle verwendet, um die Biologie humaner Tumoren zu untersuchen.

Ein Beispiel für die erfolgreiche und anerkannte Anwendung von humanen Tumorzelllinien ist die Entdeckung, Entwicklung und Testung von Pharmaka (Sharma *et al.*, 2010). Trotzdem bestehen, allerdings basierend auf der wissenschaftlichen Fragestellung, auch offensichtliche Grenzen dieses Modellsystems für humane Tumoren. Eines der bedeutendsten Probleme ist dabei die Tatsache, dass die meisten *in vitro* Zellkulturen als homotypischer Monolayer auf Plastikwaren (2D Kultur) kultiviert werden. Primärtumoren und ihre Metastasen bilden jedoch komplexe heterotypische, dreidimensionale Strukturen, die in ein organspezifisches Mikromilieu eingebettet sind. Zellen, die in einer üblichen 2D Kultur kultiviert werden, verlieren alleine durch die Kultivierung auf dem Plastiksubstrat viele Kennzeichen ihrer ursprünglichen *in vivo* Eigenschaften wie z.B. ihre typische Morphologie, Zell-Zell-Adhäsion, sowie Zell-Matrix-Adhäsion. Darüber hinaus weisen sie häufig ein vom Tumor abweichendes Differenzierungsmuster auf (Nelson and Bissell, 2006). Vielmehr fördert die Kultivierung von Zellen auf Plastiksubstrat die Zellproliferation und inhibiert die Zelldifferenzierung (Benton *et al.*, 2009).

Eine Alternative zur 2D Zellkultur stellen Tierversuche dar, aber auch hierbei sind Grenzen gesetzt, da morphologische Veränderungen sowie der Aktivierungszustand von Signalwegen im Tiermodell nur schwer zu beobachten sind (Matsuda *et al.*, 2011). Außerdem sind Tierversuche sehr zeitaufwendig, kostenintensiv und an strenge gesetzliche Regelungen zum Tierschutz gebunden.

In vitro 3D Kulturen sind möglicherweise eine gute Alternative zur 2D Zellkultur oder zu Tiermodellen, da sie ein physiologischeres Modell als 2D Kulturen darstellen, jedoch nicht den Regularien unterliegen, die für Tierversuche gelten (Debnath *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2009; Yamada and Cukierman, 2007). In den Jahren zwischen 1950 und 1970 fanden Kollagen I Gelsubstrate in der 3D Zellkultur Anwendung, auf denen einige, aber nicht alle Zelltypen erfolgreich kultiviert werden konnten (Kleinman *et al.*, 1981). Bereits 1972 untersuchten Elsdale *et al.* die Unterschiede zwischen Zellen die auf flachem Untergrund kultiviert wurden

gegenüber Zellen die in dreidimensionaler Kultur kultiviert wurden, z.B. extrahierter extrazellulärer Matrix (ECM) (Elsdale and Bard, 1972). Seitdem sind die bemerkenswerten Ähnlichkeiten zu der *in vivo* Morphologie und dem Verhalten der Zellen, die in dreidimensionaler Kultur gehalten werden nicht nur gut dokumentiert, sondern auch durchaus akzeptiert (Pampaloni *et al.*, 2007). Trotz dieser Erkenntnisse finden 3D Zellkulturmodelle heutzutage immer noch eine nur geringfügige Anwendung und sind in wenigen Laboratorien etabliert. Dies könnte durch verschiedene Faktoren, wie höhere Materialkosten, schwierigeres und zeitaufwändigeres Handling und die bislang noch fehlende Möglichkeit zur Automatisierung von 3D Kulturen in Pharmastudien bedingt sein. Jedoch finden bereits einige wenige Modellsysteme in der 3D Zellkultur Anwendung. Unter ihnen findet man so genannte „Filter well insert“ Systeme (Grobstein, 1953; Lu *et al.*, 2001; Steele *et al.*, 1986), „Mikrocarrier“ (Abranches *et al.*, 2007; Malda *et al.*, 2003a; Malda *et al.*, 2003b; Yang *et al.*, 2007), Schwämme wie AlgiMatrix™ (Shapiro and Cohen, 1997) Gele wie Extracel™ (Shu *et al.*, 2006) und sogenannte Schüttelmodelle zur Generierung und Kultivierung von Tumorsphären (Ricci-Vitiani *et al.*, 2007; Svendsen *et al.*, 1998; Vermeulen *et al.*, 2008b). Um den modellhaften Charakter dieser genannten Systeme zu umgehen wurde eine 3D Zellkultur-Matrix entwickelt, die auf der Rekonstruktion der ECM beruht und unter dem Namen Matrigel™-Kultur bekannt ist (Barcellos-Hoff *et al.*, 1989; Bissell *et al.*, 2003; Kleinman *et al.*, 1986; Kleinman *et al.*, 1982; Weaver *et al.*, 1997).

Systematische Studien von Tumorzellen in den 3D Zellkulturmodellen sind bislang nur für wenige Tumorarten durchgeführt worden. Ausschließlich Mammakarzinom Zellen, die in einer 3D Matrigelkultur kultiviert wurden, sind von der Arbeitsgruppe um Mina Bissell systematisch untersucht worden (Kenny *et al.*, 2007). Außerdem liegen einige, wenige Informationen über das Verhalten von Prostata Zellen in der 3D Matrigelkultur vor (Harma *et al.*, 2010).

1.8 Die ECM und Matrix assoziierte Moleküle

Ein gemeinsames Merkmal aller normalen und malignen epithelialen Zellen ist ihre physiologische Nähe und ihre Interaktion mit der ECM (Cukierman *et al.*, 2002). Die ECM ist eine hoch organisierte dreidimensionale Struktur mit wichtiger physiologischer Funktion. Sie besteht aus verschiedenen Makromolekülen, namentlich Kollagen, Laminin, Fibronectin, Proteoglykanen und Hyaluronen (Aumailley *et al.*, 1993; Bowers *et al.*, 2009; Erickson and Couchman, 2000; Ghajar and Bissell, 2008; Yurchenco *et al.*, 1992). In Abhängigkeit von

dem Gewebe und dem Mikromilieu variieren die Isoformen der Makromoleküle. Die ECM bildet auch die Basalmembran (BM). Die BM ist ein Netzwerk von Proteinen die eine Schicht von ungefähr 100-300 nm bilden (Rowe and Weiss, 2009). Sie besteht aus Kollagen Typ IV, Proteoglykanen wie Perlecan (Heparansulfat-Proteoglykan) und multiadhäsiven Matrix Molekülen wie Laminin, Fibronectin und Entactin (Nidogen). Kollagen Typ IV wird ausschließlich in der BM exprimiert und bildet ihr wichtigstes Protein (Lodish H., Berk A., Kaiser C. *et al* 2008; (Worthley *et al.*, 2010). Bei den Proteoglykanen ist Perlecan das vorrangige Protein, während Laminin das primäre multiadhäsive Matrixmolekül der BM darstellt. Laminin ist ein großes, kreuzförmiges Molekül mit Kalzium-abhängigen, globulären Domänen, die an Zelloberflächenrezeptoren wie Integrine binden. Unter den wichtigsten Laminin Rezeptoren befindet sich das Integrin $\alpha3\beta1$, das an Laminin-332, eine Hauptkomponente der BM, bindet (Carter *et al.*, 1990; Tsuruta *et al.*, 2008). Entactin ist ein wichtiges Matrixmolekül, welches zur Quervernetzung von BM Komponenten wie Kollagen Typ IV, Laminin und dem Proteoglykan Perlecan beiträgt. Zu der Funktion der BM gehört nicht nur die Bildung einer mechanischen Barriere und die Organisation der Gewebestruktur, vielmehr reguliert sie auch die Zellform, das Zellwachstum, die Differenzierung, die Polarität, die Migration und die Genexpression von epithelialen Zellen (Ghajar and Bissell, 2008; Hagios *et al.*, 1998; Simons and Mlodzik, 2008).

Die ECM teilt viele Eigenschaften mit der BM, außer das die Matrixmoleküle in der ECM eine dreidimensionale Matrix bilden und keine mattenartige Struktur wie die BM (Lodish H., Berk A., Kaiser C. *et al.* 2008, (Rowe and Weiss, 2009)). Dieser Unterschied beruht darauf, dass Kollagen Typ I und nicht Kollagen Typ IV wie bei der BM das bestimmende strukturelle Glykoprotein der ECM darstellt (Lodish H., Berk A., Kaiser C. *et al.* 2008). Wiederum spielen Proteoglykane und Glykosaminoglykane, wie z.B. Heparinsulfat, eine wichtige Rolle bei den Zell- und Matrix-Interaktionen. Ein wichtiges Polypeptiddimer innerhalb der ECM ist Fibronectin (Hynes and Yamada, 1982), welches ein essentielles adhäsives Molekül ist und die zelluläre ECM-Anheftung erleichtert, sowie die Morphologie und die Motilität der verbundenen Zellen beeinflusst (Hynes and Yamada, 1982).

Die BM und die ECM werden von vielen verschiedenen Zelltypen gebildet. Dazu gehören epitheliale Zellen und Stromazellen wie Fibroblasten und Osteoblasten (Kim *et al.*, 2011). Mesenchymale intestinale subepitheliale Myofibroblasten produzieren den Großteil an Kollagen Typ IV und Entactin der BM, während Laminin zu gleichen Anteilen von epithelialen und mesenchymalen Zellen und Perlecan hauptsächlich vom epithelialen Kompartiment produziert wird (Powell *et al.*, 2005; Simon-Assmann *et al.*, 1995). Kollagen

Typ I wird hauptsächlich von im Stroma vorkommenden Fibroblasten produziert, zu Teilen aber auch von Fibroblasten, die in das aktivierte Stroma rekrutiert wurden (Kalluri and Zeisberg, 2006). Des Weiteren produzieren Fibroblasten außerdem zusammen mit Endothelzellen die Fibronectinbestandteile der ECM.

Die ECM stellt zusammen mit der BM nicht nur eine kräftige Verbindung für die organisierten epithelialen Zellen dar (Bissell *et al.*, 2002; Ghajar and Bissell, 2008), sondern liefert auch wichtige biochemische Informationen für die Zellpolarität und für das Zellwachstum (Ghajar and Bissell, 2008). Die Organisation von epithelialen Zellen in polare Strukturen erfordert sowohl Zell-Zell- als auch Zell-ECM-Kontakte. Dabei steht die basale Seite der epithelialen Zellen mit der BM über Hemidesmosomen in Kontakt, während die apikale Seite der epithelialen Zellen zum Lumen hin zeigt (Green and Jones, 1996; Lelievre, 2010). Hemidesmosomen sind adhäsive Proteinkomplexe, welche eine stabile Verankerung der epithelialen Zellen mit der darunterliegenden Basalmembran vermitteln. Die Organisation von Hemidesmosomen beruht auf einem komplexen Netzwerk von Protein-Protein Interaktionen, bei dem Integrin $\alpha 6 \beta 4$ und Plektin eine wichtige Rolle spielen (de Pereda *et al.*, 2009). Die Verbindung von epithelialen Zellen mit der ECM basiert auf einer Interaktion von Integrin $\alpha 6 \beta 4$ mit Laminin-332, während das cytoplasmatische Protein Plektin mit Keratin Filamenten interagiert und somit einen stabilen Verankerungskomplex bildet (Litjens *et al.*, 2006).

Das Zellwachstum wird durch die ECM beeinflusst, indem sie als Reservoir für verschiedene Wachstumsfaktoren dient. Diese können gebunden oder intrinsisch vorliegen. (Hynes, 2009). Des Weiteren wird das Zellwachstum über die Interaktion der ECM mit den Integrinen beeinflusst, welche wachstumsfördernde Signalwege aktivieren. Zum einen ermöglichen Integrine die Wachstumsfaktor-vermittelte Aktivierung von ERK, welches wiederum für das Zellwachstum benötigt wird, weil es TCF (ternary complex factor) phosphoryliert. TCF fördert dann seinerseits die Transkription des unmittelbar frühen Gens *c-FOS* (*EBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*) (Treisman, 1996). Weiterhin aktivieren Integrine die MAPK c-JUN NH₂-terminale Kinase (JNK), welche die Progression durch die G1-Phase des Zellzyklusses reguliert. Aktivierte JNK wandert in den Zellkern um dort den Transkriptionsfaktor c-JUN zu phosphorylieren. Daraufhin verbindet sich dieser mit c-FOS um den AP-1 Transkriptionsfaktor Komplex zu bilden. Dieser wiederum reguliert Gene, die wichtig für die Zellproliferation sind (Ip and Davis, 1998; Treisman, 1996).

Alle epithelialen Zellen haben, oder hatten während ihrer Entwicklung, eine direkte Verbindung zu der ECM (Hynes, 2009). Diese Verbindung zu der Matrix hilft die Progression

durch den Zellzyklus und die zelluläre Differenzierung zu regulieren (Giancotti and Ruoslahti, 1999; Xu *et al.*, 2009). Die ECM übt nicht nur drastische Effekte auf den Phänotyp von Zellen, sondern auch auf das Ansprechen von gezielten Therapien aus, wie Kenny *et al.* am Mammakarzinom nachweisen konnten (Kenny *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007).

Wie bereits erwähnt, interagieren viele der ECM Proteine mit Integrinen, die nahezu von jeder Zelle exprimiert werden. Im Jahre 1986 wurde erstmals von einem Fibronectin-bindenden Membranglykoprotein, einem Integrin, welches das Zytoskelett mit der ECM verbindet, berichtet (Tamkun *et al.*, 1986). Dieses Integrin ist ein Mitglied der Integrin Transmembran-Rezeptor Familie und setzt sich wie alle Integrine aus einer α -Untereinheit und einer β -Untereinheit zusammen (Hynes, 2002). Mittlerweile sind insgesamt 18 α -Untereinheiten und acht β -Untereinheiten bekannt, die durch diverse nicht-kovalente Assemblierungen insgesamt 24 verschiedene Integrine bilden (Kim *et al.*, 2011). Jede Untereinheit besteht aus einer großen Ektodomäne, die aus mehreren hundert Aminosäuren zusammengesetzt ist, einer einzelnen Transmembrandomäne und einem kleineren zytoplasmatischen Teil, der aus 20-70 Aminosäuren besteht (Qin *et al.*, 2004). Die extrazelluläre Domäne der Integrine bindet an die ECM Proteine, wie z.B. Laminin, während die zytoplasmatische Domäne mit verschiedenen Signalproteinen und dem Aktin-Zytoskelett verbunden ist. Somit sind die Außenseite und die Innenseite einer Zelle miteinander verbunden, was eine bidirektionale Transmission von mechanischen und biochemischen Signalen durch die Plasmamembran ermöglicht und zu einer kooperativen Regulation von Zellfunktionen wie Adhäsion, Wachstum und Differenzierung führt (Qin *et al.*, 2004). Unterschieden wird hierbei noch die „Inside-Out“- und die „Outside-In“-Signalgebung (siehe Abbildung 5). Bei der „Inside-Out“-Signalgebung bindet ein intrazellulärer Aktivator wie Talin oder Kindlin an die β -Integrin Untereinheit und verursacht dadurch eine Konformationsänderung, die zu einer erhöhten Affinität der extrazellulären Liganden führt. Die Ligandenbindung und die Heterodimerbildung des Rezeptors initiieren die „Outside-In“-Signalgebung. Die Kombination aus diesen beiden Prozessen führt zu intrazellulären Signalen, die die Zellpolarität, die Zytoskelett-Struktur, die Genexpression sowie das Zellüberleben und die Proliferation kontrollieren (Shattil *et al.*, 2010).

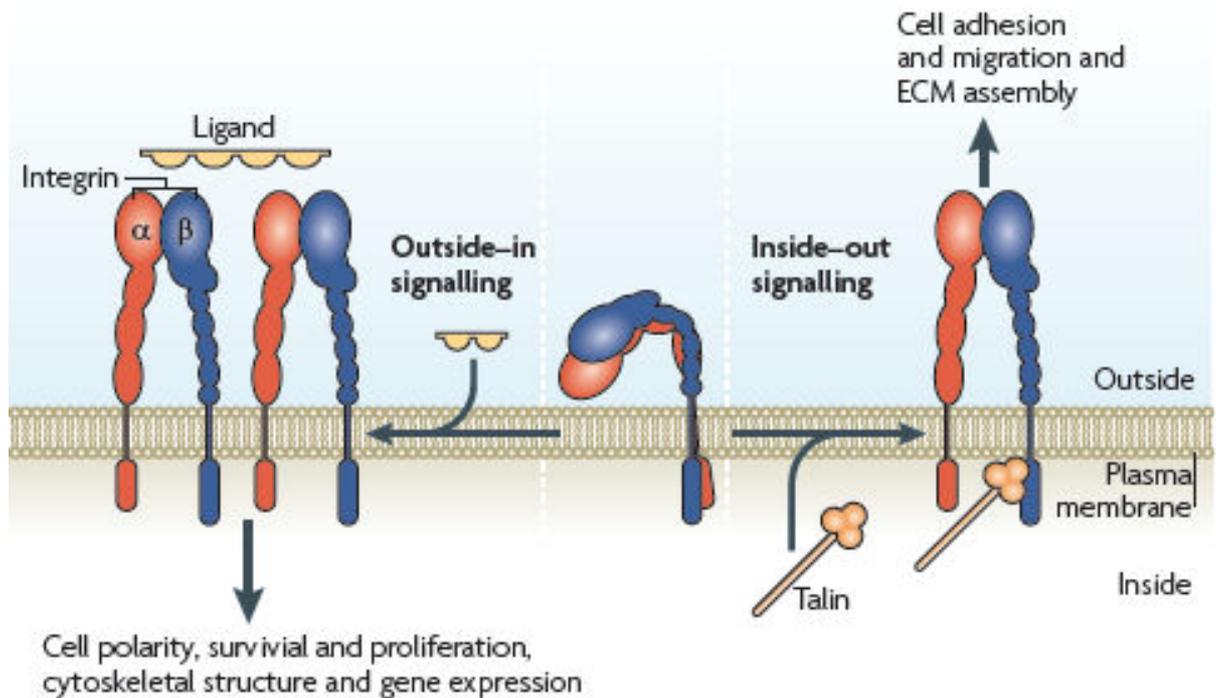


Abbildung 5: Bidirectionales Integrin Signalling. Integrine sind Heterodimer Transmembran-Rezeptoren die mit einer Vielzahl von ECM Komponenten interagieren und an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt sind. (Quelle: (Shattil *et al.*, 2010)).

Bei der Karzinogenese sind das Tumorwachstum und die Metastasierung davon abhängig, dass eine Tumorzelle ihre Anheftung an die ECM und zu benachbarten Zellen regulieren kann. Angesichts der Tatsache, dass Integrine eine wichtige Rolle bei der Zellanheftung, dem Überleben, der Migration, der Invasion und der Angiogenese spielen (Avraamides *et al.*, 2008; Jin and Varner, 2004; Moschos *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2008), die alle wichtige Prozesse der Karzinogenese darstellen, werden Integrine als mögliche Anti-Tumor Zielstrukturen angesehen. Verschiedene Integrine spielen eine entscheidende Rolle bei der Karzinogenese, wobei $\alpha V\beta 3$ Integrin die meiste Aufmerksamkeit auf sich gezogen hat.

Ein spezifischer monoklonaler Antikörper gegen $\alpha V\beta 3$ Integrin, der in der Therapie von Melanomen (Moschos *et al.*, 2010) und verschiedenen soliden Tumoren (Delbaldo *et al.*, 2008) eingesetzt werden soll, befindet sich momentan in der frühen klinischen Entwicklung.

Das Wachstum von soliden Tumoren hängt maßgeblich von der Angiogenese ab und involviert die Aktivierung von Endothelzellen, sequenzielle Degradation der Basalmembran, Migration, ECM Invasion, Proliferation und die Ausbildung von Kappilargefäßen (Delbaldo *et al.*, 2008). $\alpha V\beta 3$ Integrin ist ein wichtiges Molekül in der Tumor-induzierten Angiogenese, wird von proliferierenden Endothelzellen überexprimiert (Brooks *et al.*, 1994) und bindet

ECM Bestandteile wie Fibronectin und denaturiertes Kollagen (Delbaldo *et al.*, 2008). Die Manipulation der Integrin-Untereinheiten Dimerisierung, beispielsweise vermittelt durch eine monoklonale Antikörper Therapie, kann sowohl die Neoangiogenese als auch die malignen Eigenschaften der Tumorzellen verändern (Delbaldo *et al.*, 2008). So konnte gezeigt werden, dass die Kombination des Chemotherapeutikums Paclitaxel mit dem gegen $\alpha V\beta 3$ Integrin gerichteten monoklonalen Antikörper Etaracizumab im ovarialen Karzinom die Inhibition des Tumorwachstums bewirkt (Landen *et al.*, 2008).

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Tumorprogression und Metastasierung ist die Fähigkeit der Tumorzellen die BM zu durchdringen und zu invadieren. Die Tumorzellinvasion umfasst Schritte im Abbau der BM und die Migration von Zellen in das Bindegewebe. Daran sind Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und Zink-abhängige Endopeptidasen maßgeblich beteiligt (Gialeli *et al.*, 2010). Sie spielen eine zentrale Rolle für das Tumorwachstum und den mehrschrittigen Prozess der Invasion und der Metastasierung, einschließlich dem proteolytischem Abbau der ECM und den Veränderungen der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen. MMPs modulieren Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen indem sie diverse Zelladhäsionsmoleküle degradieren (Gialeli *et al.*, 2010). Die proteolytische Aktivität der MMPs ermöglicht den Tumorzellen Barrieren während ihrer lokalen Expansion zu überwinden, sowie die Intravasation in nahe liegende Blutgefäße, Extravasation und Invasion zu entferntliegenden Orten (Gialeli *et al.*, 2010)

Interessanterweise wurde bei vielen Karzinomen beobachtet, dass die ECM ihre Zusammensetzung ändern kann. So sind ECM Proteine in den meisten Karzinomen überexprimiert (Bourboulia and Stetler-Stevenson, 2010). Hohe Level an quervernetztem Kollagen Typ I wurden in Tumoren der Mamma nachgewiesen, was mit einer schlechten Prognose für metastasierende Mammakarzinome einhergeht (Levental *et al.*, 2009). Hingegen wird der Verlust von Kollagen Typ IV, einem Hauptbestandteil der BM, mit dem metastatischem Potential korreliert (Liotta *et al.*, 1980). Die Lamininexpression korreliert mit der Tumorinvasivität. Laminin-322 interagiert mit Kollagen Typ VII um die Zellinvasion von squamösen Zellkarzinomen zu fördern (Marinkovich, 2007; Waterman *et al.*, 2007). Auch Proteoglykane werden in epithelialen Tumoren überexprimiert. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Zellmigration, Invasion und dem Wachstum der Zellen. So ist das Proteoglykan Syndecan-1 mit der urothelialen Karzinomprogression assoziiert und wird vermehrt exprimiert (Shimada *et al.*, 2010)

Eine veränderte Expression des ECM Bestandteils Proteoglykan konnte auch beim CRC nachgewiesen werden (Hashimoto *et al.*, 2008; Theocharis, 2002). Die Expression von

Syndecan-1, einem transmembran Heparansulfat Proteoglykan, das eine wichtige Rolle in der Zell-Zell- und Zell-ECM-Adhäsion spielt und als Wachstumsfaktor Co-Rezeptor fungiert, ist in Kolonkarzinomen herunterreguliert, was mit einem transformierten Phänotyp, der Epithelialen-Mesenchymalen Transition, dem TNM-Stadium und der Metastasierung in lokale Lymphknoten korreliert wird (Hashimoto *et al.*, 2008). Auch eine veränderte Expression von MMPs wurde beim CRC beobachtet. Humane Tumore des Kolons exprimieren die MMPs 1-3, 7-12 und 14, wobei sowohl die Anzahl der verschiedenen MMPs als auch ihre Expression mit der Tumorprogression zunimmt (Wagenaar-Miller *et al.*, 2004).

1.9 Kultivierung von Tumorzellen in einem IrECM Modell

Ein geeignetes Modell *in vitro* die ECM zu modellieren und ihren Einfluss auf und die Interaktion mit den Zellen zu analysieren, bietet eine solubilisierte BM Präparation, die aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maus Sarkom extrahiert wurde. Dieses Sarkom ist reich an ECM Proteinen, bestehend aus Laminin, Typ IV Kollagen, Heparinsulfat Proteoglykanen und Entactin/Nidogen und wurde nach seinen Entdeckern Engelbreth-Holm von Dänemark und Richard Swarm, benannt (Kleinman and Martin, 2005). Vergleichende Genexpressionsanalysen des EHS Sarkoms mit embryonalen Karzinomzellen legten nahe, dass die Tumorzellen von parientalem Entoderm abstammen (Futaki *et al.*, 2003). Embryonale Karzinomzellen repräsentieren die Stammzellen von Teratomkarzinomen und können sich *in vivo* (nach Transplantation in extrauterine Orte als Teratom oder Teratokarzinom) und *in vitro* (nach Differenzierungsinduktion) in Zellen aller drei Keimblätter entwickeln (Ganten *et al.* 2007).

EHS Tumore wachsen schnell in Mäusen und zeigten sich als geeignete Quelle um BM Komponenten zu isolieren (Kleinman and Martin, 2005). Aufgrund seiner molekularen Komposition, im Speziellen dem hohen Laminin Gehalt, wird es als geeignetes Modell für die BM angesehen. Im Jahre 1983 begann Hynda Kleinman mit Extrakten der EHS Tumore zu arbeiten. In diesen Arbeiten wurde das EHS Tumorgewebe mit einer 20 % Natriumchloridlösung gewaschen, um die Zellen von Serumproteinen zu trennen. Der verbleibende Rest, hauptsächlich die Matrix, wurde mit 2 M Urea extrahiert, um die Protein-Protein Interaktionen aufzulösen. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde der viskose Überstand dialysiert. Die daraus resultierende Lösung formte bei Erwärmung auf 37°C ein starkes, klares Gel (Kleinman *et al.*, 1986). Um steriles Material zu erhalten wurden 5 ml Chloroform pro 1 l Extrakt in einem Dialysebeutel gemischt und durch sofortige Dialyse

das Chloroform eliminiert. Dieses sterile BM Extrakt wurde von John Hassell als Matrigel bezeichnet (Kleinman and Martin, 2005) und ist heutzutage in verschiedensten Variationen kommerziell erwerblich. Werden epitheliale Zellen in dieser lamininreichen extrazellulären Matrix (IrECM) kultiviert, können sie dreidimensionale Strukturen ausbilden (Kleinman *et al.*, 1986; Kleinman *et al.*, 1982).

Zukunftsweisende Arbeiten von der Arbeitsgruppe um Mina J. Bissell und anderen, die am Mammakarzinom durchgeführt wurden, demonstrierten dramatische morphologische und biochemische Unterschiede zwischen normalen und malignen Brustdrüsenzellen, wenn sie als 2D Kultur auf einem Plastiksubstrat oder als 3D Kultur in einer IrECM kultiviert wurden (Bissell *et al.*, 2005; Bissell *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 1992). Aus dem klinischen Blickwinkel ist außerdem von Bedeutung, dass die IrECM 3D Zellkultur, als ein realistischeres Modell, zu unterschiedlichen Antworten auf molekulare Therapien führen kann, wie in den vergangenen Jahren am Mammakarzinom demonstriert werden konnte (Kenny, 2007; Li *et al.*, 2009; Weaver *et al.*, 2002). So konnten Weaver *et al.* an 3D Matrigel kultivierten malignen Mamma Epithelzellen nachweisen, dass diese bei Inhibition von Integrin $\beta 1$ ihren malignen Phänotyp zu einem nicht-malignen Phänotyp revertierten, indem die Zellen in der 3D Kultur kleine, runde, wachstumsarretierte, multizelluläre Kolonien ausbildeten (Weaver *et al.*, 1997). Eine ähnliche Beobachtung wurde auch bei einer Inhibition von Kinasen des EGFR Signalwegs getätigt, wie der Phosphatidylinositol 3-Kinase (Liu *et al.*, 2004) und MAPK (Wang *et al.*, 2002). Bei einer Inhibierung von EGFR oder Integrin $\beta 1$ ist die Expression und die Aktivität des jeweilig anderen Proteins in malignen T4-2 Mamma Epithelzellen, welche in Matrigel kultiviert werden, herunterreguliert. Dies tritt allerdings nicht bei Zellen auf, die auf einem Plastiksubstrat kultiviert wurden (Wang *et al.*, 1998). Des Weiteren konnten Weaver *et al.* demonstrieren, dass sowohl nicht-maligne als auch maligne Mamma Epithelzellen eine Apoptoseresistenz entwickeln, wenn diese Zellen als dreidimensionale, polarisierte Strukturen kultiviert werden. Dahingegen weisen nicht-polarisierte, zweidimensional kultivierte Mamma Epithelzellen keine Apoptoseresistenz auf (Weaver *et al.*, 2002). Die Apoptoseresistenz stellt für Tumorzellen einen fundamentalen Prozess dar, um sich einer Behandlung mittels Chemotherapie zu entziehen. Außerdem ist bekannt, dass verschiedene Mammakarzinom Zellen, welche eine HER2 Amplifikation aufweisen, in Abhängigkeit ihres Kultursystems - 2D versus 3D Modell - eine deutlich unterschiedliche Sensitivität gegenüber den Anti-HER2 Agenzien Lapatinib, Pertuzumab und Trastuzumab aufweisen (Weigelt *et al.*, 2009). Somit ist das Verständnis von Tumorzell-ECM-Interaktionen und dem Mechanismus über den die ECM und die ECM

Rezeptoren die Tumorprogression regulieren ein kritischer Schritt in der Entwicklung von Therapien, die die Tumorprogression anvisieren. Dies führt wiederum zu der Konsequenz, dass Zellkulturmodelle, wie das oben beschriebene IrECM Matrigel Modell, eine breitere Anwendung in der Zellkultur finden müssen, um die Einflüsse der ECM auf die Zellen und deren Signalwege zu analysieren.

1.10 Ziel der Arbeit

Die Möglichkeit humane epitheliale Zellen *ex vivo* zu untersuchen war ein wichtiger Meilenstein zum näheren Verständnis von physiologischen und pathologischen Prozessen dieser Zellen. So bietet die Kultivierung von permanenten humanen Tumorzelllinien die Möglichkeit, die Biologie der Tumore systematisch zu analysieren. Ein fundamentales Problem dabei ist jedoch, dass Zellen nach der Dissoziation und der Kultivierung auf Plastiksubstrat, was die am häufigsten angewandte Methode zur Kultivierung von Tumorzellen darstellt, viele ihrer ursprünglichen *in vivo* Eigenschaften verlieren. Dies beruht darauf, dass die Tumorzellen getrennt von ihrer natürlichen Umgebung, der ECM, kultiviert und analysiert werden. Als ECM bezeichnet man den Anteil eines Gewebes, der zwischen den Zellen im Interzellularraum liegt und das „Mikroenvironment“ der Tumorzellen bildet, wobei sich epitheliale Zellen in direkter physiologischer Nähe der ECM befinden.

Zunächst wurde die ECM ausschließlich als eine selektive Barriere und als Gerüst, an das die epithelialen Zellen adhäreren, angesehen, doch konnte mittlerweile nachgewiesen werden, dass die ECM nicht nur eine stützende Funktion besitzt, sondern vielmehr an der Regulation von biologischen Aktivitäten wie Zellwachstum, Differenzierung und Migration beteiligt ist. Außerdem beeinflusst sie die Gewebeentwicklung, die Homöostase und die Reparatur von Geweben. Auch bei pathologischen Prozessen wie der Tumorprogression sowie bei therapeutischen Ansätzen spielt die ECM eine entscheidene Rolle. Aus diesen Erkenntnissen heraus, wurden Kultursysteme entwickelt, die eine realistischere Modellierung von Tumoren *in vitro* ermöglichen, wobei das lrECM Modell von wichtiger Bedeutung ist. Systematische Untersuchungen zum Einfluss der ECM auf Tumorzellen, mittels lrECM Kultur, wurden bislang hauptsächlich an Mammakarzinom Zelllinien durchgeführt, fehlen aber gänzlich für andere Tumorentitäten, wie z.B dem CRC. Letzteres stellt die dritthäufigste Tumorart des Menschen dar und führt trotz verbesserter Therapiekonzepte zu der zweithäufigsten krebsbedingten Todesursache. Von daher ist es erstaunlich, dass für diese Tumorentität ein solches physiologischeres *in vitro* Modell, das eine systematische Analyse dieser Tumorzellen ermöglicht, gänzlich fehlt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, ein lrECM „on-top“ Modell, in dem die CRC Zellen in die lrECM eingebettet werden, zur Kultivierung von diesen Zellen zu etablieren und die zellbiologischen und molekularen Auswirkungen der lrECM auf die CRC Zellen systematisch zu untersuchen. Die Etablierung und Anwendung eines solchen der *in vivo* Situation entsprechenden Modells, ermöglicht eine Analyse der CRC Zellen unter physiologischeren Bedingungen, was möglicherweise zu neuen und bedeutenden

Erkenntnissen zur Progression und Therapie des CRCs führen könnte. Von besonderem Interesse hierbei ist die Fragestellung, ob die IrECM „on-top“ Kultivierung Auswirkungen auf die Morphologie sowie zellbiologische und Tumor-assoziierte Eigenschaften hat. Weiterhin soll analysiert werden, ob die verschiedenen Kultivierungssysteme mit messbaren Expressionsänderungen auf Transkriptions- und Proteinebene einhergehen. Außerdem stellte sich die Frage, ob mögliche Expressionsänderungen auf dem Transkriptions- und Proteinlevel auch zu einem unterschiedlichen Ansprechverhalten auf eine Anti-EGFR Therapie, die eine wichtige Behandlungsmethode des CRCs darstellt, führt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Einwegartikel und Kunststoffgefäße

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Kunststoff- und Einwegartikel wurden von den Firmen Falcon/Becton-Dickinson (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Starlab GmbH (Ahrensberg), Corning (Wiesbaden), Greiner Bio-one (Frickenhausen), BD Bioscience (Heidelberg), Whatman (Dassel), Millipore (Schwalbach) und VWR (Darmstadt) bezogen.

2.1.2 Chemikalien, Lösungen und Zellkulturlösungen

Aceton	Merck
Acrylamid Mix, 30 %	Biorad
APS \geq 98 %	Sigma
Aqua dest. (Delta Select)	Braun
Blotting Grade Non-Fat Dry Milk	Biorad
Bromphenolblau	Sigma
1-Butanol	Merck
BSA (Bovine Serum Albumin pH 7.0)	PAA Laboratories GmbH
Chloroform	Merck
Coomassie Blue R250 stain	Biorad
DBPS 1x	Gibco
Dispase	BD Bioscience
4',6-Diamidino-2-phenylindole Dihydrochlorid (DAPI)	Sigma
DMSO	Sigma
EDTA	Sigma
Entellan	Merck
Essigsäure PA 100 % /Eisessig	Merck
Ethanol (99 %)	Merck
FBS	Gibco
Glycerin	Merck
Glycine	Merck
Kristallviolett	Sigma

Matrigel, growth factor reduced	BD Bioscience
Methanol PA	Merck
Mayershämalaunlösung	Merck
2-Mercaptoethanol	Sigma
MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) > = 97.5 % TLC)	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Nonident P40	Fluka
N,N,N',N'-Tetra-Methyl-Ethylenediamid (TEMED)	Sigma
Ponceau S Pulver	Sigma
Precision Strep Tactin-HRP Conjugate	Biorad
Precision Plus Protein WesternC Standard	Biorad
2-Propanol	Merck
Protease inhibitor cocktail tablets, Complete	Roche
RPMI 1640 + GlutaMAX TM -I	Gibco
Salzsäure	Merck
Saponin	Sigma
SDS (Sodium dodecyl sulfate, minimum 98.5 % GC)	Sigma
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminometahn)	Merck
TritonX-100	Sigma
Trizol	Gibco
Trypanblau Färbelösung 0.4 %	Gibco
Trypsin 0.05 %-EDTA	Gibco
Tween 20	Sigma
Vecta Shield Mounting Medium für Fluoreszenz	Vector Laboratories
Wasser, nukleasefrei	Gibco

2.1.3 Medikamente

Für die Inhibierung des EGF-Rezeptors wurde der spezifische Inhibitor Tyrphostin AG1478 (Sigma) verwendet. Das Lyophilisat wurde in einem Gemisch aus gleichen Anteilen an Methanol/DMSO gelöst, und in den Konzentrationen 0.1 μ M, 1 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M sowie 20 μ M eingesetzt. Als Lösungsmittelkontrolle („Vehicle“) diente eine Lösung aus ebenfalls gleichen Anteilen an Methanol und DMSO in dem entsprechend eingesetzten Volumen des EGFR Inhibitors.

2.1.4 Antikörper für die Western Blot Analyse

2.1.4.1 Primärantikörper

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Primärantikörper für die Western Blot Analyse. Der Antikörper HO-3 wurde freundlicherweise als Geschenk von der Firma Trion Research GmbH zur Verfügung gestellt.

Antikörper	Klon	Spezies/Isotyp	Bezugsquelle	Verdünnung
Akt1	(C73H10)	Rabbit IgG	Cell Signalling	1:1000
Beta Aktin	AC-15	Mouse IgG1	Sigma	1:10.000
Beta-catenin	Vom Hersteller nicht angegeben	Rabbit	Cell Signalling	1:1000
E-Cadherin	(24E10)	Rabbit IgG	Cell Signalling	1:1000
EGR Rezeptor	(C74B9)	Rabbit IgG	Cell Signalling	1:1000
HO-3	HO-3-19	Mouse IgG 2a	Trion Research GmbH	1:5000
Integrin beta 1	Vom Hersteller nicht angegeben	Rabbit	Cell Signalling	1:1000
p44/42 MAPK (Erk1/2)	(137F5)	Rabbit IgG	Cell Signalling	1:1000
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	(20G11)	Rabbit IgG	Cell Signalling	1:1000
Phospho-Akt (Ser473)	(193H12)	Rabbit IgG	Cell Signalling	1:1000
Phospho-EGF-Rezeptor (Tyr1173)	(53A5)	Rabbit IgG	Cell Signalling	1:1000

2.1.4.2 Sekundärantikörper

Tabelle 3: Auflistung der für die Western Blot Analysen verwendeten Sekundärantikörper. Die im Folgenden aufgeführten Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase, HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper wurden angewendet.

Antikörper	Bezugsquelle	Verdünnung
Anti-rabbit IgG, HRP-gekoppelter Antikörper	Cell Signalling	1:2500
Anti-mouse IgG, (Fc-spezifischer)-Peroxidase Antikörper	Sigma	1:2500

2.1.5 Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung

2.1.5.1 Primärantikörper

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Primärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung.

Antikörper	Klon	Spezies/Isotyp	Bezugsquelle	Verdünnung
Integrin α 6	Go H3	Rat IgG2a	Abcam	1:200
Integrin β 1	4B7R	Mouse IgG1	Abcam	1:500
Monoclonal Mouse Anti-Human Epithelial Antigen	Ber-EP4	Mouse IgG1, kappa	Dako	2 μ g/ml
EGFR	C74B9	Rabbit IgG	Cell Signalling	1:50

2.1.5.2 Sekundärantikörper

Folgende Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper wurden für die durchgeführten Immunfluoreszenz Analysen verwendet:

Tabelle 5: Auflistung der Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung.

Antikörper	Bezugsquelle	Verdünnung
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse	Molecular Probes	10 μ g/ml
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit	Molecular Probes	10 μ g/ml
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rat	Molecular Probes	10 μ g/ml

2.1.6 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer) sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Die jeweilige Sequenz ist in der 5'→3' Richtung angegeben. Sämtliche Primer wurden mit Hilfe des „Universal Probe Library Assay Design Centers“, Probe Finder Version 2.45 (Roche) entwickelt und über Eurofins MWG Operon bezogen:

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Universal Probe Roche	Accession Number
GAPDH forward	AGCCACATCGCTCAGAC	60	NM_002046.3
GAPDH reverse	GCCCAATACGACCAAATC	60	NM_002046.3
EPCAM forward	CTCCACGTGCTGGTGTG	3	NM_002354.1
EPCAM reverse	TGTTTTAGTTCAATGATGATCCAGTA	3	NM_002354.1
EGFR forward	ACACAGAATCTATACCCACCAGAGT	50	NM_005228.3
EGFR reverse	TGTTTTAGTTCAATGATGATCCAGTA	50	NM_005228.3
CDH1 forward	CCCGGGACAACGTTTATTAC	35	NM_004360.3
CDH1 reverse	GCTGGCTCAAGTCAAAGTCC	35	NM_004360.3
CTNNB1 forward	GCTTTCAGTTGAGCTGACCA	21	NM_001904.3
CTNNB1 reverse	AAGTCCAAGATCAGCAGTCTCA	21	NM_001904.3
ITGB1 forward	CGATGCCATCATGCAAGT	65	NM_002211.3
ITGB11 reverse	ACACCAGCAGCCGTGTAAC	65	NM_002211.3
MKI67 forward	TTACAAGACTCGGTCCCTGAA	50	NM_002417.4
MKI67 reverse	TTGCTGTTCTGCCTCAGTCTT	50	NM_002417.4

2.1.7 Molekularbiologische Kits

Immun-Star WesternC Kit	Biorad
RNeasy Mini Kit	Qiagen
RNase-Free DNase Set	Qiagen
Agilent RNA 6000 Nano Kits	Agilent

2.1.8 Zellbiologische Kits

Control Inserts 24-well plate 8.0 Micron	BD Bioscience
Matrigel™ Invasion Chamber	BD Bioscience
24-well plate 8.0 Micron	

2.1.9 Geräte

Analysenwaage	Kern&Sohn GmbH
Autoklav D-65	Systec
Dispenser Pipetten	Eppendorf
ELISA-Reader Tecan Sunrise	Tecan
Feinwaage Voyager Pro	Ohaus
Gefrierschränke	Thermo Electron Corporation
Heizblock	Eppendorf
Inkubationsroller RM5	CAT Zipperer GmbH
Inkubatoren	HERA Cell
Kamerasystem	Leica
Konfokalmikroskop, LSM 510-Meta	Zeiss
Kreisschüttler	IKA Labortechnik
Kühlschränke	Thermo Electron Corporation
Magnetrührer	IKA Labortechnik
Mikroskop Wilovert A	Hund
Mikroskop DFC 300 FX	Leica
Netzgeräte	Biorad
Neubauer Zählkammer	Brand
PCR-Gerät Chromo 4	Biorad
pH-Meter	HANNA instruments

Pipetten	Eppendorf
Pipettierhilfen	Eppendorf
Spektralphotometer	Eppendorf
Stickstofftank	Cryotherm
Sterilbank	Termo Electron Corporation
Versa Doc	Biorad
Vortex Mixer	NeoLab
Wasserbad	NeoLab
Western Blot Anlage	Biorad
Zentrifugen: Fresco 17	Thermo Heraeus
Hettich Universal 30RF	Hettich

2.1.10 Humane kolorektale Adenokarzinomzelllinien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten kolorektalen Adenokarzinomzelllinien sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Klinische und pathologische Beschreibung der verwendeten Zelllinien. PT= Primärtumor, mLK= metastasierender Lymphknoten, MAZ= Metastase Aszites Flüssigkeit, DSMZ= Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, ATCC= American Type Culture Collection, ECACC= European Collection of Cell Cultures.

Generelle Beschreibung	CACO-2	DLD-1	HT-29	SW-480	LOVO	COLO-205	COLO-206F
Herkunft	PT	PT	PT	PT	mLK	MAZ	MAZ
Geschlecht des Spenders	männlich	männlich	weiblich	männlich	männlich	männlich	männlich
Alter bei Diagnose	72	Erwachsener	44	50	56	70	70
Ethnizität	Kaukasier	N/A	Kaukasierin	Kaukasier	Kaukasier	Kaukasier	Kaukasier
Bezugsquelle	DSMZ	DSMZ	ATCC	DSMZ	DSMZ	ECACC	DSMZ

2.1.11 Software und Server

In der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Softwareprogramme und Server verwendet:

Tabelle 8: Auflistung der URLs verwendeter Datenbanken.

Leica Application Suite, V 3.3.0
Tecan Magellan Software, V 6.55
Biorad Quantity One-4.5.0
Zeiss LSM Image Browser Rel. 4.2.
Agilent Technologies GeneSpring GX Software Version 10.5

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Server.

PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Universal Probe Library	http://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/ezhome.html

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Short Tandem Repeat (STR) Analyse

Für die STR Fingerprint Analyse wurde die DNA der Zelllinien SW-480, HT-29, DLD-1, LOVO, CACO-2, COLO 205 und COLO-206F mit Hilfe des „Blood and Tissue Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Im Anschluss wurde 1ng genomische DNA mit den genRES[®] MPX-2 und genRES[®] MPX-3 multiplex PCR Systemen (Serac GmbH) amplifiziert, um neun und zwölf verschiedene STR Marker Sequenzen zu generieren.

Die PCR Produkte wurden mit dem ABI 310 Kapillar Sequenzierer analysiert und mit der Software „Genotyper V3.1“ (Applied Biosystems) allotypisiert. Die STR Analysen wurden von PD Dr. med Wolfgang Huckenbeck, Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf, durchgeführt und im Rahmen einer Kooperation für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

Tabelle 10: STR Analyse der verwendeten kolorektalen Adenokarzinomzelllinien. Angegeben sind die Namen der analysierten Zelllinien und die Namen der Mikrosatelliten. Die Zahlen geben die Wiederholungen des Markers auf dem einen bzw. auf dem anderen Allel an. Ist nur eine Zahl angegeben, so kann dies bedeuten, dass beide Allele die gleiche Anzahl von Wiederholungen aufweisen oder nur ein Allel vorhanden ist.

STR Marker	CACO-2	COLO 205	COLO-206F	DLD-1	HT-29	LOVO	SW-480
AMY	X	X	X	XY	XX	XY	X
VWA	16-18	15	15	18-19	17-19	17-18	16
SE33	21	18	18	18-27.2	21	19.2-25.2	19.2-30.2
TH01	6	8-9	8-9	7-9.3	6-9	9.3	8
D21S11	30	30.2-33.2	30.2-33.2	29-32.2	29-30	29-31.2	30-30.2
D8S1179	12	9-14	9-14	15	10-16	10	13
D3S1358	14	16	16	17	15-17	14-17	15
FGA	19	21-23	23	22	20-22	18-20	24
D18S51	12	18	18	11-17	13	13-18	13
D19S433	15	13-14	13-14	14-16	14	14-15	13
TPOX	9-11	11	11	8-11	8-9	8	11
D16S539	12-13	12-13	12-13	12-13	11-12	9-12	13
D5S818	12	10-13	10-13	13	11-12	11-13	13
D2S1338	30	17-18	17-18	17-25	19-23	17-18	17-24
Bezugsquelle	DSMZ	DSMZ	ATCC	DSMZ	DSMZ	ECACC	DSMZ

2.2.1.2 *KRAS* und *BRAF* Mutationsanalyse

Die Standard-Cycle-Sequenzierung wurde verwendet um den *KRAS* und *BRAF* Mutationsstatus der kolorektalen Adenokarzinomzelllinien SW-480, HT-29, DLD-1, LOVO, CACO-2, COLO 205 und COLO-206F zu (re)-evaluieren. Die Exone 2, 3 und 4 von *KRAS* wurden mit Hilfe der folgenden Oligonukleotid-Primer analysiert: 5'-AGGCCTGCTGAAAATGACTGAA-3' and 5'- AAAGAATGGTCCTGCACCAG-3' für Exon 2, 5'-GGATTCCTACAGGAAGCAAGT-3' und 5'-GGCAAATACACAAAGAAAGC-3' für Exon 3 and 5'-AGACACAAAACAGGCTCAGGA- 3' und 5'- AAGAAGCAATGCCCTCTCAA- 3' für Exon 4. Für *BRAF* wurde die Amplifikation des Exons 15 mit dem „Forward“-Primer 5'-TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG-3' und dem „Reverse“-Primer 5'-AGCCTCAATTCTTACCATCCA-3' durchgeführt. „Reverse“-Primer wurden für die DNA Sequenzanalyse der Exone 2 und 4 von *KRAS* verwendet und „Forward“-Primer für das *KRAS* Exon 3 und *BRAF* Exon 15. Die in dieser Arbeit vorgelegte *KRAS* und *BRAF* Mutationsanalyse wurde von der Arbeitsgruppe um PD Dr. rer. nat. Karl-Ludwig Schäfer, Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Düsseldorf, durchgeführt, ausgewertet und freundlicherweise für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

Tabelle 11: Ergebnisse der *KRAS* und *BRAF* Mutationsanalyse der verwendeten CRC Zelllinien.

Gen	CaCo-2	DLD-1	HT-29	SW-480	LOVO	COLO 205	COLO-206F
<i>KRAS</i> Codon 12, 13	WT	Gly13Asp	WT	Gly12Val	Gly13Asp	WT	WT
<i>KRAS</i> Codon 61, 146	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
<i>BRAF</i>	WT	WT	Val600Glu	WT	WT	Val600Glu	Val600Glu

2.2.1.3 Isolation von RNA aus kolorektalen Adenokarzinomzelllinien

Zur Isolierung von RNA aus humanen kolorektalen Adenokarzinomzelllinien, welche nach Umwandlung in cDNA als Template für die RT-PCR Analysen diente, wurde TRIzol[®] Reagenz (Invitrogen) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine gebrauchsfertige Lösung zur

Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen und Geweben. TRIzol[®], eine mono-phasische Lösung aus Phenol und Guanidin Isothiocyanat, ist ein modifiziertes Reagenz zur Einzelschritt RNA-Isolation nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987).

Die in einer 75 cm² großen Zellkulturflasche ausplattierten, 80 % konfluenten Monolayerzellen wurden wie in 2.2.2.6 beschrieben, von dem Boden der Schale abgelöst und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde bei 4°C und 300 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Zellpellet mit 1xDPBS gewaschen. Es erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 4°C und 300 g für 5 min. Wiederum wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 1 ml TRIzol[®] Reagenz versetzt. Das Sediment-TRIzol[®] Gemisch wurde für 15 sec mit Hilfe eines Schüttelgeräts resuspendiert um das Pellet komplett zu lösen. Dieses Gemisch wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zugabe von 200 µl Chloroform. Anschließend wurde das Gemisch aus Zellsediment, TRIzol[®] und Chloroform mit Hilfe eines Schüttelgeräts für 10 sec gemischt und danach für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 12.000 g und 4°C. Während des Zentrifugationsschrittes legte man 500 µl Isopropanol in ein RNase-freies 1.5 ml Reaktionsgefäß vor. Das abzentrifugierte Gemisch bestand aus zwei Phasen: einer sich unten befindlichen rosa Phase und einer oberen, klaren Phase, in der sich die gelöste RNA befand. 500 µl der klaren Phase wurden dem vorgelegten Isopropanol zugefügt und durch dreimaliges invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt. Es folgte ein erneuter Inkubationsschritt von 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend an die Inkubationspause folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4°C und 12.000 g für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen. Ein letzter Zentrifugationsschritt schloss sich an: 5 min, 4°C, 7.500 g. Wiederum wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment im geöffneten 1.5 ml Reaktionsgefäß bei 42°C im Thermomixer für 5-10 min getrocknet. Je nach Pelletgröße wurde die RNA in 30-80 µl sterilem, 4°C kühlen, nukleasefreien Wasser gelöst. Anschließend wurde die Konzentration der RNA photometrisch bestimmt (siehe 2.2.1.4). Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

RNA, die als Probe für die Agilent Array Analyse diente (siehe 2.2.1.8), wurde aus kolorektalen Adenokarzinomzelllinien mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) präpariert. Hierbei wurden die Angaben des Herstellers befolgt. Die isolierte RNA wurde je nach Zellpelletgröße in 50-80 µl nukleasefreien und sterilem, 4°C kühlen Wasser gelöst. Der photometrischen

RNA Konzentrationsbestimmung folgte eine RNA Qualitätsanalyse mittels Nano Chip Analyse (siehe 2.2.1.5).

2.2.1.4 Photometrische Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen von RNA Proben wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Bei einer Schichtdicke der Küvette von 1cm entspricht die Absorption von 1.0 einer Konzentration von 40 µg einzelsträngiger RNA/ml (Sambrook *et al.*, 1989).

Zunächst erfolgte die photometrische Ermittlung eines Leerwert-Abgleichs, der aus 50 µl sterilem Wasser bestand. Anschließend wurden 2 µl RNA Probe mit 48 µl des sterilen Wassers verdünnt und deren Konzentration erfasst. Des Weiteren wurde der Reinheitsgrad der Probe ermittelt. Dieser gibt Auskunft über die Anwesenheit von Proteinen in der Probe, welche diese verunreinigen würden. Der Quotient der Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 280 nm und der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm wird als Reinheitsgrad bezeichnet. Dieser Wert sollte zwischen 1.7 und 2.0 liegen, wobei der Wert von 2.0 einer Probe reiner RNA entspricht. Bei einer Wellenlänge von 260 nm wurde die RNA-Konzentration der Proben ermittelt. Dabei sollte sich die optische Dichte im Messbereich von 0.1 und 1.0 befinden.

2.2.1.5 Reinheitsbestimmung von RNA mittels Nano Chip Analyse

Zunächst wurde die Konzentration der RNA wie unter 2.2.1.4 beschrieben photometrisch bestimmt. Die Reinheitsbestimmung der RNA wurde mit Hilfe des „Agilent 2100 Bioanalyzers“ und des Agilent RNA 6000 Nano Kits (Agilent) als Serviceleistung der „Core Facility“ des Biologisch-Medizinischen-Forschungs-Zentrums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Es handelt sich bei diesem Verfahren um eine Kapillargelelektrophorese. Das Arbeitsprotokoll des Herstellers wurde hierbei befolgt. Für weitere Versuche wurden nur RNAs verwendet, deren „RNA Integrity Number“ (RIN-Wert) zwischen einem Wert von acht und zehn lag. Der RIN-Wert stellt ein Qualitätslabel dar, welches von der Firma Agilent Technologies sowie Quantinome Bioinformatics entwickelt wurde. Auf Basis der ribosomalen Untereinheiten 28S- zu 18S-rRNA und deren Verhältnis sowie degradierten Abbauprodukten wird von der Software ein RIN-Wert ermittelt der

zwischen eins und zehn liegen kann. Ein Wert von eins entspricht einer vollständig degradierten RNA und ein Wert von zehn einer völlig intakten RNA.

2.2.1.6 cDNA Synthese durch Reverse Transkription (RT)

Die cDNA Synthese aus RNA erfolgte mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der sogenannten Reversen Transkriptase. Oligo (dT)-Primer binden an den Poly(A)-Schwanz der RNA und Enzyme wie z.B. AMV (engl.: Avian Myeloblastosis Virus, AMV) und deren Kofaktor MgCl₂ katalysieren die Reaktion von RNA zu cDNA. Der dNTP-Mix besteht zu gleichen Teilen aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP und dient der Verlängerung der Primer. Der Protector-RNase-Inhibitor Cocktail soll RNAsen inhibieren, die sich möglicherweise im Reaktionsgefäß befinden.

Zunächst wurde die cDNA-Erststrangsynthese ausgeführt (Reverse Transkription), wobei 2µg RNA als Template eingesetzt wurde. Ein Aliquot dieses Reaktionsansatzes wurde anschließend in einer „Real Time“ PCR-Reaktion verwendet, in der die synthetisierte cDNA wiederum als Template diente.

Die Reverse Transkription wurde nach folgendem Pipettierschema und Syntheseprogramm durchgeführt:

Pipettierschema:

2µg	Gesamt-RNA-Lösung
4µl	5x Reverse Transkriptase Puffer (5fach konzentriert)
10U	Reverse Transkriptase (20U/µl)
20U	Protector RNase Inhibitor (40U/µl)
2µl	Oligo (dT)-Primer (1:10 verdünnt aus dem Original)
2µl	dNTP-Mix (je 10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
→ ad	20µl Aqua dest.

Syntheseprogramm:

1. RT	10 min	Annealen der Primer
2. 55°C	30 min	Elongation der Primer
3. 85°C	5 min	Denaturieren der Reversen Transkriptase
4. 4°C	>5 min	Kühlung des Reaktionsansatzes

2.2.1.7 Amplifikation von Gensequenzen aus cDNA (Real Time PCR)

Die semiquantitative „Real Time“ PCR (qRT-PCR), auch als semiquantitative Echtzeit PCR bezeichnet, stellt eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren dar, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) nach Kary B. Mullis beruht (Saiki et al., 1988). Zusätzlich zur herkömmlichen PCR ermöglicht die qRT-PCR die Quantifizierung der gewonnenen DNA. Die Quantifizierung findet mit Hilfe einer Fluoreszenz-Messung statt. Bei der TaqMan-Sonden-basierten Fluoreszenz-Messung macht man sich den Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) zunutze, bei dem ein Donor-Fluorochrom, das durch eine Lichtquelle angeregt wird, einen Teil seiner Energie an ein in räumlicher Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom, den sogenannten Quencher, abgibt.

In dieser Arbeit wurden Sonden von der Firma Roche verwendet, die auf dem TaqMan-Prinzip basieren. Die Sonden sind zu einem Abschnitt des Zielgens komplementär und tragen an ihrem 5'-Ende ein Fluorochrom und am 3'-Ende den Quencher. Bei intakter Sonde wird durch die räumliche Nähe von Fluorochrom und Quencher die Fluoreszenz ausgelöscht. Trifft das Enzym Taq-Polymerase bei der Elongation mit seiner doppelstrangspezifischen 5'-Nukleaseaktivität auf die gebundene Sonde, wird diese abgebaut und trennt somit Fluorochrom und Quencher der Sonde. In Abhängigkeit zu der Menge an abgebauter Sonde, erhöht sich proportional die gemessene Fluoreszenz. Die qRT-PCR wurde nach folgendem Pipettierschema und Syntheseprogramm durchgeführt:

Pipettierschema:	12.50 µl	TaqMan Mastermix
	0.25 µl	Sonde
	0.25 µl	Forward Primer
	0.25 µl	Reverse Primer
	9.25 µl	Aqua dest.
	2.50 µl	cDNA Lösung (1ng/µl)

Syntheseprogramm:	1. 95°C	10 min
	2. 95°C	15 sec
	3. 60°C	1 min
	4. 39-malige Wiederholung der Schritte 2. und 3.	

Die Quantifizierung erfolgte über einen relativen Mengenvergleich zwischen der Expression des Zielgens und eines sogenannten Referenzgens, welches in allen Zellen einer Zellpopulation gleich stark exprimiert wird und keinen Schwankungen durch exogene

Einflüsse unterliegt. Dabei wurde der C(t)Wert (engl.: Cycle Treshold) zugrunde gelegt, welcher die Zyklenzahl beschreibt, in dem die Fluoreszenz erstmalig über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt und sich die Kurve im exponentiellen Bereich befindet:

$$\Delta C(t) = C(t) \text{ Zielgen} - C(t) \text{ Referenzgen}$$

Eine weitere Quantifizierung erfolgte über die Berechnung des $\Delta\Delta C(t)$ -Wertes, der es ermöglicht, die Expression eines Gens unter zwei verschiedenen Bedingungen, z.B. unter verschiedenen Kulturbedingungen, zu ermitteln:

$$\Delta\Delta C(t) = \Delta C(t) \text{ Kondition A} - \Delta C(t) \text{ Kondition B}$$

Die in dieser Arbeit vorgelegten qRT-PCR-Ergebnisse wurden mit Hilfe des Geräts Chromo 4 der Firma Biorad generiert. Sämtlich verwendete Primer und Sonden sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

2.2.1.8 Genexpressionsanalyse mittels Agilent Array Analyse

Die Genexpressionsanalysen mittels Agilent Array Analyse wurden freundlicherweise als Serviceleistung der „Core Facility“ des BMFZ von Dr. René Deenen angefertigt und ihre Durchführung im Folgenden nur kurz beschrieben.

Totale RNA Proben wurden auf ihre Integrität mittels „Agilent 2100 Bioanalyzer“ untersucht und nur die Proben für weitere Analysen verwendet, deren RIN-Werte zwischen acht und zehn lagen. Die RNA wurde mittels photometrischer Nanodrop Messung quantifiziert. Die cDNA Synthese und die folgende Fluoreszenzmarkierung wurde nach Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt (One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis, Low Input Quick Amp Labeling, Vers. 6.5; Agilent Technologies): 100 ng totale RNA wurde in cDNA konvertiert, anschließend folgte eine *in vitro* Transkription und der Einbau von Cy3-markierten Nukleotiden in die neu synthetisierte cRNA. Nach der Fragmentierung wurde die cRNA auf „Agilent Human 8x60K High Density Oligonucleotide Microarrays“ hybridisiert.

Die Datenanalyse wurde mit der „GeneSpring GX Software“ (Vers. 10.5; Agilent Technologies) durchgeführt. Die Signalintensitäten der einzelnen Arrays wurden

Quantil-normalisiert und anschließend auf den medianen Fluoreszenzwert aller Arrays bezogen, um diese untereinander vergleichbar zu machen. Nach der Gruppierung der Proben entsprechend ihrer Kulturbedingung (lrECM „on-top“ versus 2D Kultur; 24 versus 25 Proben) mußte ein Transkript in mindestens 75 % der Proben in einer der beiden oder beiden Gruppen exprimiert werden, um für die weitere Analyse verwendet zu werden.

Detektierbare Genexpression über dem Hintergrund wurde mit „Present flags“ gemäß „GeneSpring“ Standard Einstellungen für Agilent Microarrays charakterisiert. Die statistische Analyse der differentiellen Genexpression wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Resultierende p-Werte wurden für multiples Testen nach Benjamini-Hochberg korrigiert. Hierarchische Clusteranalysen wurden entweder anhand der Proben oder der Transkripte durchgeführt. Dabei wurde als Abstandsmaß die sogenannte "Manhattan distance" sowie als Verknüpfungsregel "complete linkage" verwendet.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung von humanen kolorektalen Adenokarzinomzelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurden die in Tabelle 7 aufgelisteten, adhärent bzw. semiadhärent wachsenden, kolorektalen Adenokarzinomzelllinien verwendet. Die Zellen wurden mit 0.2 ml Medium/cm² Kulturgefäßfläche kultiviert und dabei permanent in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten. Dadurch wird eine mögliche Zellsynchronisation oder eine Zellselektion verhindert.

Die Zellen wurden mit folgendem Nährmedium bei 37°C und einer Atmosphäre von 5 % (v/v) CO₂ kultiviert:

RPMI Medium 1640-GlutaMAXTM versetzt mit 10 % (v/v) FBS (Hitze-inaktiviert)

Die Hitzeinaktivierung des FBS, welche eine Inaktivierung von thermolabilen Viren und Mykoplasmen im FBS bewirkt, fand vor der Zugabe zum Kulturmedium bei 56°C für 30 min statt.

2.2.2.2 Kultivierung von humanen kolorektalen Adenokarzinomzelllinien in einer lamininreichen extrazellulären Matrix

Die 2D Zellkultur, bei der Zellen als homotypischer Monolayer auf einem Plastiksubstrat kultiviert werden, ist ein häufig genutzter Ansatz, um *in vitro* Studien durchzuführen. Problematisch dabei ist die Tatsache, dass primäre Tumoren und ihre Metastasen jedoch komplexe, heterotypische, dreidimensionale Strukturen bilden, die in einer organspezifischen Umgebung eingebettet sind. Um solch eine Umgebung zu rekonstruieren, bietet die 3D Zellkultur, bei der die Zellen in verschiedenen Matrices kultiviert werden können, eine sehr gute Alternative. Die beiden unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen, 2D versus 3D Modell, sind in Abbildung 6 dargestellt.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte 3D Zellkultur beruhte auf der Kultivierung der verwendeten Zellen „on-top“ einer sogenannten „growth factor reduced“-Matrigel-Matrix (BD Bioscience).

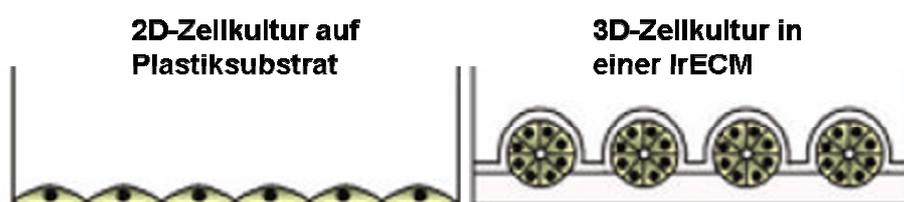


Abbildung 6: Darstellung der verschiedenen Kultivierungsmöglichkeiten von Tumorzellen. Links werden die Zellen als Monolayer auf Plastik in einem 2D Modell kultiviert, rechts als 3D Tumorsphäroid „on-top“ einer Matrigel Matrix. (Abb. verändert nach Lee *et al.*, Nature Methods, 2007).

Vor Versuchsbeginn wurde das bei -20°C gelagerte Matrigel über Nacht auf Eis aufgetaut. Alle verwendeten Zellkulturgefäße sowie Pipettenspitzen mussten über Nacht bei -20°C gelagert werden, da es sich bei dem Matrigel um eine sehr viskose Lösung handelt.

Zunächst wurde eine sehr dünne Schicht Matrigel, $150\ \mu\text{l}$ pro 24-well, auf den Boden des Kulturgefäßes gegeben und diese anschließend für 15 min bei 37°C und einer Atmosphäre von 5 % (v/v) CO_2 polymerisiert. In der Zwischenzeit erfolgten, wie unter 2.2.2.6 beschrieben, das Ablösen der Zellen aus der 2D Kultur, sowie eine Bestimmung der Zellzahl. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 1.8×10^4 Zellen in einem Volumen von $250\ \mu\text{L}$ RPMI Medium 1640-GlutaMAXTM +10 % (v/v) FBS auf die polymerisierte Matrigel Matrix, gefolgt von einer 15 min Inkubation bei 37°C und 5 % (v/v) CO_2 . Abschließend wurden die Zellen mit weiteren $250\ \mu\text{l}$ mit 10 %-igem „growth factor reduced-Matrigel“-haltigen Zellkulturmedium überschichtet.

Das Matrigel-Medium Gemisch wurde jeden zweiten Tag erneuert. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von sieben Tagen im IrECM „on-top“ Assay kultiviert, für die Bestimmung der 3D Morphologie bis zu zehn Tagen.

Das Herauslösen der Tumorzell Sphäroide aus der Matrix für eine anschließende RNA-Isolation (siehe 2.2.1.3) oder die Reaktivierung der Tumorsphäroide (siehe 2.2.2.5), geschah mit Hilfe von 400 μ l/24-well 37°C warmer Dispase-Lösung, die nach dem Verwerfen der Matrigel-Medium Lösung direkt auf die Sphäroide pipettiert wurde. Eine anschließende Inkubation der 24-well Platte bei 37°C und einer Atmosphäre von 5 % (v/v) CO₂ erwirkte eine komplette Auflösung des Matrigels. Diese Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml/24-well einer 10 mM EDTA-Lösung in 1xDPBS gestoppt. Das Herauslösen der Tumorzell Sphäroide für eine anschließende Proteinisolation (siehe 2.2.3.1), sowie eine Immunfluoreszenzfärbung der Sphäroide (siehe 2.2.2.4), geschah durch alleinige Zugabe und Inkubation der 10 mM EDTA/1xDPBS Lösung. Es schlossen sich zwei Waschschrte mit je 5 ml 1xDPBS und zwei Zentrifugationsschritte für 5 min bei 4°C und 300 g an, wenn aus den Sphäroiden RNA bzw. Protein isoliert werden sollte. Die Weiterverarbeitung der Tumorzellsphäroide für eine Immunfluoreszenzfärbung wurde, wie unter 2.2.2.4 beschrieben, durchgeführt.

Die Kultivierung der Zellen „on-top“ der IrECM zur Quantifizierung der 3D Zellproliferation bzw. der Ermittlung des Einflusses der IrECM auf die EGF-Rezeptor Inhibition, wurde im 96-well Format durchgeführt. Hierfür wurden die Vertiefungen der 96-well Platte mit je 25 μ l Matrigel beschichtet, dieses bei 37°C und einer Atmosphäre von 5 % (v/v) CO₂ für 15 min polymerisiert und anschließend mit 6x10³ Zellen in 75 μ l Kulturmedium pro 96-well überschichtet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 48 h.

2.2.2.3 Beurteilung der Tumorsphäroidstruktur

Die Tumorsphäroide wurden zur Beurteilung ihrer 3D Morphologie über einen Zeitraum von zehn Tagen in dem IrECM „on-top“ Assay kultiviert und täglich mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskopes visualisiert und photographisch dokumentiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt zehnmal unabhängig voneinander durchgeführt, um eine sichere Aussage über den 3D Morphologietyp treffen zu können.

Das von Kenny *et al.* erstellte Klassifizierungssystem zur Beurteilung von Sphäroidstrukturen von Mammakarzinom Zellen wurde der vorliegenden Arbeit als Beurteilungsgrundlage zugrunde gelegt. Anhand dieses Systems erfolgte die Klassifizierung

der CRC Tumorsphäroide in folgende Gruppen: „Round“, „Mass“, „Grape-like“ und „Stellate“. Wie aus Abbildung 7 ersichtlich, weist der „Round“-Typ eine organisierte Nuklei-Struktur auf, wobei diese bei den übrigen Typen disorganisiert vorliegt. Die Sphäroide der „Round“- und „Mass“-Klassifizierung besitzen robuste Zell-Zell-Kontakte, während die des „Grape-like“-Typs schwach sind. Der „Stellate“-Typ wird durch einen gestreckten Zellkörper mit invasiven Prozessen charakterisiert. Eine graphische Darstellung, eine Phasenkontrast-Aufnahme, sowie eine Immunfluoreszenzfärbung von F-Aktin und der Nuklei der verschiedenen Tumorsphäroidklassen ist in Abbildung 7 dargestellt.

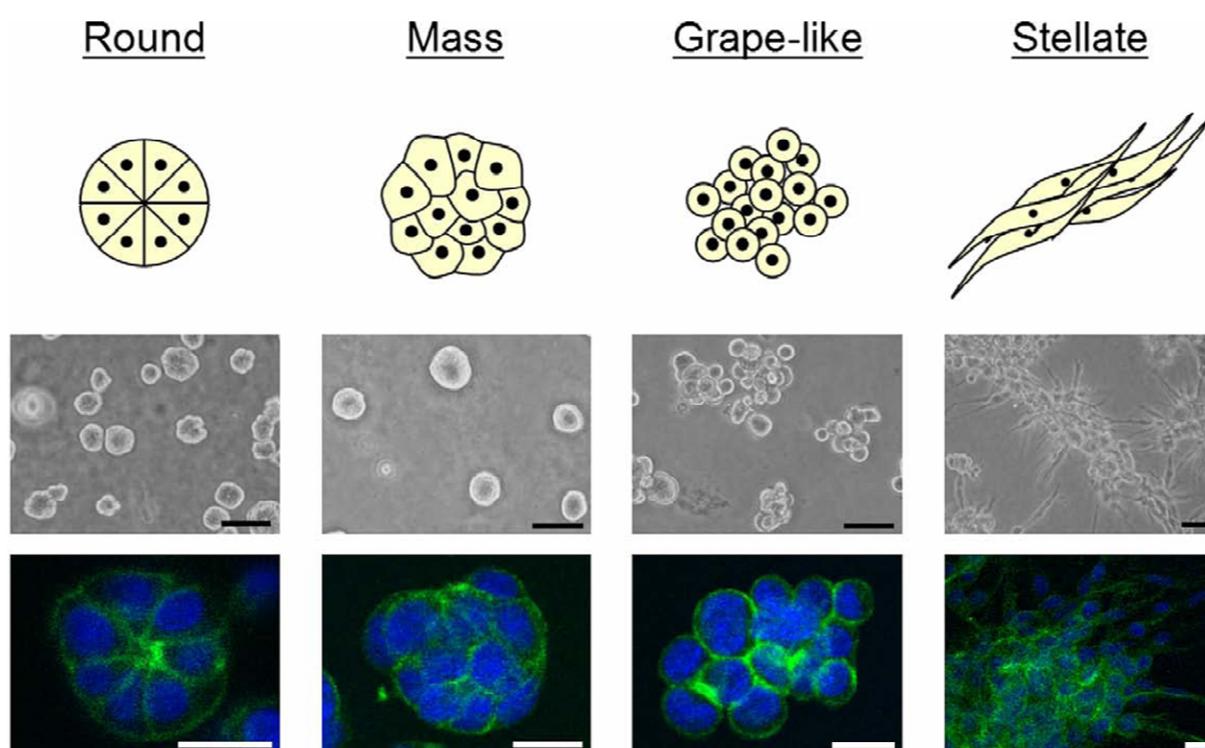


Abbildung 7: Klassifizierungssystem von Tumorsphäroiden in der IrECM. Verschiedene Mamma Zelllinien zeigen bei Kultivierung in der IrECM unterschiedliche, individuelle 3D Strukturen auf, die von Kenny *et al.* als „Round“, „Mass“, „Grape-like“ und „Stellate“ bezeichnet wurden. Diese sind graphisch, als Phasenkontrast-Aufnahme und Immunfluoreszenzfärbung von F-Aktin und Nukleus dargestellt. (Abb. verändert nach Kenny *et al.* Mol Oncol 1, 84-96 (2007)).

2.2.2.4 Bestimmung des 3D Zellmorphologietyps mittels

Immunfluoreszenzfärbung und konfokaler

Laser-Raster-Mikroskopie

Die kolorektalen Tumorsphäroide wurden, wie unter 2.2.2.2 beschrieben kultiviert, nach sieben Tagen aus der IrECM extrahiert und im Anschluss mit Hilfe einer Pipette auf einen Objektträger aufgetragen. Es folgte eine Inkubation der Sphäroidlösung auf dem Objektträger über Nacht bei RT. Nachdem die Sphäroidlösung getrocknet war, wurden die Tumorsphäroide mit einer -80°C kalten Aceton/Methanol-Lösung (1+1) für 15 min bei -20°C auf dem Objektträger fixiert. Es folgten zwei Waschschrte in 1xDPBS für jeweils 5 min. Im Anschluss wurden die Objektträger für 20 min bei RT mit einer Blockierungs-Lösung inkubiert, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern. Die Primärantikörperinkubation erfolgte in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht. Die verwendeten Primärantikörper und deren verwendete Verdünnungskonzentration in der Antikörper-Lösung sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Im Anschluss an die über-Nacht-Inkubation des Primärantikörpers wurde diese verworfen. Es folgten drei 5 min Waschschrte in 1xDPBS, denen sich die 60 min Sekundärantikörper-Inkubation anschloss. Die verwendeten Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper sind in Tabelle 5 aufgelistet, ihre Inkubation erfolgte bei RT im Dunkeln. Auch alle weiteren Arbeitsschrte wurden im Dunkeln durchgeführt, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs zu verhindern. Zur Visualisierung des Zellkerns und der Chromatinstrukturen folgte eine Färbung mit einer 0.01 µg/ml DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole Dihydrochlorid)-Lösung in 1xDPBS für 4 min bei RT. Dieser folgten zwei weitere Waschschrte mit 1xDPBS für jeweils 5 min. Abschließend wurden die angefärbten Tumorsphäroide mit einem „Vecta Shield Mounting Medium“ für Fluoreszenz (Vector Laboratories) eingedeckelt. Die Objektträgerdeckgläser wurden mit Nagellack umrandet, um ein Austrocknen der Färbung zu verhindern. Die Lagerung der Objekte erfolgte bis zur Visualisierung, mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie, bei 4°C im Dunkeln. Die Visualisierung erfolgte mit dem Konfokalmikroskop LSM 510 Meta (Zeiss).

2.2.2.5 Rekultivierung von Tumorsphäroiden aus der IrECM auf Plastiksubstrat

Um die Tumorsphäroide zu rekultivieren wurden sie, wie unter 2.2.2.2 beschrieben, mit Hilfe von Dispase-Lösung aus der IrECM herausgelöst und anschließend vorsichtig zweimal mit je 5 ml 1xDPBS in einem 15 ml Reaktionsgefäß gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift ließ man die Tumorsphäroide in der 1xDPBS Lösung absinken, verwarf das 1xDPBS und überführte die Tumorsphäroide mit Hilfe einer Pipette in eine 25 cm² große Zellkulturflasche, die 0.2 ml/cm² RPMI Medium 1640-GlutaMAXTM + 10 % FBS enthielt. Die Sphäroide wurden über einen Zeitraum von sieben Tagen auf dem Plastiksubstrat rekultiviert, wobei nach vier Tagen das Kulturmedium gegen 0.2 ml/cm² frisches Kulturmedium ersetzt wurde. Die Sphäroidstrukturen wurden täglich mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskops beobachtet und fotografisch dokumentiert.

2.2.2.6 Ablösen von adhärennten Zellen vom Zellkulturgefäß

Das Ablösen der adhärennt wachsenden Zellen vom Zellkulturgefäß, zum Passagieren oder zur Zellernte, erfolgte nach dem Waschen der Zellen mit 1xDPBS. Es folgte die Zugabe einer Trypsin 0.05 %-EDTA Lösung auf den Monolayer und eine Inkubation der Zellen für 5-10 min bei 37°C und einer Atmosphäre von 5 % (v/v) CO₂. Dieser Behandlungsschritt bewirkte das Ablösen der Zellen vom Untergrund durch eine Spaltung der Cadherine der Zellen. Nach dem Ablösevorgang wurde die Trypsin 0.05 %-EDTA Lösung durch Zugabe des gleichen Volumens an RPMI Medium 1640-GlutaMAXTM + 10 % FBS inhibiert. Die Zellernte für eine anschließende Proteinextraktion erfolgte über Abschaben der Zellen vom Kulturgefäß, nachdem sie ebenfalls zuvor mit 1xDPBS gewaschen wurden.

2.2.2.7 Passagieren der Zellen

Wie unter 2.2.2.6 beschrieben wurden die humanen kolorektalen Adenokarzinomzellen mit 1xDPBS gewaschen und vom Untergrund des Kulturgefäßes abgelöst. Durch Hinzugabe des gleichen Volumens an Kulturmedium zur Trypsin 0.05 %-EDTA Lösung wurde der Ablöse-Vorgang gestoppt. Die Zelllösung wurde im Anschluss resuspendiert, um noch möglicherweise haftende Zellen, durch Abspülen des Bodens der Zellkulturflasche, mit der

Zelllösung abzulösen. Die Zellen wurden so passagiert, dass sie den Boden einer Zellkulturflasche alle drei bis vier Tage zu 80 % konfluent bewuchsen.

2.2.2.8 Kryokonservierung von humanen kolorektalen

Adenokarzinomzellen: Einfriervorgang

Die Kryokonservierung ermöglicht die dauerhafte Lagerung von Zellen, die bei Bedarf wieder aufgetaut und kultiviert werden können.

Die Zellen wurden zuerst mit 1xDPBS für 30 sec gewaschen, diese Lösung verworfen und durch die gleiche Menge an Trypsin 0.05 %-EDTA Lösung ersetzt, um die Zellen vom Untergrund des Kulturgefäßes abzulösen. Es folgte eine Inkubation der Zellen bei einer Atmosphäre von 5 % (v/v) CO₂ und 37°C für 5-10 min. Wiederum die gleiche Menge an Kulturmedium wurde nach dem Ablösevorgang in das Kulturgefäß pipettiert, um die Reaktion abzustoppen. Die Zellsuspension wurde resuspendiert und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde in einer Neubauerkammer gezählt und die Zellsuspension auf eine Gesamtmenge von 1×10^7 Zellen eingestellt. Die entsprechende Zellmenge wurde in einem neuen 15 ml Reaktionsgefäß für 5 min bei 4°C und 300 g abzentrifugiert. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde das Medium verworfen und das entstandene Zellpellet in 1 ml Kryolösung aufgenommen. Diese Suspension wurde in ein auf Eis vorgekühltes Kryoröhrchen überführt. Im Anschluss wurden die sich im Kryoröhrchen befindlichen Zellen zunächst für 2 h bei -20°C gelagert, danach über Nacht bei -80°C. Die dauerhafte Lagerung der Zellen erfolgte anschließend in einem Stickstofftank.

Kryo-Lösung:	70 % (v/v)	RPMI Medium 1640-GlutaMAX TM mit 10 % FBS
	20 % (v/v)	FBS
	10 % (v/v)	DMSO

2.2.2.9 Kryokonservierung von humanen kolorektalen

Adenokarzinomzellen: Auftauen von Zellen

Das eingefrorene Kryoröhrchen, in dem sich die zu auftauende Zellsuspension befand, wurde aus dem Stickstofftank entnommen und für 1 min in der Hand erwärmt. Die Zellsuspension wurde dann durch dekantieren in ein 15 ml Reaktionsgefäß, in dem sich 9 ml RPMI Medium

1640-GlutaMAX™ + 10 % FBS befanden, überführt und für 5 min bei RT und 300 g abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit 0.2 ml Kulturmedium/cm² Kulturgefäß gemischt und in ein 25 cm² großes Kulturgefäß überführt. Nach 5-6 h folgte eine Überprüfung der Konfluenz am Lichtmikroskop. Bei Bedarf wurden die Zellen, wie unter 2.2.2.7 beschrieben, in ein größeres Zellkulturgefäß überführt.

2.2.2.10 Bestimmung der Zellzahl mit dem Hemocytometer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde, nach dem Ablösen der Zellen vom Kulturgefäß, ein Aliquot der Zellsuspension entnommen und durch lichtmikroskopisches Auszählen mit Hilfe der Neubauer-Kammer die Zellzahl ermittelt. Die Lebend/Tod Differenzierung wurde durch die Zugabe von 0.2 % (v/v) Trypanblau vorgenommen. Trypanblau gehört zu den Azofarbstoffen und wird aufgrund seiner Membrandurchlässigkeit nur von toten Zellen, deren Zellmembran beschädigt ist, aufgenommen. Die lebenden Zellen, mit einer intakten Zellmembran, nehmen den Farbstoff hingegen nicht auf und erscheinen im Lichtmikroskop weiß/klar. Es wurden alle lebenden Zellen in vier Eckquadraten der Neubauerkammer gezählt und die Zellkonzentration der Zellsuspension mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = n/4 \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

„n“ bezeichnet die Gesamtmenge der gezählten Zellen, 10⁴ stellt den Kammerfaktor dar und der Verdünnungsfaktor berechnet sich aus dem Verhältnis von Zellsuspension zu Trypanblau-Lösung.

2.2.2.11 Erstellen von Wachstumskinetiken

Eine Wachstumskinetik wird in drei unterschiedliche Abschnitte eingeteilt: die lag-Phase, die log-Phase und die Sättigungsphase. Die lag-Phase beschreibt die „frühe“ Phase, in der kein starker Anstieg der Zellzahl vorkommt. In dieser Phase werden von den Zellen wichtige Wachstumsfaktoren synthetisiert, die eine anschließende Zellteilung ermöglichen. Mehrere Faktoren beeinflussen die Dauer der lag-Phase: die Anzahl der ausplattierten Zellen, das verwendete Kulturmedium und der Status der Zellen.

Die log-Phase schließt sich der lag-Phase an. Sie zeichnet sich durch einen exponentiellen Anstieg der Zellzahl aus. Menschliche Zellen verdoppeln sich durchschnittlich alle 12-24 Stunden. Beim Passagieren von Zellen soll stets darauf geachtet werden, dass sich die Zellen in der log-Phase befinden, um sicherzustellen, dass optimale Bedingungen für die Zellen herrschen. Der log-Phase folgt die stationäre Phase, in der kein weiterer Anstieg der Zellzahl stattfindet. In dieser Phase wird das Zellwachstum durch verschiedene Faktoren, wie z.B. Mangel an Nährmedium oder Platzmangel in dem Zellkulturgefäß, limitiert.

Die Ausgangskonzentration an Zellen betrug 1×10^5 pro 25 cm^2 Kulturgefäß. Insgesamt wurden pro Zelllinie zehn Zellkulturflaschen benötigt. Zelllinienabhängig wurden über einen Zeitraum von acht bzw. zehn Tagen, alle zwei Tage die Zellen zweier Zellkulturflaschen, wie unter 2.2.2.6 beschrieben, mit einer Trypsin-Lösung vom Zellkulturgefäß abgelöst und jeweils drei Aliquots der beiden Zellsuspensionen, getrennt voneinander, in einer Neubauerkammer, wie unter 2.2.2.10 beschrieben, ausgezählt. Die Gesamtzellzahl wurde folgendermaßen berechnet:

$$n/4 \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{ZSV}$$

wobei „n“ die Gesamtheit der gezählten Zellen und „ZSV“ das Zellsuspensionsvolumen beschreibt.

Die Zellzahl/ cm^2 ergibt sich aus der Formel:

$$\text{Gesamtzellzahl}/\text{cm}^2 \text{ der Zellkulturflasche}$$

2.2.2.12 Inkubation von humanen kolorektalen Adenokarzinomzelllinien mit einem EGF-Rezeptor Inhibitor

Um eine Inhibition des EGF-Rezeptors zu bewirken, wurden die humanen kolorektalen Adenokarzinomzelllinien CACO-2, DLD-1 und HT-29 mit dem EGFR spezifischen Inhibitor Tyrphostin AG1478 in folgenden Endkonzentrationen über einen Zeitraum von 48 h inkubiert: $20 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$, $2.5 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ und $0.1 \mu\text{M}$. Die Inkubation der Zellen mit dem Inhibitor erfolgte im 96-well Format. Um auszuschließen, dass das Lösungsmittel DMSO/Methanol, in dem das als Lyophilisat vorliegende Tyrphostin AG1478 vor

Versuchsbeginn gelöst wurde, unspezifische Effekte auf die Zellen ausübt, wurde das Lösungsmittel in entsprechender Volumenmenge auf einer weiteren Zellpopulation inkubiert, die als Kontrollgruppe diente. Nach 48-stündiger Inkubation des EGFR Inhibitors AG1478, bzw. der Lösungsmittel-Kontrolllösung, wurde zur Bestimmung der Zellproliferation, wie unter 2.2.2.13 beschrieben, ein MTT-Assay durchgeführt.

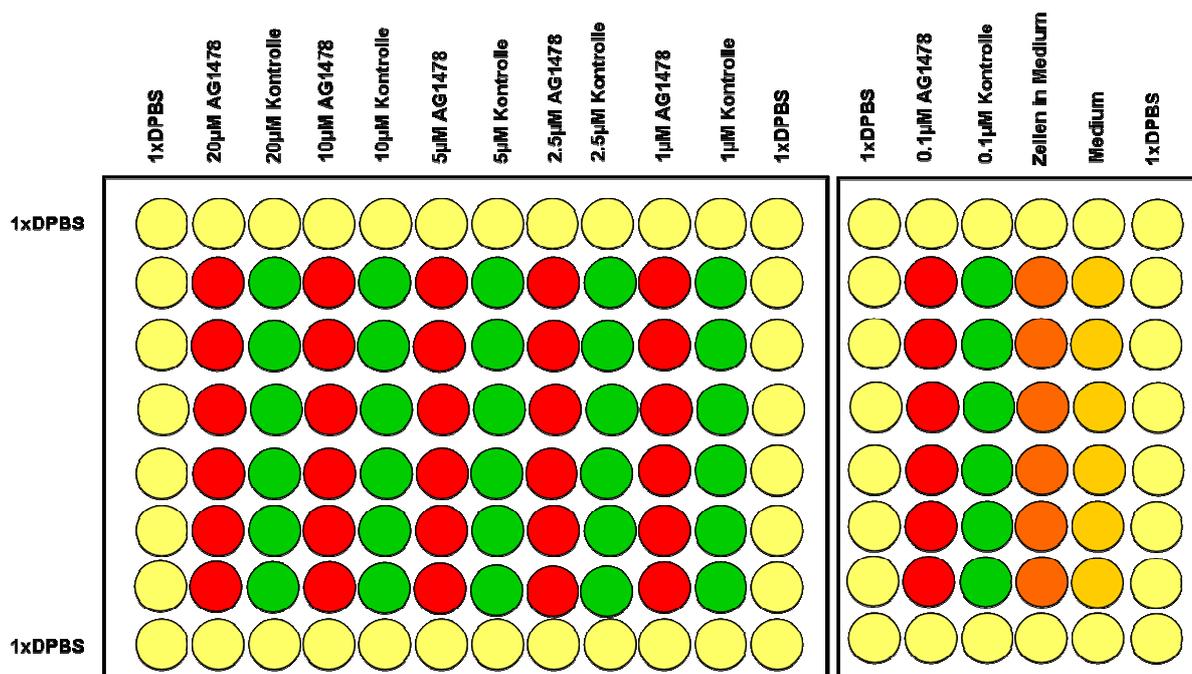


Abbildung 8: Pipettierschema zur EGF-Rezeptor Inhibition mittels Tyrphostin AG1478 Behandlung im 96-well Format.

2.2.2.13 Ermittlung der Zellproliferation mittels MTT-Assays

Der MTT-Assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, MTT) ist ein kolometrischer Assay mit dem sowohl die Zellvitalität als auch die Zellproliferation bestimmt werden kann (Mosmann, 1983). Der Nachweis der Zellvitalität bzw. der Zellproliferation mittels MTT-Assays basiert auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs MTT in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Durch Zugabe der sogenannten Fixierlösung wird das wasserunlösliche blau-violette Formazan-Produkt in Lösung überführt. Die Absorption dieser farbigen Lösung kann im Anschluss bei einer Wellenlänge von 540 nm mit Hilfe eines Spektrophometers quantifiziert werden. Zunächst bestand die Annahme, dass MTT durch mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen reduziert wird, neuerdings belegen

Studien aber, dass die Reduktion hauptsächlich von den pyridinhaltigen Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH abhängig ist (Berridge and Tan, 1993).

Fixierlösung:	10 %	SDS
	5 %	1-Butanol
	0.01 M	HCL

Pro 96-well einer Mikrotiterplatte wurden 6×10^3 Zellen ausplattiert und über einen Zeitraum von 48 h bei 37°C und einer Atmosphäre von 5 % (v/v) CO₂ kultiviert, bevor die Zugabe von 20 µl MTT-Reagenzes (5mg/ml) (Sigma) pro 100 µl Kulturmedium erfolgte. Im Anschluss daran wurde 4 h nach MTT-Reagenzzugabe 50 µl Fixierlösung pro 20 µl MTT-Reagenzlösung auf die Zellen gegeben und diese über Nacht, unter den oben angegebenen Bedingungen, inkubiert. Die Messung im Spektrophometer bei einer Wellenlänge von 540 nm erfolgte genau 24 h nach der Zugabe des MTT-Reagenzes.

Um den Einfluss der ECM auf die Zellproliferation bzw. die EGF-Rezeptor Inhibition zu quantifizieren, wurden die Vertiefungen der 96-well Platte, wie unter 2.2.2.2 beschrieben, vor Versuchsbeginn mit 25 µl „growth factor reduced“ Matrigel beschichtet und mit der gleichen Zellmenge wie in dem 2D Versuchsansatz, allerdings in 75 µl Kulturmedium, bestückt. Das weitere Vorgehen ist zu dem des 2D Kulturansatzes äquivalent.

2.2.2.14 Bestimmung des IC₅₀ Wertes nach EGF-Rezeptor Inhibition mittels MTT-Assays

Eine Inhibition des EGF-Rezeptors wurde, wie unter 2.2.2.12 beschrieben, mit dem EGFR spezifischen Inhibitor Tyrphostin AG1478 erzielt und die Zellvitalität bzw. die Zellproliferation, wie unter 2.2.2.13 angegeben, mittels MTT-Assays quantifiziert. Der IC₅₀ Wert wird auch als die mittlere inhibitorische Konzentration bezeichnet und beschreibt die Konzentration eines Inhibitors, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird. Die Berechnung des IC₅₀ Wertes erfolgte mit Hilfe des „GraphPad Prism Programmes“, Version 5.01.

2.2.2.15 Bestimmung der Zellmigration mittels „Fence“-Assay

Mit dem Versuchssystem des „Fence“-Assays (Aix Scientifics) wird mit wieder verwendbaren 16 mm-Edelstahl-Silikon-Einsätzen, den so genannten „Fences“, für 24-well-Zellkulturplatten gearbeitet, um die Zellmigration zu quantifizieren. Die „Fences“ sind folgendermaßen aufgebaut:

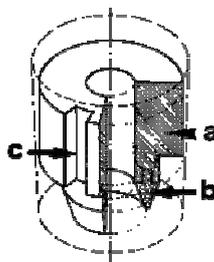


Abbildung 9: Aufbau eines 16mm-Edelstahl-Silikon-Einsatzes („Fence“). (a) zeigt das Stahlgehäuse, (b) die Begrenzung aus Silikon und (c) die Pipettierrinne die Zugang zur äußeren Kammer ermöglicht. (Quelle: <http://aix-scientifics.de/de/fences.html>)

wobei „a“ das Stahlgehäuse, „b“ die Begrenzung aus Silikon und „c“ die Rinne, die den Zugang zur äußeren Kammer ermöglicht, darstellt.

Der Silikonring solch eines „Fences“ wurde zunächst mit Medium befeuchtet und anschließend in eine Vertiefung einer 24-well Platte eingesetzt. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und einer Atmosphäre von 5 % (v/v) CO₂ für 30 min, um eine optimal dichte Verbindung von „Fence“ und dem Boden des Kulturgefäßes zu bewirken. Anschließend wurde über die Rinne pro 24-well je 650 µl des RPMI Mediums 1640-GlutaMAXTM + 10 % FBS in die äußere Kammer eingefüllt. In den Innenraum des Stahlgehäuses wurden jeweils 7.5×10^3 Zellen in jeweils 150 µl Kulturmedium gefüllt und diese über einen Zeitraum von vier Tagen bei 37°C und einer Atmosphäre von 5 % (v/v) CO₂ bis zu 100 % iger Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die „Fences“ mit Hilfe einer sterilen Pinzette entfernt und jedes 24-well mit 2 ml 1xDPBS gewaschen. Daran schloss sich die Zugabe von 1.5 ml frischem Kulturmedium zu den Zellen an und eine weitere Kultivierung der Zellen unter den genannten Bedingungen für weitere drei Tage. Es folgte ein weiterer Waschschriff und eine anschließende Fixierung der Zellen mit einer 10 % igen Formaldehydlösung für 15 min. Die fixierten Zellen wurden erneut mit Aqua dest. gewaschen, bevor die Zellpopulation mit einer gebrauchsfertigen Mayershämalaunlösung (Merck) für 15 min angefärbt wurde. Abschließend wurde die Färbelösung abgenommen und die Vertiefungen (wells) der 24-well Platte ausreichend mit Leitungswasser nachgespült. Die Trocknung der Platten erfolgte über Nacht bei RT. Sie wurden am folgenden Tag mit Hilfe des Versa Doc Programmes „Quantity One

4.5.0“ (Biorad) ausgelesen. Die Umrandung der Fläche des angefärbten Zellrasens wurde manuell vorgenommen und diese Fläche in mm^2 von der Software berechnet.

Um Zellmigration und Zellproliferation voneinander unterscheiden zu können, wurden Vorversuche durchgeführt, bei denen die Zellen in Zellkulturmedium kultiviert wurden, welches nur 1 % FBS enthielt. Eine Zellproliferation findet unter diesen wachstumsfaktorreduzierten Umständen nicht statt, womit die berechnete Fläche des angefärbten Zellrasens als Zellmigration gewertet werden kann. Die erzielten Ergebnisse des Vorversuchs zeigten eine nahezu gleich große Zellmonolayerfläche für beide Versuchsansätze, Kultivierung mit 10 % FBS versus 1 % FBS. Dieses Ergebnis ist beispielhaft anhand der Zelllinie HT-29 in der Abbildung 10 dargestellt. Die berechnete Fläche lag für die Kultivierung mit 10 % FBS-haltigem Medium bei einem Mittelwert \pm Standardabweichung von $111.17 \pm 6.18 \text{ mm}^2$ und für die Kultivierung mit 1 % FBS bei $113.69 \pm 5.60 \text{ mm}^2$.

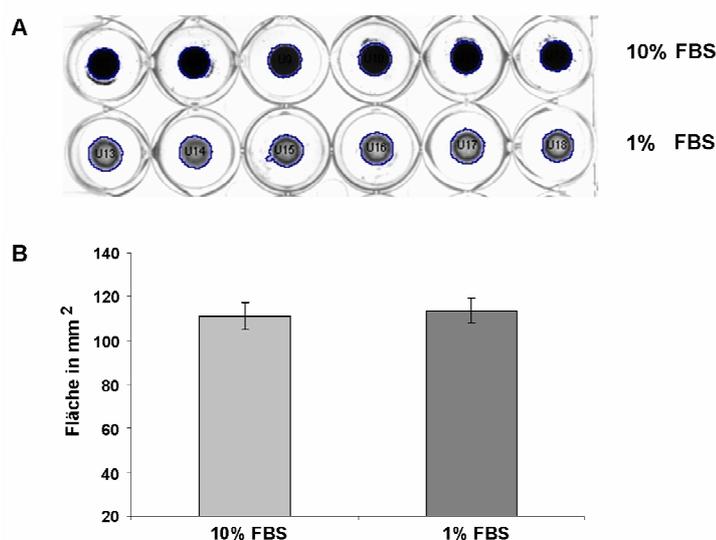


Abbildung 10: Untersuchung des Migrationspotentials der CRC Zelllinie HT-29 unter verschiedenen FBS-Konzentrationen. (A) Repräsentative Ausschnitte von 24-wells, in denen sich der angefärbte Zellmonolayer befindet. Eine Kultivierung der HT-29 Zellen erfolgte mit einem Kulturmedium das entweder 10 % FBS (oben) oder 1 % FBS (unten) enthielt. (B) Graphische Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung des angefärbten und berechneten Zellmonolayers der Zelllinie HT-29 unter Kultivierung mit 10 % FBS-haltigem Medium bzw. 1 % FBS-haltigem Medium.

2.2.2.16 Bestimmung der Zellinvasion mittels Boyden Chamber Assay

Das BD BioCoat Matrigel Invasions-2-Kammersystem ermöglicht es, die invasiven Eigenschaften einer Zelllinie durch eine Basalmembran zu quantifizieren. Dieses Boyden 2-Kammersystem ist folgendermaßen aufgebaut:

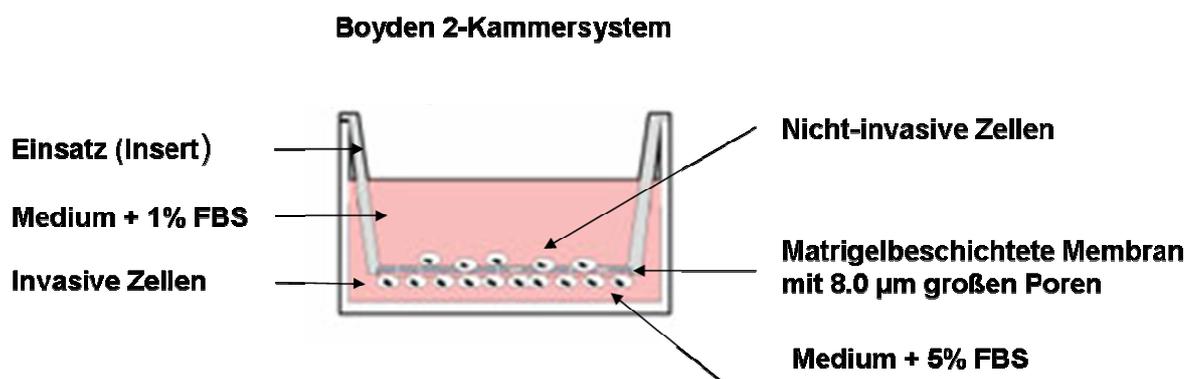


Abbildung 11: Aufbau eines Boyden 2-Kammersystems. Eine bestimmte Zellzahl wird in einem sogenannten Insert ausplattiert. Besitzen diese Zellen invasive Eigenschaften invadiieren sie entlang des FBS-Gradienten durch die matrigelbeschichteten Poren der Membran und setzen sich an der Unterseite der Membran fest. (Abb. verändert nach: http://www.bdbiosciences.com/wcmimages/EndothelialCells_Figure3_h.jpg)

Das System wird von der Firma BD Bioscience im 24-well Format angeboten und die Lagerung erfolgte bei -20°C . Zu Versuchsbeginn wurde die 24-well Platte auf RT erwärmt und jeder Einsatz (Insert) mit $500\ \mu\text{l}$ RPMI Medium 1640-GlutaMAXTM + 1 % FBS für 2 h bei 37°C und einer Atmosphäre von 5 % (v/v) CO_2 rehydriert. In der Zwischenzeit wurden, wie unter 2.2.2.6 beschrieben, die adhären wachsenden Zellen vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst und auf eine Zellzahl von $5 \times 10^4/\text{ml}$ im Medium RPMI 1640-GlutaMAXTM + 1 % FBS eingestellt. Das Medium, welches zur Rehydrierung der matrigelbeschichteten Membran verwendet wurde, wurde verworfen und anschließend $500\ \mu\text{l}$ der vorbereiteten Zellsuspension in das Insert pipettiert, so dass sich pro Insert 2.5×10^4 Zellen befanden. Der Boden des Zellkulturgefäßes, in dem sich das Insert befand, wurde mit $750\ \mu\text{l}/24\text{-well}$ des Kulturmediums RPMI 1640-GlutaMAXTM + 5 % FBS bestückt. Die Zellen wurden anschließend für 48 h bei 37°C und einer Atmosphäre von 5 % (v/v) CO_2 kultiviert, wobei Zellen mit invasivem Potential, aufgrund des FBS-Gradienten, auf die Unterseite der Membran des Inserts invadierten. Nach 48-stündiger Kultivierung der Zellen wurde das Kulturmedium aus den Inserts abgekippt und diese in eine neue 24-well Platte überführt, in der sich pro 24-well 1 ml 100 % Methanol befand. Durch 10 min Inkubation in dem Methanol wurden die invadierten Zellen auf der Unterseite der Membran fixiert. Die Anfärbung der

Zellen erfolgte mit Hilfe einer Kristallviolett-Färbelösung, in der die Membran für 15 min inkubiert wurde.

Kristallviolett-Färbelösung:	0.5 %	Kristallviolett
	20.0 %	Methanol
	79.5 %	Aqua dest.

Abschließend wurde die überschüssige Färbelösung mit Leitungswasser abgespült und die Membranen bei RT über Nacht getrocknet, mit Hilfe eines Skalpells aus dem Insert ausgeschnitten und mit Entellan (Merck) auf einem Objektträger fixiert. Die quantitative Bestimmung der invadierten Zellen erfolgte manuell mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Leica). Hierbei wurde ein definierter, zentraler Bereich der Membran betrachtet und ausgewertet.

Um Zellinvasion von Zellmigration differenzieren zu können, wurden zusätzlich zu den matrigelbeschichteten Invasionseinsätzen sogenannte Kontrolleinsätze mitgeführt. Im Gegensatz zu den Invasionseinsätzen waren diese nicht mit Matrigel beschichtet und somit konnte die Zellmigration bestimmt werden. Die Durchführung erfolgte in gleicher Weise wie bei den Invasionseinsätzen.

Der Invasionsindex wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Invasionsindex} = (\text{Invasion} - \text{Kontrolle}) \times 100$$

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Säugerzellen

Für die Isolierung von Proteinen aus den adhärent wachsenden, humanen kolorektalen Adenokarzinomzelllinien wurden diese in 10 cm² Kulturschalen bis zu 80 %-iger Konfluenz kultiviert, anschließend mit 1xDPBS gewaschen, um eine Verunreinigung der Proteinlysate durch Kulturmediumreste und das darin enthaltene FBS zu verhindern und anschließend mechanisch vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 300 g für 5 min. Das dabei entstandene Zellpellet wurde erneut einem Waschschrift mit 1xDPBS unterzogen und wiederum unter den genannten Bedingungen zentrifugiert. Der

Überstand wurde verworfen und das Zellsediment (Pellet) je nach Größe in 200-300 μ l Proteinlysepuffer aufgenommen und mehrfach resuspendiert. Dieser Zellsediment-Proteinlysepuffer-Mix wurde für 30 min in einem Eisbad gelagert und alle 5 min erneut resuspendiert. Durch Zentrifugation bei 12.000 g für 10 min bei 4°C erfolgte die Sedimentierung der Zelltrümmer. Der Überstand enthielt die lysierten Proteine und wurde in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Es folgte eine, wie unter 2.2.3.2 beschriebene, Bestimmung der Proteinkonzentration am Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proteinproben bei -80°C gelagert.

Proteinlysepuffer:	30 mM	1M Tris (pH 7.5)
	150 mM	5M NaCl
	1 % (v/v)	TritonX-100
	10 % (w/v)	Glycerin
	1 % (v/v)	Nonident P40
	1Tablette	Protease-Inhibitor

Die Isolation der Tumorsphäroide aus der IrECM erfolgte, wie unter 2.2.2.2 beschrieben, die Proteinisolation wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

2.2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen der isolierten Proteinlysate wurde die Methode von Bradford *et al.* (Bradford, 1976) und Compton und Jones (Compton and Jones, 1985) verwendet. Hierfür wurde das „Bio-Rad Protein Assay Reagenz“ eingesetzt.

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass sich das Absorptionsmaximum von Coomassie-Brillant-Blau R-240 im sauren Milieu bei Komplexbildung mit Proteinen von 470 nm auf 595 nm verschiebt (Bradford, 1976; Compton and Jones, 1985). Die Zunahme der Extinktion kann, bei einer Wellenlänge von 595 nm, photometrisch erfasst werden und daraus die Konzentration der Proteinprobe ermittelt werden. Da auch der ungebundene Farbstoff bei 595 nm eine geringe Absorption zeigt, muss neben den zu ermittelnden Proteinproben ein Standard mit bekannter Proteinkonzentration mitgeführt werden, um eine Verfälschung der Messwerte zu vermeiden. Als Standard diente in Aqua dest. verdünntes BSA in den Konzentrationen 20 μ g/ml, 10 μ g/ml und 5 μ g/ml.

Standard-Bezugskurve:

Nullwert	800 μ l	Aqua dest.
	+200 μ l	Biorad Reagenz
20 μ g/ml	400 μ l	Aqua dest.
	+ 400 μ l	BSA (50 μ g/ml)
	+ 200 μ l	Biorad Reagenz
10 μ g/ml	600 μ l	Aqua dest.
	+ 200 μ l	BSA (50 μ g/ml)
	+ 200 μ l	Biorad Reagenz
5 μ g/ml	700 μ l	Aqua dest
	+ 100 μ l	BSA (50 μ g/ml)
	+ 200 μ l	Biorad Reagenz

Die gemessenen Extinktionen der einzelnen Bezugskurven-Proben wurden jeweils durch die enthaltende μ g/ml Zahl dividiert und aus diesen drei Werten der Mittelwert berechnet, welcher als Standardextinktion galt.

Proteinprobenmessung:

798 μ l	Aqua dest.
+ 2 μ l	Proteinlysate
+ 200 μ l	Biorad Reagenz

Der Verdünnungsfaktor der Proteinprobe beträgt bei einem Endvolumen von 1 ml den Faktor 500.

Formel zur Berechnung der Proteinkonzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$:

$$\frac{\text{Probenextinktion} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Standardextinktion}}$$

$1000\mu\text{l}$

Die Proteinkonzentration in $\mu\text{g}/\text{ml}$ wurde von dem Photometer berechnet und angegeben.

2.2.3.3 Western Blot

Der sogenannte Western Blot besteht aus mehreren Arbeitsschritten und dient der Identifikation und Quantifizierung spezifischer Proteine aus komplexen Proteingemischen. So können beispielsweise einzelne Proteine aus einem Gesamt-Zell-Proteingemisch nachgewiesen werden. Die einzelnen Arbeitsschritte gliedern sich wie folgt:

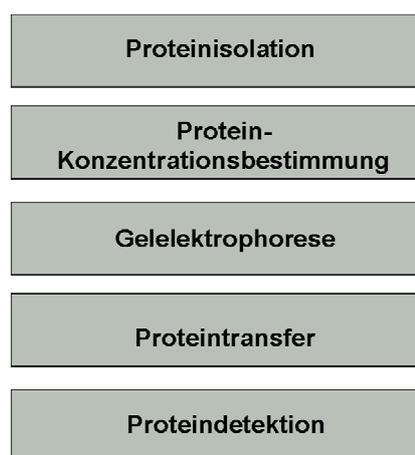


Abbildung 12: Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte eines Western Blots. Nach der Proteinisolation und der Konzentrationsbestimmung wird eine Gelelektrophorese durchgeführt, der sich der Proteintransfer anschließt. Abschließend folgt der Arbeitsschritt der Proteindetektion.

2.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Die Polyacrylamid-Gele hatten eine Konzentration von 6-12 %. Die Konzentrationen richteten sich hierbei nach der Größe des zu detektierenden Proteins. Nach der Polymerisierung der Trenngele wurden diese mit einem 5 %-igem Sammelgel überschichtet.

Alle Gelelektrophoresen wurden, bei einer konstanten Spannung von 300 mA, in einem vertikalen System von der Firma Biorad durchgeführt. Hierbei erfolgte die Auftrennung der zu untersuchenden Proteinprobe in einzelne Proteinbanden. Bevor die Proteinproben auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen wurden, versetzte man sie mit einem Protein-Gelladepuffer und denaturierte die Proben anschließend bei 95°C für 5 min in einem Heizblock. Diesem Schritt schloss sich ein resuspendieren durch Vortexen und eine 30 s Zentrifugation in einer Mini-Tischzentrifuge an. Als Standard zur Molekulargewichtsbestimmung diente der „Precision Plus Protein WesternC Standard“-Marker (BioRad).

Trenngel:

20-50 % (v/v)	Rotiphorese Acrylamid-Mix
375 mM	Tris/HCl (pH 8.8)
0.1 % (w/v)	SDS
0.03 % (w/v)	TEMED
0.04 % (w/v)	APS

Sammelgel:

7 % (v/v)	Rotiphorese Acrylamid-Mix
125 mM	Tris/HCl (pH 6.8)
0.1 % (w/v)	SDS
0.08 % (v/v)	TEMED
0.1 % (w/v)	APS

Elektrophoresepuffer:

25 mM	Tris
192 mM	Glycin
0.1 % (w/v)	SDS

Protein-Gelladepuffer:

100mM	Tris/HCl (pH 8.0)
1mM	EDTA
12.5 % (v/v)	Glycerin
2 % (w/v)	SDS
2 % (v/v)	β -Mercaptoethanol
0.1 % (w/v)	Bromphenolblau

2.2.3.5 Proteintransfer

Nach der Auftrennung der Proteine, in Abhängigkeit ihrer Größe im elektrischen Feld, wurden sie auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (transferiert, geblottet) und durch hydrophobe Wechselwirkungen immobilisiert. Für diesen elektrophoretischen Transfer wurde eine mit Transfer-Puffer gefüllte Transfer-Kammer von der Firma Biorad verwendet. Das Polyacrylamid-Gel wurde auf die Trägermembran mit einer Porengröße von 0.45 μm (Whatman) gelegt und mit je zwei Lagen Filterpapier ummantelt. Das Filterpapier und auch die Trägermembran mussten zuvor gründlich mit Transferpuffer getränkt werden. Der Elektrotransfer dauerte, bei einer konstanten Stromstärke von 300 mA, 90 min.

Durch eine reversible Proteinfärbung mit Hilfe einer Ponceau S-Lösung konnte die Effektivität des Transfers überprüft werden. Das Entfärben der Membran geschah durch 1 min Inkubation mit TBST.

Transferpuffer:	25 mM	Tris/HCl (pH 7.5)
	192 mM	Glycin
	20 % (v/v)	Methanol

Ponceau S-Lösung:	0.5 % (w/v)	Ponceau S-Pulver
	1 % (v/v)	Eisessig

2.2.3.6 Immundetektion der transferierten Proteine

Die Nitrozellulose-Membran, auf der sich die geblootteten Proteine befanden, wurde für 60 min bei RT mit dem Blockierungs-Puffer-A bzw. Blockierungs-Puffer-B, je nach Abhängigkeit des verwendeten Antikörpers, inkubiert.

Das in dem Blockierungs-Puffer enthaltene BSA sowie das Milchpulver bewirken, dass freie Protein-Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt werden und somit eine unspezifische Bindung des Antikörpers verhindert wird. Nach dem Blockieren der Membran wurde diese mit einer verdünnten Antikörperlösung bei 4°C über Nacht inkubiert (siehe Tabelle 2), worauf sich drei Waschschrte mit TBST für je 10 min anschlossen. Den Waschschrten folgte die Inkubation mit dem verdünnten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 3) und den gleichen Inkubationszeiten wie bei dem Primärantikörper. Daraufhin erfolgten erneut drei jeweils 10-minütige Waschschrte mit TBST.

Zur Detektion der Proteine wurden Sekundärantikörper verwendet, die HRP (horseradish peroxidase) gekoppelt sind. Die HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, bei der Licht (Lumineszenz) freigesetzt wird, welches durch Exposition visualisiert wurde. Durch eine 3 min Zugabe von je 750 µl der Detektionsreagenzien I + II (Immun-Star WesternC Kit, Biorad), bestehend aus Peroxidaselösung und Luminol/Enhancer-Lösung, auf die Nitrozellulose-Membran, wurde diese Reaktion erzeugt.

Nach diesem Arbeitsschritt wurden die Membranen direkt mit dem CCD „Versa Doc-Imaging“ System (Biorad) gescannt und die detektierten Proteinbanden visualisiert.

TBST-Puffer:	100 mM	Tris/HCl (pH 7.5)
	150 mM	NaCl
	0.2 % (v/v)	Tween 20

Blockierungs-	3 % (w/v)	Milchpulver
Puffer A:	1 % (w/v)	BSA
	gelöst in TBST	
Blockierungs-	5 % (w/v)	Milchpulver
Puffer B:	gelöst in TBST	

2.2.4 Statistik

Alle in dieser Arbeit vorgelegten Experimente wurden in drei von einander unabhängigen Versuchen durchgeführt, soweit dies nicht anders vermerkt wurde. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung gekennzeichnet, Abweichungen davon wurden wiederum gesondert aufgeführt. Die Korrelation zwischen dem 3D Zellmorphologietyp und dem Zelllinienursprung (Metastase versus Primärtumor) wurde mit Hilfe des Fishers-Exact-Test des „GraphPad Prism 5 Programms“ (GraphPad Software, Inc.) berechnet. Ebenfalls mit Hilfe dieses Programms wurden die IC_{50} Werte bestimmt und die gepaarten t-Test durchgeführt. Die Berechnung der statistisch signifikant regulierten Gene zwischen 2D und IrECM kultivierten CRC Zellen, welche anhand von „Agilent Human 8x60K High Density Oligonucleotide Microarrays“ identifiziert wurden, erfolgte über den Mann-Whitney-U-Test mit Korrektur für multiples Testen. Alle weiteren Signifikanzberechnungen wurden mit dem Students t-Test ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Wachstumskinetiken der verwendeten Zelllinien

Zunächst wurden Wachstumskinetiken vor Beginn des Versuchsprojekts für jede im Folgenden verwendete Zelllinie erstellt, um eine optimale Versorgung der Zellen gewährleisten zu können. Eine Wachstumskinetik unterteilt sich in drei Phasen: in der sogenannten lag-Phase wachsen die Zellen nur sehr langsam. Darauf folgt die log-Phase, in welcher ein exponentielles Wachstum der Zellen stattfindet. Dieser schließt sich die stationäre Phase an, in der die Kontaktinhibition und der Mangel an essentiellen Nährstoffen im Medium die weitere Zellproliferation verhindern. Die Erstellung der Wachstumskinetiken wurde im Rahmen eines Vorversuchs durchgeführt und anhand ihrer Ergebnisse festgelegt, in welchem Verhältnis die Zellen jeweils verdünnt werden müssen, um sie permanent in der log-Phase zu kultivieren.

Wie in Abbildung 13 graphisch dargestellt dauerte die lag-Phase zwei Tage an, an die sich die log-Phase bis zum Tag sechs für die Zelllinien HT-29, LOVO, COLO 205 sowie COLO-206F, und bis zum Tag acht für die Zelllinie SW-480 und DLD-1, anschloss. Ab Tag sechs bzw. Tag acht ließ das exponentielle Wachstum der Zellen nach und die stationäre Phase begann.

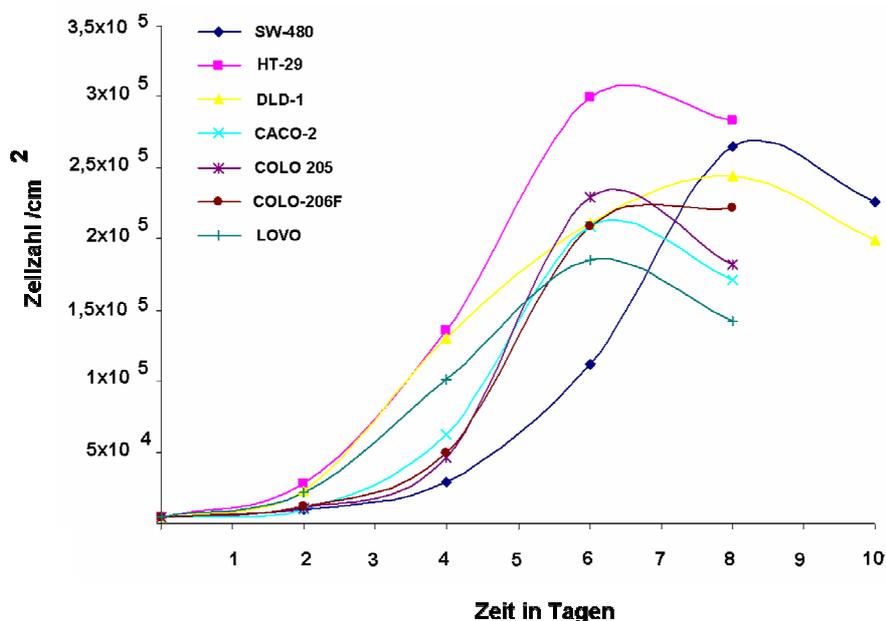


Abbildung 13: Wachstumskinetiken der verwendeten kolorektalen Adenokarzinomzelllinien SW-480, HT-29, DLD-1, LOVO, CACO-2, COLO 205 und COLO-206F. Die Kultivierung der verschiedenen CRC Zelllinien erfolgte über einen Zeitraum von acht bzw. zehn Tagen in 25cm² Kulturgefäßen. Die Ausgangszellzahl betrug 1x10⁵ pro Kulturgefäß. Täglich wurden pro Zelllinie die Zellen zweier Zellkulturgefäße mit Hilfe von Trypsin abgelöst und pro Zellkulturgefäß je drei Aliquots der Zellsuspension mit Hilfe einer Neubauer Kammer ausgezählt. Es folgte die Berechnung der Zellzahl/cm², so dass die lag-, log- und stationäre Phase der Wachstumskinetik ermittelt werden konnte.

3.2 Charakterisierung von 3D Morphologietypen bei CRC Zelllinien

Ein Merkmal aller normalen aber auch malignen epithelialen Zellen ist ihre physiologische Nähe zu und die Interaktion mit der ECM (Cukierman *et al.*, 2002). Dabei fungiert die ECM nicht allein als Barriere für die organisierten epithelialen Zellen (Bissell *et al.*, 2002; Ghajar and Bissell, 2008), vielmehr liefert sie auch bedeutende biochemische Informationen für eine geordnete Zellpolarität, das Zellwachstum (Ghajar and Bissell, 2008) und andere wichtige Vorgänge. Diese Erkenntnis wird bei der Kultivierung von epithelialen Tumorzellen als 2D Kultur auf Plastiksubstrat außer Betracht gelassen. Um von dieser atypischen Kultivierungsmethode Abstand zu nehmen ist es nötig Modelle zu entwickeln, welche eine Rekonstruktion der ECM ermöglichen und somit der *in vivo* Situation ähnelnde Bedingungen zu schaffen. Ein solches Modell konnte von der Arbeitsgruppe um Mina Bissell für das Mammakarzinom erstellt werden und wurde als IrECM „on-top“ Modell benannt (Lee *et al.*, 2007). Neuere Studien an Mammakarzinom Zellen belegen, dass diese Zellen bei Kultivierung in dem IrECM „on-top“ Modell spezifische, reproduzierbare 3D Morphologien ausbilden (Kenny *et al.*, 2007). Für andere Tumorentitäten aber fehlen solche realistischeren Zellkulturmodelle gänzlich, wie z.B. für das CRC, welches weltweit die dritthäufigste Krebserkrankung und die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache darstellt.

Daher bestand die erste Fragestellung der vorliegenden Arbeit darin zu überprüfen, ob humane CRC Zelllinien, die in der IrECM „on-top“ Kultur kultiviert werden, einen reproduzierbaren und für die jeweiligen Zelllinien eigenen 3D Morphologieotyp ausbilden. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob dieser mit dem für das Mammakarzinom erstellten Klassifizierungssystem von Kenny *et al.* (Kenny *et al.*, 2007) klassifiziert werden kann.

Hierfür wurden die verwendeten humanen CRC Zelllinien in dem Matrigel IrECM „on-top“ Assay kultiviert und über einen Zeitraum von zehn Tagen täglich, mit Hilfe der Phasenkontrast-Mikroskopie, visualisiert und dokumentiert. Eine Kultivierung der CRC Zellen in der IrECM, über einen Zeitpunkt von zehn Tagen hinaus, wurde nicht durchgeführt, da sich zu diesem Zeitpunkt die Konsistenz der Matrigel Matrix stark veränderte.

Eine Tumorsphäroid Formation konnte bei allen untersuchten Zelllinien schon zwei Tage nach Kultivierungsbeginn in der IrECM beobachtet werden. Bereits an Versuchstag fünf konnten unterschiedliche Morphologien zwischen den verschiedenen CRC Zelllinien beobachtet werden, die sich auch in mindestens zehn weiteren Versuchsansätzen als reproduzierbar erwiesen. Anhand der Morphologie, die sich in der Phasenkontrast-Mikroskopie zeigte, wurden die Sphäroide nach dem Klassifizierungssystem

von Kenny *et al.* als „Round“, „Mass“ und „Grape-like“ klassifiziert. Die Zelllinie CACO-2 wurde als „Round“ (Abbildung 14 A) klassifiziert. Die Zelllinien SW-480, HT-29 und DLD-1 wurden auf Grund ihres kompakten und ungeordneten Erscheinungsbildes dem „Mass“-Typ zugeordnet (Abbildung 14 B,C,D), COLO 205 (Abbildung 18), COLO-206F (Abbildung 14 E), sowie LOVO (Abbildung 14 F) mit ihrer lockeren, weintraubenartigen Struktur dem „Grape-like“-Typ. Repräsentative Beispiele für die Sphäroid-Morphologien im Phasenkontrast sind in Abbildung 14 dargestellt. Die Zelllinie COLO 205 zeigte in der IrECM „on-top“ Kultur die gleiche Sphäroid-Morphologie wie die Zelllinie COLO-206F. Beide Zelllinien wurden aus dem malignen Aszites des selben Patienten isoliert (Semple *et al.*, 1978). Der obere Abbildungsteil zeigt einen jeweils repräsentativen Ausschnitt eines Monolayers der Zelllinien, wenn sie auf einem Plastiksubstrat kultiviert wurden. Auffällig hierbei war außerdem, dass Zelllinien die eine sehr ähnliche 2D Morphologie aufwiesen, wie z.B. SW-480 und LOVO, zu unterschiedlichen 3D Morphologietypen gehörten (siehe Abbildung 15 B) und auf der anderen Seite Zellen, die zu der gleichen 3D Morphologiekategorie gehörten, eine sehr verschiedene 2D Morphologie besaßen. Ein Beispiel für den letzteren Fall stellen die Zelllinien LOVO und COLO-206F dar (siehe Abbildung 15 A).

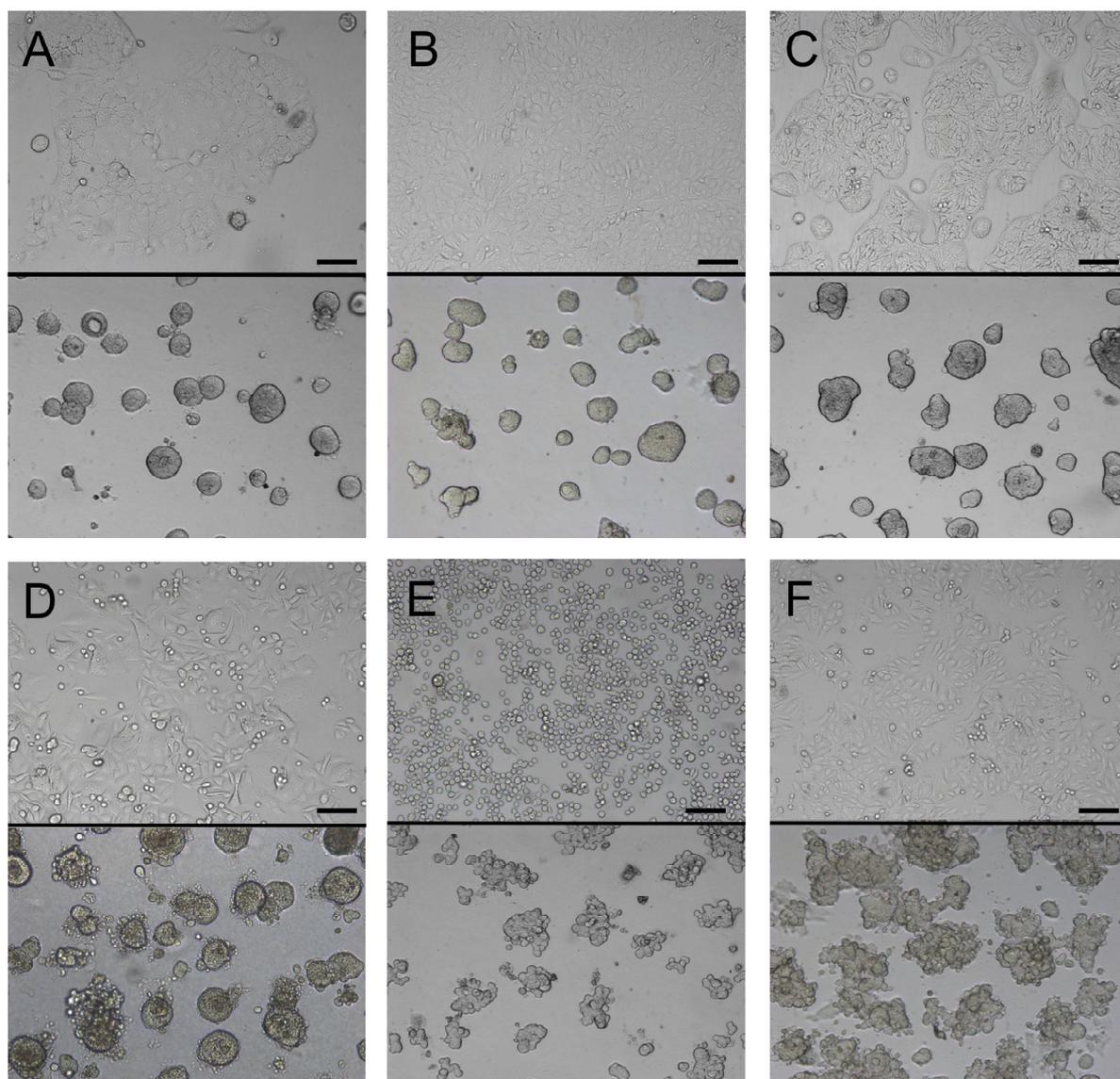


Abbildung 14: Morphologien der analysierten CRC Zelllinien in der 2D bzw. IrECM „on-top“ Kultur. Die Zelllinien CACO-2, DLD-1, HT-29, SW-480, COLO-206F und LOVO wurden als 2D und IrECM „on-top“ Kultur inkubiert. Dargestellt sind repräsentative Phasenkontrast-Aufnahmen nach dreitägiger Inkubation der 2D Kulturen und fünftägiger Inkubation der IrECM „on-top“ Kulturen. Abbildungsteil A) zeigt die Zelllinie CACO-2, B) DLD-1, C) HT-29, D) SW-480, E) COLO-206F und Abbildungsteil F) die Zelllinie LOVO. Der obere Abbildungsteil stellt für jede Zelllinie die Zellmorphologie bei Kultivierung der Zellen im 2D Modell dar, während der untere Abbildungsteil die Sphäroidstrukturen der CRC Zellen im IrECM „on-top“ Modell zeigt. Alle untersuchten Zelllinien bildeten Sphäroidstrukturen in dem IrECM „on-top“ Modell aus. Der eingezeichnete Größenstandard entspricht 100 µm.

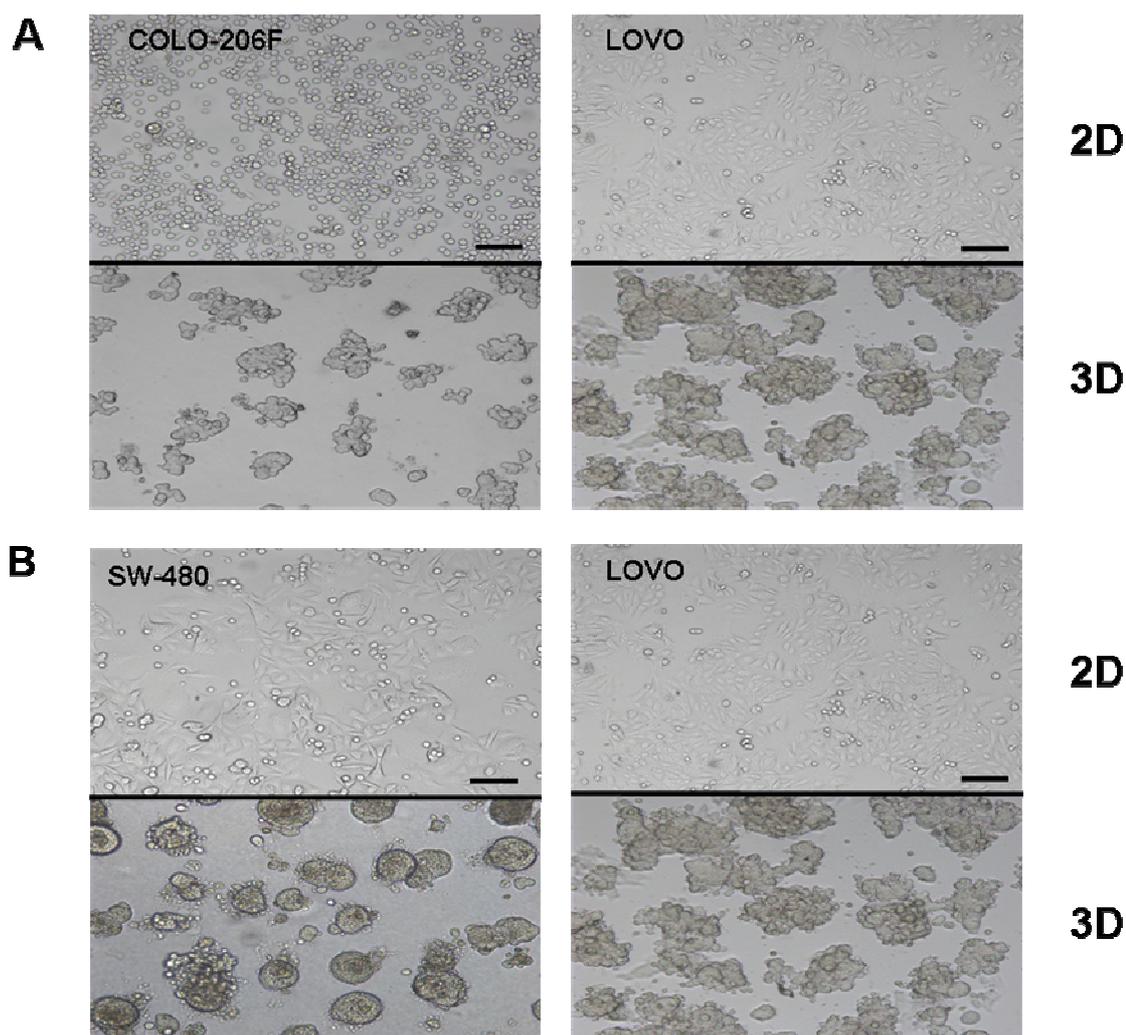


Abbildung 15: Vergleich von Morphologien der 2D und lrECM „on-top“ kultivierten CRC Zelllinien COLO-206F, LOVO und SW-480. Die Kultivierung der analysierten Zelllinien erfolgte über drei Tage in dem 2D Modell und über fünf Tage in der lrECM „on-top“ Kultur. Dargestellt sind repräsentative Phasenkontrast-Aufnahmen der Zelllinien LOVO, SW-480 und COLO-206F. A) Die Zelllinien COLO206-F und LOVO weisen bei Kultivierung in einem 2D System eine sehr unterschiedliche Morphologie auf, bilden jedoch in dem lrECM „on-top“ Modell beide Strukturen des „Grape-like“-Typs aus. B) Die Zelllinien SW-480 und LOVO bilden in dem 2D Modell eine ähnliche Morphologie aus. In der lrECM „on-top“ Kultur weist SW-480 jedoch Strukturen der „Mass“-Morphologie auf, während die Tumorsphäroide der Zelllinie LOVO dem „Grape-like“-Typ angehören. Der eingezeichnete Größenstandard entspricht 100 µM.

Zusätzlich zu den Phasenkontrast-Aufnahmen wurden Immunfluoreszenzfärbungen des Zelloberflächenmoleküls EPCAM, welches auf allen epithelialen CRC Zellen exprimiert wird, angefertigt. Anhand dieser Färbung ist es möglich, die räumliche Verteilung der einzelnen Zellen innerhalb eines Sphäroids zu beurteilen und die Lage der Zellen untereinander zu visualisieren. Außerdem wurde ein zweites Zelloberflächenmolekül untersucht. Hierbei handelt es sich um den EGF-Rezeptor, der außerdem neben EPCAM ebenfalls eine molekulare therapeutische Zielstruktur des CRCs darstellt. Auch die Visualisierung des EGF-Rezeptors ermöglicht einen Einblick über bestehende

Zell-Zell-Kontakte innerhalb des Sphäroids. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskoptechnik visualisiert.

In diesen Versuchen zeigte sich deutlich, dass die Zelllinie CACO-2, die zunächst der „Round“-Kategorie zu geordnet wurde, allerdings eindeutig der „Mass“-Kategorie zu zuordnen war. Sie verfügte wie die Zelllinien HT-29, DLD-1 und SW-480 ebenfalls über disorganisierte Anordnung der Zellkerne, hier mittels DAPI-Färbung in blau dargestellt, und enge Zell-Zell-Kontakte, wie anhand des grün dargestellten Zelloberflächenproteins EPCAM bzw. EGF-Rezeptor ersichtlich ist (Abbildung 16 und Abbildung 17). Hingegen definiert sich der „Round“-Typ durch eine organisierte Anordnung der Nuklei. Die Zuordnung der Zelllinien COLO 205, COLO-206F und LOVO zum „Grape-like“-Typ konnte mittels konfokaler Immunfluoreszenzfärbung (Abbildung 16 und Abbildung 17) bestätigt werden. Diese drei Zelllinien wiesen eine disorganisierte Kernstruktur auf und die Zell-Zell-Kontakte wirkten aufgelockert. Somit besitzen alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten CRC Zelllinien die Fähigkeit, bei Kultivierung in der IrECM, individuelle und reproduzierbare 3D Morphologien auszubilden. Diese Morphologien können dem von Kenny *et al.* erstellten Klassifizierungssystem zugeordnet werden (Kenny *et al.*, 2007), wobei sowohl der „Mass“- als auch der „Grape-like“-Typ nachgewiesen werden konnte. Alle aus Primärtumoren stammenden Zelllinien, SW-480, HT-29, DLD-1 und CACO-2, gehörten dem „Mass“-Typ an und bildeten Sphäroide mit disorganisierten Nuklei und robusten Zell-Zell-Kontakten aus. Hingegen gehörten die aus metastasierenden Zellen isolierten Zelllinien, LOVO, COLO 205 und COLO-206F der „Grape-like“-Morphologie-Klasse an und wiesen ebenfalls eine disorganisierte Nuklestruktur, aber locker wirkende Zell-Zell-Kontakte auf. Die Beobachtung, dass alle aus Primärtumoren stammenden Zelllinien die „Mass“-Morphologie ausbilden, während alle aus Metastasengewebe generierten Zelllinien die „Grape-like“-Morphologie aufweisen, ist nach Berechnung des Fishers-Exact-Tests mit einem Wert von $p=0.028$ statistisch signifikant. Die Kontingenztabelle die für die Berechnung des Fishers-Exact-Tests erstellt wurde ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Kontingenztabelle zur Berechnung des Fishers-Exact-Tests.

	„Grape-like“-Morphologie	„Mass“-Morphologie
Zelllinie generiert aus Metastasengewebe	3	0
Zelllinie generiert aus Primärtumorgewebe	0	4

Anhand der in Abbildung 16 dargestellten Immunfluoreszenzaufnahmen wurde ein weiterer Aspekt, die Kernmorphologie, beurteilt. Bekanntermaßen handelt es sich bei Sphäroiden um sehr kompakte Zellaggregate, bei denen die Anzahl der proliferierenden Zellen zur Sphäroidmitte hin stark abnimmt (Hamilton, 1998; Sutherland, 1988). Dies könnte durch ein apoptotisches Verhalten der Zellen im Inneren des Sphäroids entstehen. Daher wurden die Nuklei der Zellen eines Sphäroids auf charakteristische apoptotische Merkmale, wie die Ausbildung von Mikronuklei und Chromatinkondensation, untersucht. Diese Merkmale konnten allerdings nicht beobachtet werden. Die Morphologie der Zellkerne erscheint homogen.

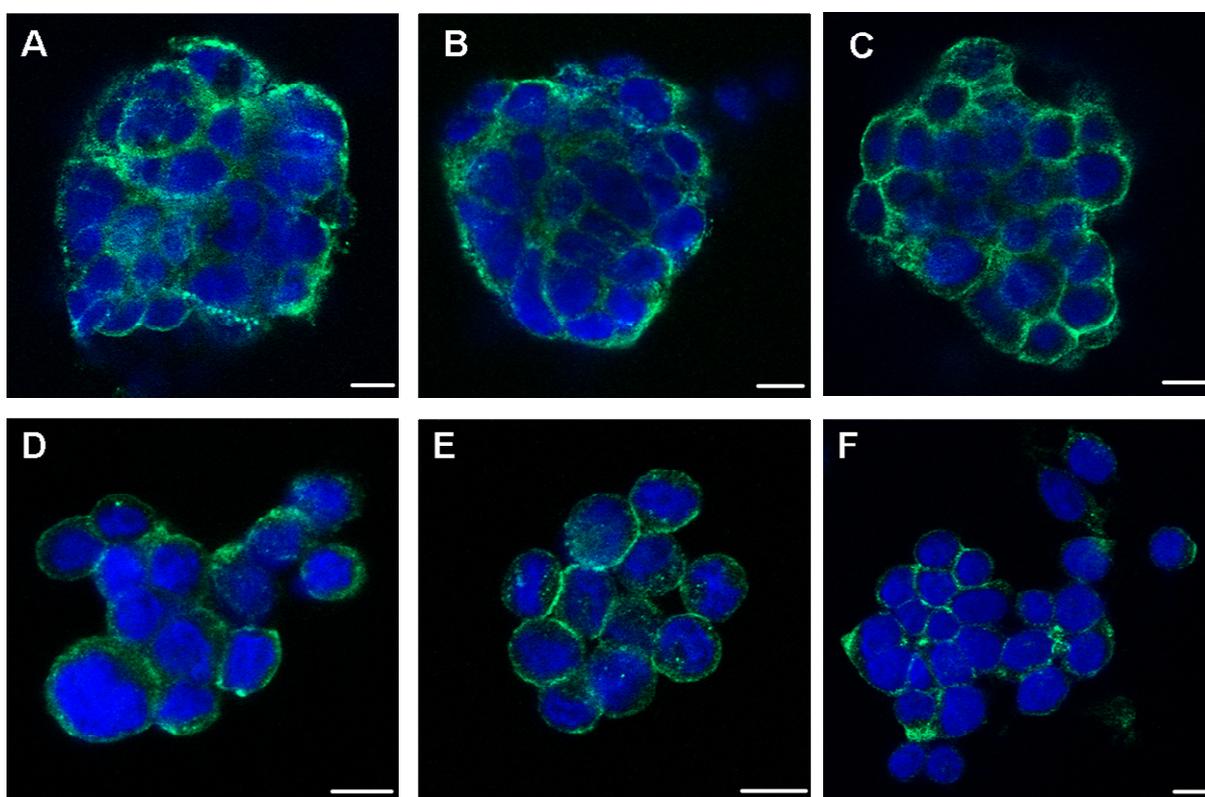


Abbildung 16: Der epitheliale Zelloberflächenmarker EPCAM wird von allen untersuchten CRC Sphäroiden exprimiert. Dargestellt ist die Analyse des epithelialen Oberflächenmarkers EPCAM im konfokalen Laser-Raster-Mikroskop bei Sphäroiden der Zelllinien CACO-2 (A), DLD-1 (B), HT-29 (C), SW-480 (D), COLO-206F (E) und LOVO (F). Die Sphäroide wurden über einen Zeitraum von sieben Tagen im IrECM „on-top“ Modell kultiviert, anschließend aus der Matrix herausgelöst und auf Objektträger übertragen. Nachfolgend wurde das EPCAM Protein mit Hilfe des Ber-EP4 Antikörpers, unter Verwendung des Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse Sekundäntikörpers, angefärbt und im konfokalen Laser-Raster-Mikroskop beurteilt. Die Färbung des EPCAM Proteins ist hier in grün dargestellt. Die Nuklei der Sphäroide wurden mit DAPI angefärbt und sind hier in blau zu sehen. Die Sphäroide der „Grape-like“-Kategorie LOVO, COLO 205 und COLO-206F, weisen lockere Zell-Zell-Kontakte sowie die typische weintraubenartige Struktur auf. Die Sphäroide der Zelllinien SW-480, HT-29, DLD-1 und CACO-2 gehören der „Mass“-Klasse an und weisen eine kompakte Struktur mit dicht gefüllten Sphäroidzentren auf. Ihre Nuklei sind disorganisiert angeordnet. Die Sphäroidstruktur von COLO 205 war identisch zu der von COLO-206F und wird in der Abbildung nicht gesondert aufgeführt. Der eingezeichnete Größenstandard entspricht 10 µm.

Eine weitere Arbeitshypothese bestand darin, dass die Zellen eines Sphäroids, welche einen direkten Kontakt zu der IrECM besitzen, eine veränderte Expression der Zelloberflächenmoleküle EPCAM und des EGF-Rezeptors, gegenüber Zellen die im Inneren des Sphäroids liegen, aufweisen. Wie anhand der membranären, in grün dargestellten Färbung ersichtlich, exprimierten alle untersuchten Tumorsphäroide sowohl den Zelloberflächenmarker EPCAM (siehe Abbildung 16) als auch den EGF-Rezeptor (siehe Abbildung 17). Die Färbintensität innerhalb eines Sphäroids war größtenteils gleich stark, was auf eine gleichmäßige Expression der untersuchten Strukturen innerhalb der Sphäroidstruktur hinweist.

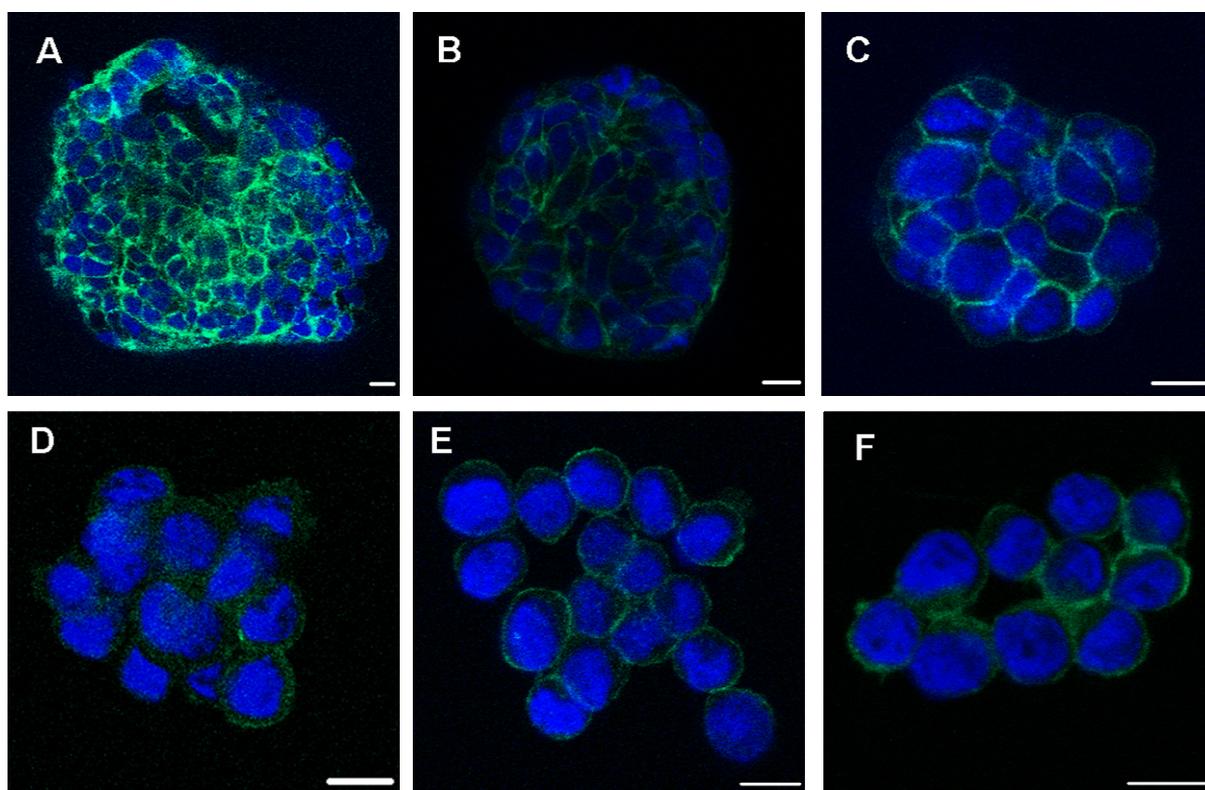


Abbildung 17: Der epitheliale Zelloberflächenmarker EGFR wird von allen untersuchten CRC Sphäroiden exprimiert. Dargestellt ist die Analyse des epithelialen Zelloberflächenmoleküls EGFR im konfokalen Laser-Raster-Mikroskop bei Sphäroiden der Zelllinien CACO-2 (A), DLD-1 (B), HT-29 (C), SW-480 (D), COLO-206F (E) und LOVO (F). Die Kultivierung der Sphäroide erfolgte über einen Zeitraum von sieben Tagen im IrECM „on-top“ Modell. Im Anschluss wurden diese aus der Matrix herausgelöst und auf Objektträger übertragen. Im Folgenden wurde EGFR mit Hilfe des Anti-EGFR Antikörpers unter Verwendung des Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit Sekundäntikörpers angefärbt und im konfokalen Laser-Raster-Mikroskop beurteilt. Die Färbung des EGFR Proteins ist hier in grün dargestellt. Die Nuklei der Sphäroide wurden mit DAPI angefärbt und sind hier in blau zu sehen. Der eingezeichnete Größenstandard entspricht 10 µM.

3.3 Untersuchung zur Rekultivierung von CRC Tumorsphäroiden auf Plastiksubstrat

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Zellen der untersuchten CRC Zelllinien innerhalb weniger Tage in der lrECM „on-top“ Kultur Sphäroide ausbilden, stellte sich die Frage, ob bei der Rekultivierung eines lrECM Tumorsphäroids auf Plastiksubstrat die Zellen wieder ihre herkömmliche 2D Morphologie annehmen, oder ob sie ihre 3D Morphologie beibehalten.

Die Tumorsphäroide wurden aus der lrECM mit Hilfe von Dispase-Lösung herausgelöst, gewaschen, in Kulturmedium aufgenommen und in einer Zellkulturflasche rekultiviert. In Abbildung 18 ist die Rekultivierung auf Plastiksubstraten der Tumorsphäroide COLO 205 und HT-29, stellvertretend für die Morphologietypen „Grape-like“ und „Mass“, über den Zeitraum von sieben Tagen dargestellt. Bis zum Tag drei nach der Isolation aus der lrECM und Überführung in eine Zellkulturflasche wiesen die Sphäroide ihre typische 3D Morphologie auf. Ab dem dritten Tag der Rekultivierung auf Plastiksubstrat begann eine Auflösung der 3D Sphäroidstruktur, einige Zellen wurden bereits wieder adhärent und wuchsen als Monolayer auf dem Plastiksubstrat. Dieser Prozess zog sich in Abhängigkeit der verschiedenen Zelllinien bis zu Tag sechs oder sieben, nach Isolation aus der lrECM und Überführung in eine Zellkulturflasche, hin. Die rekultivierten Zellen wuchsen an Tag sieben wieder komplett als adhärenter Monolayer in der Zelllinien-typischen 2D Morphologie. Nur selten, wie in Abbildung 18 bei COLO 205 ersichtlich, wurden noch vereinzelt Tumorsphäroide beobachtet.

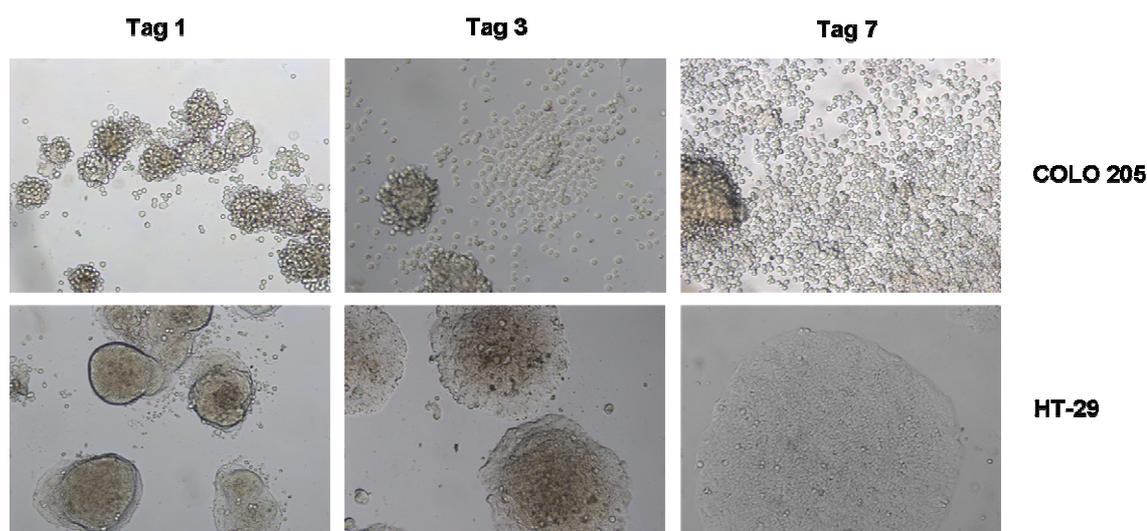


Abbildung 18: Rekultivierung von COLO 205 und HT-29 Tumorsphäroiden auf einem Plastiksubstrat. Die CRC Sphäroide der Zelllinien COLO 205 und HT-29 wurden über einen Zeitraum von sieben Tagen in dem IrECM „on-top“ Modell kultiviert und anschließend mit Hilfe von Dispase-Lösung aus der Matrix herausgelöst und in 25 cm² Kulturgefäße überführt. Dargestellt sind repräsentative Phasenkontrast-Aufnahmen der Rekultivierungsanalyse an den Tagen eins, drei und sieben nach dem Überführen der Tumorsphäroide auf Plastiksubstrat. An Tag eins nach Rekultivierung der Tumorsphäroide aus der IrECM auf Plastiksubstrat weisen die Sphäroide noch ihre typische 3D Morphologie auf. An Tag drei beginnt der Strukturverlust der Sphäroidmorphologie, die Zellen nehmen wieder Kontakt zu dem Plastikuntergrund auf und werden adhärent. An Tag sieben nach der Rekultivierung haben sich die Zellen auf dem Plastiksubstrat wieder als Monolayer ausgebreitet und weisen ihre typische 2D Struktur auf.

3.4 Untersuchung des Migrationsverhaltens von CRC Zelllinien und die Korrelation zum 3D Morphologietyp

In den vorangegangenen Versuchen konnte herausgearbeitet werden, dass die sieben unterschiedlichen CRC Zelllinien im Kontakt zur IrECM zwei divergente Sphäroid-Morphologien - „Mass“ und „Grape-like“- ausbilden, die interessanterweise keinen Rückschluss auf die Morphologie und Wachstumsart der jeweiligen Zelllinie auf Plastiksubstraten erlaubten. Der Befund, dass alle Zelllinien des „Mass“-Phänotyps von Primärtumoren und alle vom „Grape-like“-Typ aus Metastasengewebe generiert wurden, führte zur Arbeitshypothese, dass sich die beiden unterschiedlichen Morphologietypen grundsätzlich in ihrem zellbiologischen Verhalten, wie Migrationsfähigkeit, Invasionspotential und Proliferationsfähigkeit, unterscheiden.

3.4.1 Korrelation der 3D Zellmorphologie und dem Migrationspotential von CRC Zelllinien

Da die Zellmigration eine bedeutende Rolle bei der malignen Progression spielt, wurde zunächst untersucht, ob eine Korrelation zwischen dem migratorischen Potential der untersuchten Zelllinien und der IrECM induzierten Sphäroidmorphologie besteht.

Zunächst wurde die Migrationsfähigkeit der Zelllinien mit Hilfe des sogenannten „Fence“-Assay quantifiziert. Hierfür wurden 1.5×10^4 Zellen in ein 16 mm Stahl-„Fence“ gegeben und bis zu 100 %-iger Konfluenz kultiviert, bevor die „Fences“ entfernt wurden und die Zellen weitere drei Tage kultiviert wurden. Dann wurde die Inkubation beendet, die Zellen gefärbt und die Durchmesser der Zellmonolayer vermessen. Repräsentative Ausschnitte der angefärbten Zellmonolayer sind in Abbildung 19 dargestellt. Bei Betrachtung der angefärbten Zellmonolayer sind bereits Unterschiede in der Fläche des angefärbten Zellrasens sichtbar. So ist die Fläche der Zelllinien LOVO, DLD-1 und CACO-2 deutlich größer als die der übrigen Zelllinien. Um aber eine genaue Beurteilung der Fläche vorzunehmen, wurde diese mit Hilfe des „Versa Doc Programmes Quantity One 4.5.0“ (Biorad) in mm^2 berechnet.

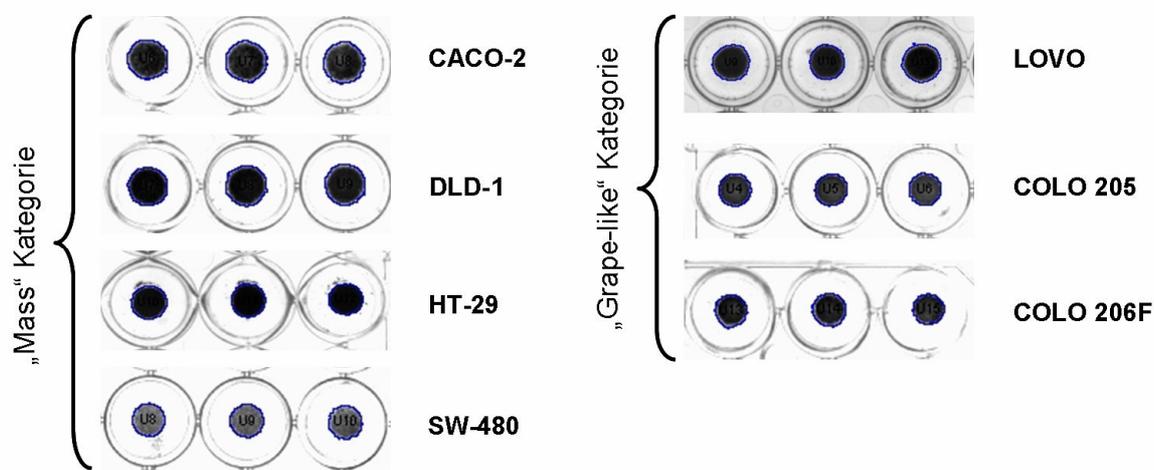


Abbildung 19: Repräsentative Ausschnitte des angefärbten Zellmonolayers eines Migrationsexperimentes der analysierten CRC Zelllinien. Die CRC Zelllinien CACO-2, DLD-1, HT-29, SW-480, LOVO, COLO 205 und COLO-206F wurden bis zu 100 %-iger Konfluenz in sogenannten „Fences“ für 24-well Formate kultiviert. Anschließend wurden diese entfernt, die Zellen weitere drei Tage inkubiert und der Zellmonolayer mit einer Mayershämalaunlösung angefärbt. Pro Zelllinie sind jeweils drei 24-wells dargestellt, in denen sich der angefärbte Zellmonolayer befindet. Dieser wurde mit Hilfe des Versa Doc Programmes „Quantity One 4.5.0“ (Biorad) manuell umrandet und anschließend die Fläche des Monolayers in mm^2 berechnet.

Die berechneten Flächen der Zellmonolayer sind in Abbildung 19 graphisch dargestellt. Das höchste migratorische Potential der untersuchten CRC Zelllinien wies die Zelllinie LOVO auf, während die Zelllinien COLO-206F und COLO 205 die geringste Migrationsaktivität besaßen. Die vermessene und berechnete Fläche lag bei der Zelllinie LOVO bei $171.74 \pm 9.86 \text{ mm}^2$. Das Migrationspotential von LOVO übertraf das von COLO 205 und COLO-206F um einen dreifachen Wert. Die ermittelten Werte von COLO 205 und COLO-206F lagen bei $63.76 \pm 21.16 \text{ mm}^2$ und $72.08 \pm 18.78 \text{ mm}^2$. Das zweithöchste Migrationspotential der untersuchten Zelllinien wurde für die CRC Zelllinie DLD-1 mit einer Fläche von $115.19 \pm 14.60 \text{ mm}^2$ beobachtet, gefolgt von einem Wert von $112.42 \pm 3.78 \text{ mm}^2$ für CACO-2, $89.14 \pm 15.70 \text{ mm}^2$ bei der Zelllinie HT-29 und einer Fläche von $80.21 \pm 5.23 \text{ mm}^2$ für SW-480. Die in Abbildung 20 dargestellten Werte zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung der berechneten Zellmonolayer von drei voneinander unabhängigen Versuchen.

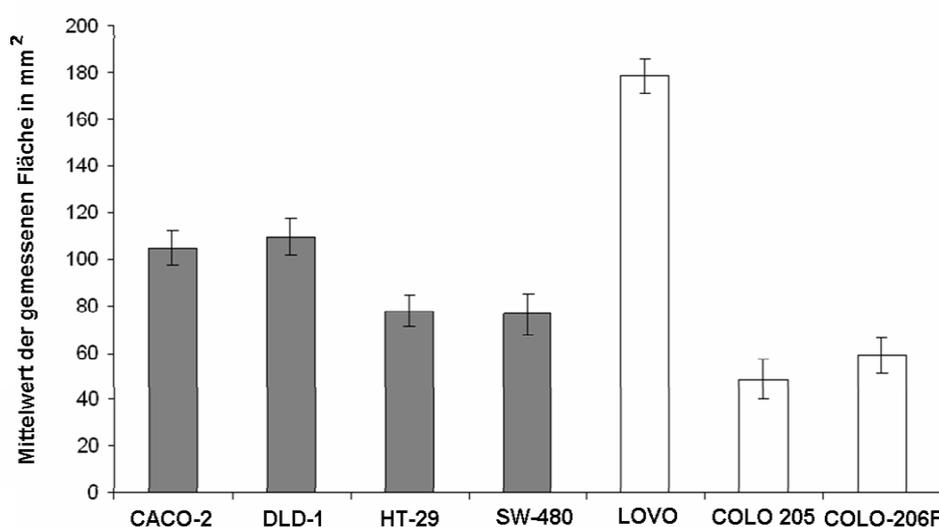


Abbildung 20: Migrationsverhalten der Zelllinien CACO-2, DLD-1, HT-29, SW-480, LOVO, COLO 205 und COLO-206F. Dargestellt ist das Migrationspotential der einzelnen CRC Zellen, welches mittels „Fence“ Experiments quantifiziert wurde. Die Graphik zeigt die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Durchmesser der angefärbten Zellmonolayer in mm^2 von drei voneinander unabhängigen Versuchen. Die Zelllinie LOVO weist mit einer Fläche von $171.74 \pm 9.86 \text{ mm}^2$ das höchste Migrationspotential auf, gefolgt von DLD-1 mit $115.19 \pm 14.60 \text{ mm}^2$, CACO-2 mit $112.42 \pm 3.78 \text{ mm}^2$, HT-29 mit $89.14 \pm 15.70 \text{ mm}^2$ und SW-480 mit $80.21 \pm 5.23 \text{ mm}^2$. Die Zelllinien COLO-206F und COLO 205 weisen mit einer gemessenen Fläche von $72.08 \pm 18.78 \text{ mm}^2$ und $63.76 \pm 21.16 \text{ mm}^2$ die geringste migratorische Aktivität auf.

Da sowohl die Zelllinie LOVO, die das im Vergleich mit den übrigen Zelllinien höchste Migrationspotential besaß, als auch die Zelllinien COLO 205 und COLO-206F mit der geringsten Migrationsaktivität der „Grape-like“-Gruppe angehörten, konnte keine Korrelation zwischen dem 3D Morphologietyp und dem migratorischen Potential einer

Zelllinie beobachtet werden. Die Berechnung des ungepaarten t-Tests ergab mit einem Wert von $p=0.919$ keine statistische Signifikanz für die Korrelation des 3D Morphologietyps mit der Migrationsfähigkeit der entsprechenden Zelllinien.

3.4.2 Korrelation von invasiven Eigenschaften der CRC Zelllinien und ihrer 3D Morphologie

Ein weiteres Kennzeichen von malignen Tumorzellen ist ihr Potential sich aus dem Gewebeverband herauszulösen und in das umliegende Gewebe, das Gefäßsystem, sowie in die vom Primärtumor entfernt liegenden Organe zu invadieren. Dem zu Folge wurde, wie schon für die Migrationsfähigkeit der Zellen, auch das Invasionspotential der CRC Zellen analysiert. Außerdem wurde überprüft, ob eine Korrelation der 3D Morphologietypen und der invasiven Eigenschaft der entsprechenden Zelllinie besteht.

Eine Methode zur Ermittlung der Invasionskapazität von Zellen ist das von Boyden in Jahre 1962 erstmals beschriebene 2-Kammer System (Boyden, 1962). In den durchgeführten 2-Kammer Versuchen wandern die CRC Zellen, welche Invasionskapazität besitzen, entlang eines Nährstoffgradienten, durch eine Matrigel beschichtete, mit $8\ \mu\text{m}$ großen Poren ausgestattete, Membran. Eine folgende Fixierung der Zellen auf der Membran und eine Visualisierung der Zellen mittels Kristallviolett-Färbung ermöglicht die Quantifizierung der invadierten Zellen. Repräsentative Ausschnitte der Membranen eines Invasionsversuches für die Zelllinien CACO-2 und HT-29 sind in Abbildung 21 dargestellt.

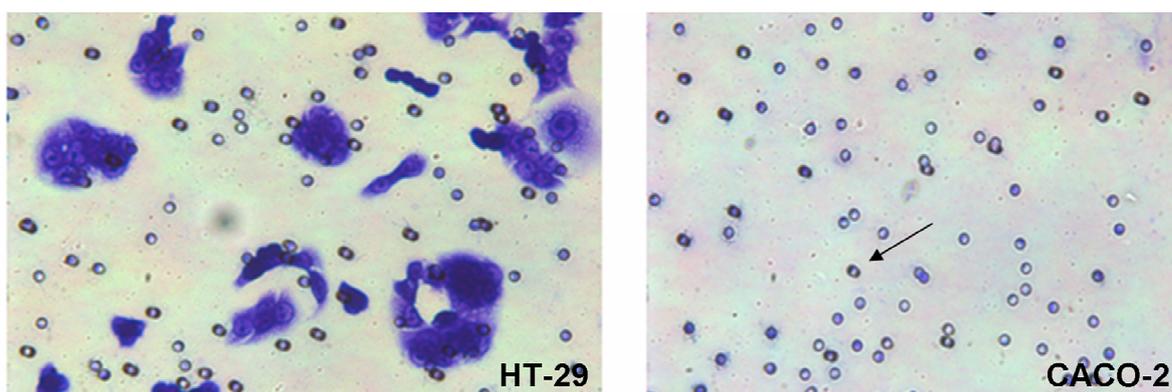


Abbildung 21: Repräsentative Ausschnitte einer Membran eines Boyden 2-Kammer Versuches. Das Invasionspotential der analysierten CRC Zelllinien wurde mit Hilfe des Boyden 2-Kammer Versuches analysiert. Links dargestellt sind die mit Kristallviolett angefärbten Zellen der Zelllinie HT-29 zu sehen, welche durch die Matrigel-Schicht invadiert und durch die Poren der Membran gewandert sind. Auf der rechten Seite ist die Zelllinie CACO-2 dargestellt, welche ein nur sehr geringes Invasionspotential besitzt. Hier sind nur die Poren der Membran sichtbar (siehe Pfeil).

Der Invasionsindex wurde, wie unter 2.2.2.16 beschrieben, berechnet. Die Versuchsauswertung erfolgte über eine Bewertungsskala, die es ermöglicht, die Invasionspotentiale der einzelnen Zelllinien untereinander zu vergleichen. Diese Bewertungsskala ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Bewertungsskala des berechneten Invasionsindex. Der Invasionsindex wurde berechnet und jeder Wert einer bestimmten Bewertungskategorie zugeordnet.

Invasionsindex	Bewertung
>1000	+++++++
>500	+++++
>100	++++
>50	+++
>10	++
>5	+

Die Bewertung des Invasionsindex der untersuchten Zelllinien ist in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Bewertung des Invasionsindex der untersuchten Zelllinien. Grau unterlegt ist die Gruppe der Zellen, die in der IrECM „on-top“ Kultur Strukturen der „Grape-like“-Morphologie ausbildet, während die „Mass“-bildenden Zelllinien weiß hinterlegt sind. Die Zelllinie HT-29 besaß das höchste Invasionspotential, gefolgt von COLO 205, COLO-206F, LOVO, SW-480 und DLD-1. Die Zelllinie mit dem vergleichsweise geringsten Invasionspotential war CACO-2.

Zelllinie	Bewertung
HT-29	+++++++
SW-480	+++
CACO-2	+
DLD-1	++
COLO 205	+++++
COLO-206F	++++
LOVO	+++

Die Zelllinie HT-29 wies mit einem berechneten Invasionsindex von 3178.03 ± 337.48 das höchste Invasionspotential der untersuchten Zelllinien auf und wurde als einzige Zelllinie in die Bewertungskategorie ++++++ eingeteilt. Die Zelllinie COLO 205 fiel mit einem

Invasionsindex von 609.63 ± 237.73 in die Bewertungskategorie +++++ und hatte somit nach HT-29 das zweithöchste invasive Potential der untersuchten Zelllinien. Die Berechnung des Invasionsindex für die Zelllinie COLO-206F ergab einen Wert von 181.48 ± 41.68 , der in die Kategorie ++++ eingeordnet wurde. Der Bewertungskategorie +++ wurden die Zelllinien LOVO und SW480, mit Invasionsindizes von 70.21 ± 59.27 und 83.14 ± 41.08 , zugeordnet. Ein Invasionsindex von 40.95 ± 33.91 wurde für die Zelllinie DLD-1 berechnet, wodurch sie in die Bewertungskategorie ++ eingeteilt wurde. Den geringsten Invasionsindex von 8.90 ± 848.26 wurde für die Zelllinie CACO-2 berechnet, womit sie als einzige Zelllinie in die Bewertungskategorie + fiel.

Eine Korrelation zwischen dem 3D Morphologietyp und der invasiven Eigenschaft einer Zelllinie konnte nicht festgestellt werden, da sowohl die Zelllinie HT-29, die das höchste invasive Potential der untersuchten Zelllinien aufwies, als auch die Zelllinie CACO-2, welche am geringfügigsten invadierte, dem 3D „Mass“-Typ angehören. Die Zelllinien, die „Grape-like“-Strukturen in der IrECM „on-top“ Kultur ausbilden, fielen ebenfalls in unterschiedliche Bewertungsgruppen des Invasionsindex. Dem zu Folge unterschieden sich die beiden 3D Morphologietypen im ungepaarten t-Test mit ein Wert von $p=0.589$ statistisch nicht signifikant in ihrem Invasionspotential. Außerdem erwähnenswert ist die Tatsache, dass die Zelllinie mit dem höchsten Invasionspotential aus einem Primärtumor generiert wurde, die nächst höchsten Invasionspotentiale allerdings für die drei Zelllinien beobachtet wurden, welche aus Metastasen generiert wurden.

Ein weiterer interessanter Aspekt ergab sich bei dem Vergleich der Migrations- bzw. Invasionsfähigkeit der analysierten Zelllinien (siehe Abbildung 20 und Tabelle 14). So wiesen die Zelllinien SW-480 und LOVO, welche beide in die Invasions-Bewertungskategorie +++ fielen, deutliche Unterschiede in ihrem Migrationspotential auf. Andererseits zeigten Zelllinien mit ähnlichem Migrationspotential klare Unterschiede in ihrer Invasionsfähigkeit. Dies war für die Zelllinien HT-29 und SW-480 der Fall. Ebenfalls konnte beobachtet werden, dass Zelllinien mit einem vergleichsweise hohen Migrationspotential, wie CACO-2 und DLD-1, die geringste Invasionsfähigkeit aufwiesen, während die beiden geringfügig migrierenden Zelllinien COLO 205 und COLO-206F zu den Zelllinien gehörten, die ein hohes Invasionspotential besaßen.

3.4.3 Der Zusammenhang zwischen der Zellproliferation und dem 3D Morphologietyp

Die vermehrte Zellproliferation ist ein Kennzeichen eines aggressiven Phänotyps von Tumorzellen. Wie bereits erwähnt, wurden bei den sieben untersuchten CRC Zelllinien im Kontakt zur IrECM zwei divergente Sphäroid-Morphologien - „Mass“ und „Grape-like“-beobachtet. Dabei bildeten die aus metastatischen Zellen generierten Zelllinien die „Grape-like“-Klasse, während aus Primärtumoren stammende Zelllinien in die „Mass“-Kategorie fielen. Daraus entstand die Arbeitshypothese, dass sich die beiden 3D Morphologietypen möglicherweise in ihrer Proliferationsfähigkeit voneinander unterscheiden.

Diese Arbeitshypothese wurde mit Hilfe eines quantifizierbaren MTT-Assays untersucht, der es ermöglicht, die Proliferation der einzelnen Zelllinien unter 2D Kulturbedingungen zu analysieren und gleichzeitig miteinander zu vergleichen. Dabei war wiederum von Interesse, ob eine Korrelation zwischen dem Proliferationsverhalten der untersuchten Zelllinien und ihrem 3D Morphologietyp besteht.

Die zu analysierenden Zelllinien wurden über einen Zeitraum von 48 h auf einem Plastiksubstrat kultiviert, über Nacht mit dem Reagenz MTT inkubiert und 24 h nach MTT-Reagenz Zugabe die Zellproliferation anhand einer Farbreaktion mit Hilfe eines Spektrophometers ermittelt. In Abbildung 22 sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten dargestellt. Die ermittelten Daten sind als absolute Messwerte angegeben, die bei einer Wellenlänge von 540 nm ermittelt wurden.

Wie aus Abbildung 22 ersichtlich, wurde die vergleichbar höchste Zellproliferationsrate für die Zelllinie HT-29 mit einem absoluten Messwert von 1.82 ± 0.20 ermittelt. Geringfügig weniger proliferierte die Zelllinie DLD-1 mit einem absoluten Messwert von 1.65 ± 0.08 , gefolgt von SW-480 mit einer absoluten Proliferationsrate von 1.31 ± 0.05 und CACO-2 mit 1.29 ± 0.03 . Die wiederum nächsthöchste Proliferationsrate wurde für die Zelllinie COLO 205 mit einem Wert von 1.17 ± 0.10 ermittelt. Als die Zelllinien mit der geringsten Proliferationsrate, stellten sich COLO-206F mit einem absoluten Messwert von 0.86 ± 0.05 und LOVO mit einer Proliferationsrate von 0.80 ± 0.04 , dar.

Insgesamt betrachtet proliferierte die Gruppe der Zelllinien, die in der IrECM die „Grape-like“-Morphologie ausbilden, geringfügiger als die Gruppe, die in der IrECM „on-top“ Kultur dem „Mass“-Typen angehören. Dieser Unterschied war wie anhand des ungepaarten t-Test berechnet mit einem Wert von $p= 0.025$ statistisch signifikant.

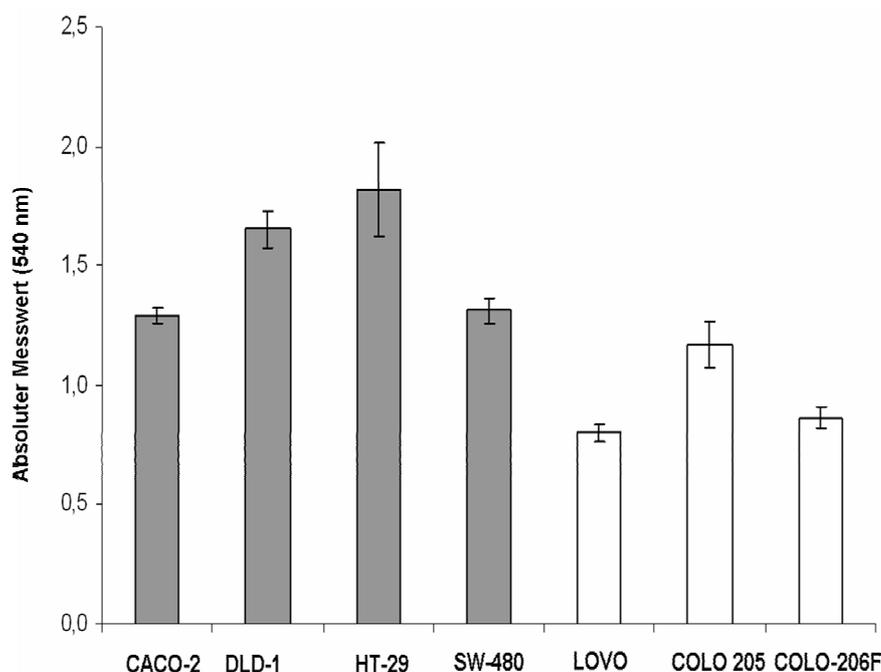


Abbildung 22: Untersuchung der Zellproliferation von CRC Zelllinien bei Kultivierung auf Plastiksubstrat. Die Zelllinien wurden über einen Zeitraum von 48 h kultiviert und anschließend die Zellproliferation mittels MTT-Assays quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der absoluten Messwerte, bei einer Wellenlänge von 540 nm, von drei voneinander unabhängigen Versuchen. Die höchste Zellproliferationsrate wurde bei der Zelllinie HT-29 detektiert. Die übrigen Zelllinien des 3D „Mass“-Morphologietyps (hier in grau dargestellt) wiesen eine etwas geringere Zellproliferation auf. Die drei Zelllinien des 3D „Grape-like“-Morphologietyps (hier in weiß dargestellt) wiesen die geringsten Proliferationsraten der untersuchten Zelllinien auf.

3.5 Der Einfluss der ECM auf die Zellproliferation

Die Zellproliferation in der 2D Zellkultur wurde bereits, wie unter 3.4.3 beschrieben, analysiert. Nun stellte sich die Frage, inwieweit sich die Zellproliferation der CRC Zelllinien unterscheidet, wenn sie in der IrECM kultiviert werden. Ein weiterer interessanter Aspekt bestand darin zu überprüfen, ob eine Korrelation zwischen dem 3D Morphologietyp und der Zellproliferation in der IrECM „on-top“ Kultur besteht.

Diese Fragestellungen wurden mittels MTT-Assays analysiert. Hierfür wurden die zu untersuchenden Zellen entweder in einer 2D Kultur auf einem Plastiksubstrat, oder in dem IrECM „on-top“ Modell, über einen Zeitraum von 48 h kultiviert. Anschließend erfolgte die Zugabe des MTT-Reagenzes, der sich 24 h nach dieser Zugabe eine Messung der Proliferationsrate im Spektrophotometer anschloss. In Abbildung 23 sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung in Prozent von drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchsansätzen dargestellt. Die Proliferation einer Zelllinie in der 2D Zellkultur wurde als 100 % betrachtet und in Abhängigkeit dazu die Proliferationsrate der Zelllinie in der IrECM „on-top“ Kultur berechnet. Es zeigte sich, dass im Vergleich zu den auf Plastiksubstrat

kultivierten Zellen die Zellproliferation aller im lrECM „on-top“ Modell kultivierten Zellen signifikant reduziert war. Die Berechnung des ungepaarten t-Tests ergab einen Wert von $p=0.001$. Die Zellproliferation war insgesamt zwischen 10-30 % in der lrECM „on-top“ Kultur gegenüber der Proliferation in dem 2D Zellkulturmodell reduziert. Die Anzahl der Sternchen über den Diagrammsäulen gibt jeweils an, wie häufig dieser Unterschied innerhalb der drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchsreihen signifikant war. Somit waren drei von drei Ansätzen statistisch signifikant für die Zelllinien DLD-1, HT-29 und SW-480. Zwei aus drei Versuchsdurchläufen zeigten statistisch signifikante Werte von $p<0.05$ für die Zelllinien CACO-2, LOVO und COLO206-F, während nur ein Versuchsansatz für die Zelllinie COLO 205 statistisch signifikant war. Es fiel auf, dass die Zellproliferation in der lrECM „on-top“ Zellkultur der „Grape-like“-Struktur-bildenden Zelllinien, gegenüber der „Mass“-Gruppe, geringfügiger reduziert war.

Somit kann zum einen festgehalten werden, dass Zellen, die in lrECM kultiviert werden, weniger stark proliferierten als bei einer Kultivierung auf einem Plastiksubstrat. Zum anderen zeigte sich, dass diese verminderte Proliferation bei Zellen, die der „Grape-like“-Gruppe angehören, weniger stark ausgeprägt war, wobei dieser Effekt allerdings im ungepaarten t-Test mit einem Wert von $p=0.097$ keine statistische Signifikanz aufwies.

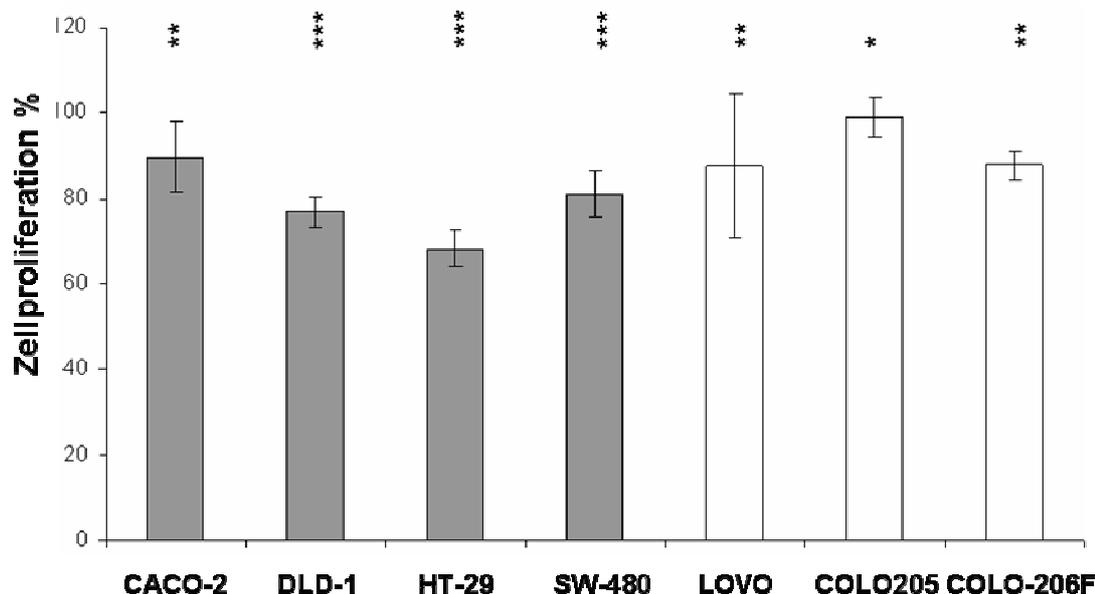


Abbildung 23: Untersuchung des Einflusses der lrECM auf die Zellproliferation. Die Untersuchung der Zellproliferation erfolgte mittels MTT-Assays nach 48 h Kultivierung der Zelllinien CACO-2, DLD-1, HT-29, SW-480, LOVO, COLO 205 und COLO-206F im 2D bzw. lrECM „on-top“ Modell. Die Proliferationsrate einer Zelllinie in der 2D Kultur wurde als 100 % festgelegt und anhand dessen die prozentuale Proliferation der entsprechenden Zelllinie in dem lrECM „on-top“ Modell berechnet. Alle analysierten Zelllinien wiesen in der lrECM „on-top“ Kultur eine geringere Proliferation als bei einer 2D Kultivierung auf. Die Anzahl der Sternchen gibt an, bei wie vielen der drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimente die Zellproliferation in der lrECM „on-top“ Kultur, gegenüber der 2D Kultur, statistisch signifikant vermindert vorlag.

3.6 Die differenzielle Genregulation zwischen 2D und lrECM „on-top“ kultivierten Zellen

Die Tatsache, dass die untersuchten CRC Zelllinien verschiedene Tumorsphäroid Strukturen in der Kultur des lrECM „on-top“ Modells bilden und eine unterschiedliche Proliferationsrate zwischen den beiden Kulturmodellen beobachtet wurde, ließ vermuten, dass diesen Prozessen auch Unterschiede in der Genexpression zugrunde liegen. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden die mRNA Level von Genen, die an zellulären Prozessen wie der Zellproliferation und der Zelladhäsion beteiligt sind, untersucht. Zu diesen Genen gehörten *CDH1*, *CTNNB1*, *MKI67*, *ITGB1*, *EPCAM* und *EGFR*. Die beiden letzteren Gene stellen außerdem molekulare, therapeutische Zielstrukturen in der Anti-Tumor Therapie von Patienten mit CRC dar. Die Expression der mRNA-Level von drei unabhängigen biologischen Replikaten wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht. In Abbildung 24 ist die „Fold change“ Änderung der mRNA-Expressionslevel der untersuchten Gene in lrECM „on-top“ kultivierten Zellen, gegenüber dem Expressionsniveau von Zellen aus entsprechenden 2D Kulturen, dargestellt. Die Betrachtung der Ergebnisse von drei unabhängigen biologischen Replikaten zeigt für die meisten untersuchten Gene bei der Mehrheit der analysierten Zelllinien keinen generellen Anstieg bzw. Reduktion der mRNA Expression. Allein die Expression von *ITGB1* ist in allen lrECM „on-top“ kultivierten Zelllinien gegenüber den 2D kultivierten Zelllinien vermindert. Die Expression von *EPCAM* ist, mit der Ausnahme der Zelllinie LOVO, in ebenfalls allen lrECM „on-top“ kultivierten Zelllinien reduziert.

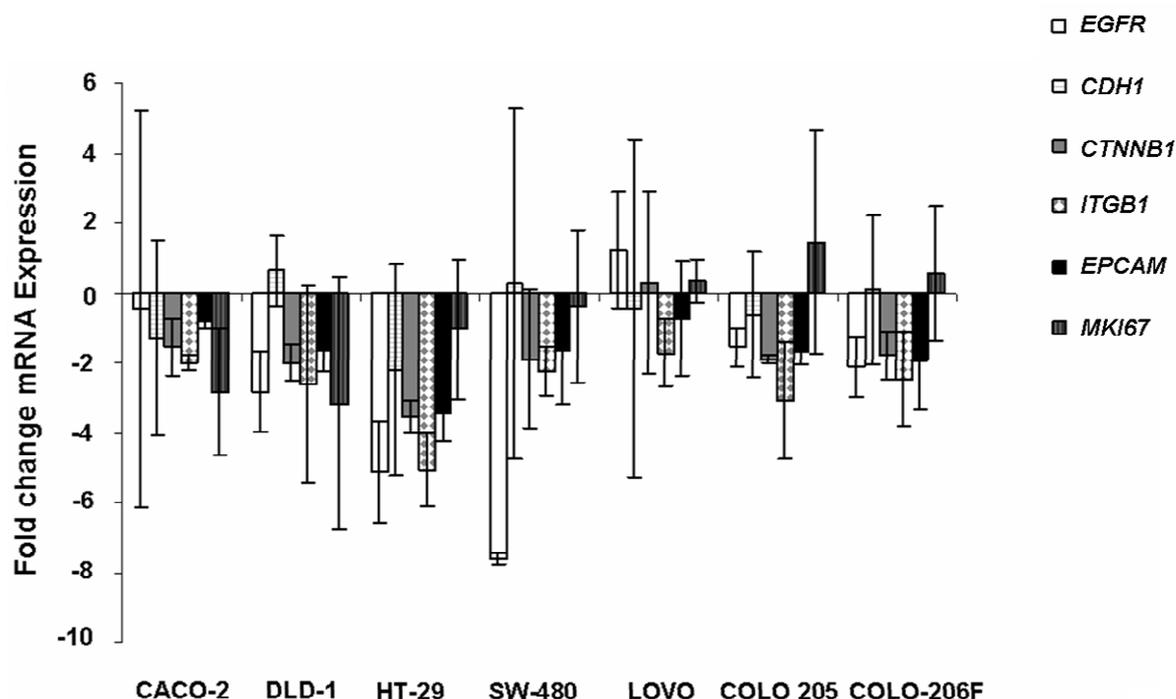


Abbildung 24: Veränderung der Genexpression von IrECM „on-top“ kultivierten CRC Zelllinien gegenüber 2D kultivierten Zellen. Dargestellt ist die mRNA Expression der Gene *EGFR*, *CDH1*, *CTNNB1*, *ITGB1*, *EPCAM* und *MKI67* in den Zelllinien CACO-2, DLD-1, HT-29, SW-480, LOVO, COLO 205 und COLO-206F. Hierfür wurde totale RNA von 2D und IrECM „on-top“ kultivierten Zellen in cDNA transkribiert und die Expression der Gene, mittels quantitativer RT-PCR, analysiert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Analysen. Die Genexpression von IrECM „on-top“ kultivierten Zellen gegenüber 2D kultivierten Zellen war für fast alle untersuchten Gene bei den meisten Zelllinien vermindert. Eine Ausnahme hiervon wurde für *MKI67* beobachtet, welches in den Zelllinien LOVO, COLO 205 sowie COLO-206F leicht erhöht exprimiert wurde.

Um die erzielten Ergebnisse der quantitativen RT-PCR übersichtlicher darzustellen, wurde eine „Heatmap“ angefertigt, in der eine Verminderung bzw. eine Zunahme der Genexpression farblich darstellt wird. Während die blauen Felder eine Herabregulation des untersuchten Gens in der IrECM „on-top“ Kultur gegenüber der 2D Kultur darstellen, markieren die rötlichen Felder einen Anstieg an mRNA Kopien des entsprechenden Gens. Die zunehmende Farbintensität zeigt dabei die Höhe der Ab- bzw. Zunahme an mRNA Kopien an. Grundlage dieser „Heatmap“ sind die ermittelten Mittelwerte der drei unabhängigen biologischen Replikate.

Wie aus Abbildung 25 ersichtlich, wurden die meisten untersuchten Gene, in den Zellen aus der IrECM „on-top“ Kultur gegenüber denen die auf Plastiksubstrat kultiviert wurden, reduziert exprimiert. Die Änderung der Expression reichte dabei von einer einfach reduzierten Expression bis hin zu einer über fünffach reduzierten Expression, wie z.B. die Expression von *EGFR* in der CRC Zelllinie SW-480 zeigte. Ausnahmen hierbei stellten die Zelllinien DLD-1, SW-480, und COLO-206F dar, bei denen eine einfache Zunahme der

Expressionsstärke von *CDH1* ermittelt wurde. Des Weiteren wurden die Gene *CTNNB1* und *EGFR* in der Zelllinie LOVO in der lrECM „on-top“ Kultur stärker exprimiert als in Zellen, die in dem 2D Modell kultiviert wurden. Der Proliferationsmarker *MKI67* wurde in den Zelllinien die dem „Grape-like“ Morphologietyp angehören, namentlich LOVO, COLO 205 und COLO-206F, in den Zellen, welche im lrECM „on-top“ Modell kultiviert wurden, stärker exprimiert als in den Zellen, die auf Plastiksubstrat kultiviert wurden. Die Zelllinien, die der 3D „Mass“-Kategorie angehören, wiesen wiederum eine verringerte Expression von *MKI67* in lrECM „on-top“ kultivierten Zellen auf.

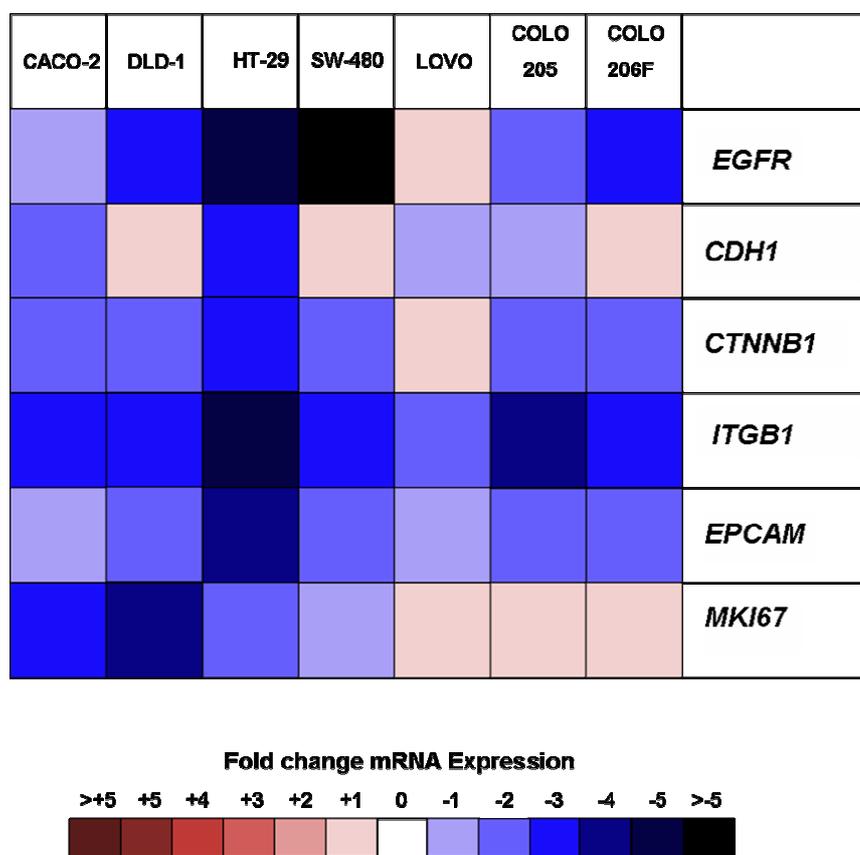


Abbildung 25: Genexpression von CRC Zelllinien in 2D und lrECM „on-top“ Kulturen. Die mRNA Expression der Gene *EGFR*, *CDH1*, *CTNNB1*, *ITGB1*, *EPCAM* und *MKI67* der Zelllinien CACO-2, DLD-1, HT-29, SW-480, LOVO, COLO 205 und COLO-206F wurde mittels quantitativer RT-PCR ermittelt. Die relative Herabregulation der mRNA Expression eines Gens in der lrECM „on-top“ Kultur gegenüber der 2D Kultur ist in blauen Farbtönen dargestellt, während ein Anstieg des mRNA Levels in rot dargestellt ist. Die mRNA Level der meisten untersuchten Gene waren bei fast allen Zelllinien in der 3D Kultur herunterreguliert. Eine Ausnahme davon stellte das Gen *MKI67* dar, welches in den „Grape-like“-Sphäroid-bildenden Zelllinien leicht erhöht exprimiert wurde. Die Farbkodierung beruht auf Mittelwerten von drei unabhängigen Analysen.

3.7 Untersuchung zur Proteinexpression in 2D und lrECM „on-top“ kultivierten Zellen

Um zu überprüfen, ob die differentielle Genexpression, die zwischen Zellen, welche in den verschiedenen Zellkulturmodellen kultiviert wurden, auch Auswirkungen auf die Proteinexpression hat, wurden komparative Western Blot Analysen durchgeführt. Hierfür wurden Gesamt-Proteinextrakte aus 2D und lrECM „on-top“ kultivierten Zellen isoliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt, nach der Auftrennung durch einen Proteintransfer auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mittels Immunodetektion detektiert.

Abbildung 26 stellt eine repräsentative Auswahl der durchgeführten Western Blot Analysen dar. Die erwarteten, kalkulierten Proteinbanden liegen bei 175 kDa für EGFR, 135 kDa für E-cadherin und 92 kDa für β -catenin. Für die Proteine EPCAM und Integrin β 1 wurden jeweils Doppelbanden erwartet, die bei 36 kDa sowie 40 kDa für das Protein EPCAM und 115 kDa und 135 kDa für das Protein von Integrin β 1 liegen. Die in Abbildung 26 dargestellten Ergebnisse zeigten, bis auf einige Ausnahmen, die erwarteten Proteinbanden und eine differentielle Proteinexpression zwischen den Zellen der verschiedenen Zellkulturmodelle.

Wie auch schon für die mRNA Expression dargestellt, wurden die meisten untersuchten Proteine in den Zellen, die aus einer lrECM „on-top“ Kultur stammen, vermindert exprimiert, die Bandenintensität war dort deutlich schwächer. Zum Beispiel zeigte sich bei den Zelllinien CACO-2 und COLO 205 jeweils eine deutliche, dicke Bande für EGFR in den Zellen aus der 2D Kultur, wohingegen nahezu keine Proteinbande für das entsprechende Protein in den Zellen, die in dem lrECM „on-top“ Modell kultiviert wurden, ersichtlich war. Die Ausnahme stellte die Expression von β -catenin dar, welches auf der Proteinebene in den Zellen beider Kulturmodelle gleich stark exprimiert wurde (siehe Abbildung 26).

Des Weiteren wurden für EPCAM und Integrin β 1 bei allen untersuchten Zelllinien ein verändertes Muster der erwarteten Proteinbanden beobachtet. Wie bereits erwähnt, wurden für diese Proteine jeweils zwei Banden erwartet. Bei der Detektion von Integrin β 1 zeigten sich diese Banden allerdings nur bei den 2D kultivierten Zellen, während sich bei den Proteinextrakten, die von Zellen aus dem lrECM „on-top“ Modell isoliert wurden, nur die untere, kleinere Bande von 115 kDa detektieren ließ. Diese beiden Proteinbanden wurden von Bellis *et al.* als die glykosylierte sowie die nicht-glykosylierte Isoform des Integrin β 1 Proteins beschrieben (Bellis, 2004). Eine ähnliche Beobachtung wurde für das EPCAM

Protein getätigt. Mit der Ausnahme von CACO-2 wurde in allen 2D Kulturen eine starke Bande bei 40 kDa und eine schwächere Bande bei 36 kDa beobachtet, wohingegen in den IrECM „on-top“ Kulturen die stärkere Bande bei 36 kDa ersichtlich war und die 40 kDa Bande nur sehr schwach, wenn überhaupt detektiert wurde. Munz *et al.* beschreiben die 40 kDa Bande als die glykosylierte Variante des EPCAM Proteins, während die Proteinbande von 36 kDa die nicht-glykosylierte Variante darstellt (Munz *et al.*, 2008).

Der unterste Teil der Abbildung 26 stellt die Proteindetektion des Referenzproteins β -actin mit einer Bande von 42 kDa dar, wodurch anhand der vergleichbar starken Banden ersichtlich wird, dass gleiche Mengen an Protein verwendet wurden.

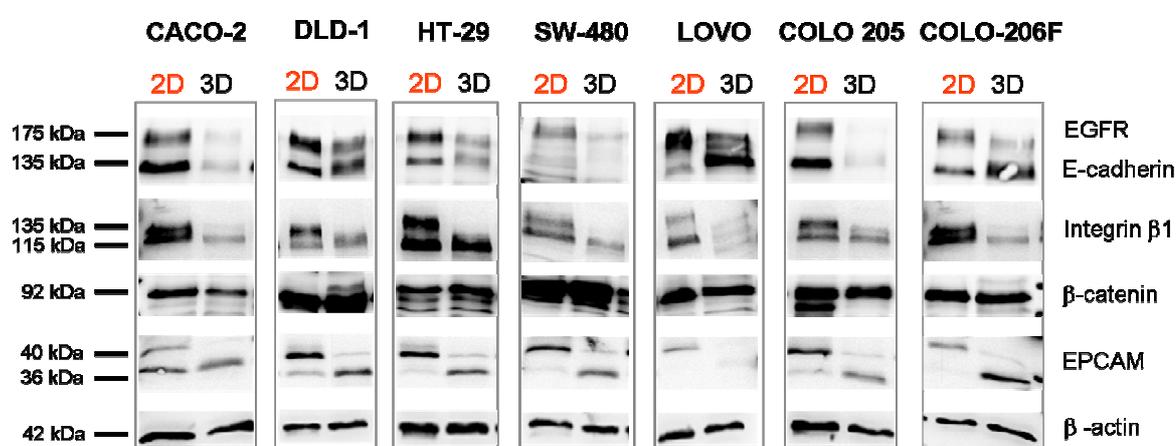


Abbildung 26: Komparative Western Blot Analyse von Proteinextrakten der 2D und IrECM „on-top“ kultivierten CRC Zelllinien CACO-2, DLD-1, HT-29, SW-480, LOVO, COLO 205 und COLO-206F. Jeweils 40 μ g Gesamtprotein wurde auf 6-12 %-igen Polyacrylamid Gelen aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mit spezifischen Antikörpern gegen EGFR, E-cadherin, Integrin β 1, β -catenin und EPCAM detektiert. Die Expression der untersuchten Proteine ist in den IrECM „on-top“ kultivierten Zellen, wie anhand der Bandenintensität ersichtlich, deutlich schwächer als in den 2D kultivierten Zellen. Für die Proteine Integrin β 1 und EPCAM wurde ein differentielles Bandenmuster zwischen den beiden Kulturmodellen nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente β -actin.

3.8 Integrinexpression und Lokalisation in 3D CRC Sphäroiden

Integrine sind wichtige Heterodimer-Rezeptoren, die aus einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut sind (Hynes, 2002). Sie vermitteln die Anhaftung einer Zelle an ihr angrenzendes Umfeld, welches Zellen oder die ECM sein können. Außerdem spielen Integrine eine maßgebliche Rolle bei diversen Zellsignalwegen und bestimmen damit unter anderem die zelluläre Form, die Zell-Mobilität und regulieren den Zellzyklus. In Zusammenarbeit mit anderen Proteinen wie Cadherinen, Zelladhäsionsmolekülen oder Selektinen vermitteln die Integrine Zell-Matrix und Zell-Zell-Kommunikationen, indem sie an Zelloberflächen oder Komponenten der ECM wie Laminin, Kollagen, Fibronectin und Vitronectin binden (Kim *et*

al., 2011). Einer der Rezeptoren von Laminin ist unter anderem Integrin $\alpha 6 \beta 1$ (Scheele *et al.*, 2007). Integrine werden außerdem aufgrund ihrer Eigenschaften als neue, potentielle molekulare Zielstrukturen in der Anti-Tumorthherapie betrachtet (Cox *et al.*, 2010).

Daher sollte die Expression von Integrin $\alpha 6 \beta 1$ und seine räumliche Expression in den CRC Tumorsphäroiden analysiert werden.

Zur Analyse der Expression der Integrine wurden totale Proteine aus 2D und lrECM „on-top“ kultivierten Zellen isoliert und 40 μ g Gesamtprotein mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Auftrennung folgte ein Proteintransfer auf eine Nitrozellulose-Membran und eine Proteindetektion mittels spezifischer Antikörper.

Wie in Abbildung 27 dargestellt, wiesen alle untersuchten Zellen eine Proteinbande für das Protein Integrin $\alpha 6$ in der erwarteten Größe von 119 kDa auf. Es zeigte sich eine differenzielle Regulation von Integrin $\alpha 6$ zwischen 2D und lrECM „on-top“ kultivierten Zellen. Vergleichsweise wurde das Protein in der lrECM „on-top“ Zellkultur, wie anhand der geringfügigeren Bandenintensität ersichtlich, schwächer als in Zellen des 2D Modells exprimiert. Besonders deutlich ist die reduzierte Expression von Integrin $\alpha 6$ in der lrECM „on-top“ Kultur bei den Zelllinien SW-480, HT-29, LOVO und COLO 205 zu sehen, aber auch die übrigen Zelllinien weisen eine intensivere Proteinbande in der 2D Kultur auf. Die gleichmäßige Proteinbande der Ladekontrolle β -actin belegt, dass vergleichbare Proteinmengen eingesetzt wurden. Die differentielle Expression des Proteins Integrin $\beta 1$ wurde bereits unter 3.7 beschrieben und in Abbildung 26 dargestellt.

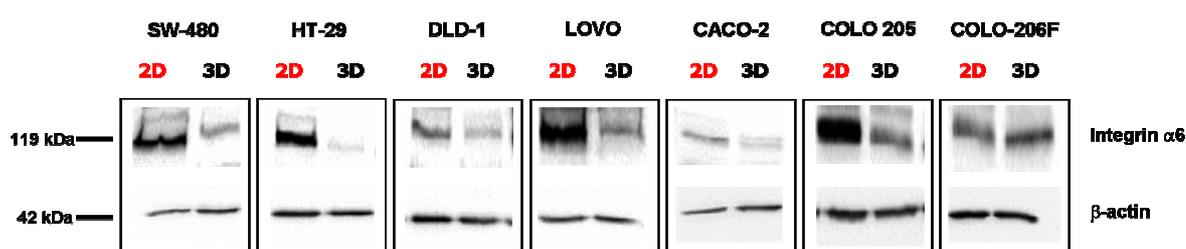


Abbildung 27: Komparative Western Blot Analyse von Integrin $\alpha 6$ in CRC Sphäroiden und 2D kultivierten Zellen. Die Zelllinien SW-480, HT-29, DLD-1 LOVO, CACO-2, COLO 205 und COLO-206F wurden als 2D Kultur bzw. lrECM „on-top“ Kultur inkubiert und anschließend das Gesamtprotein isoliert. In Folge wurden 40 μ g Gesamtprotein elektrophoretisch auf einem 10 %-igen Polyacrylamid Gel aufgetrennt und das Protein Integrin $\alpha 6$ mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Alle 2D kultivierten CRC Zelllinien exprimieren das Protein deutlich stärker als lrECM „on-top“ kultivierte CRC Zelllinien. Als Ladekontrolle wurde β -actin verwendet. Die gleichmäßige Proteinbandenstärke von β -actin belegt, dass gleiche Mengen an Protein verwendet wurden.

Die räumliche Expression der Integrine wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Die Darstellung dieser Färbungen erfolgte mittels konfokaler

Laser-Raster-Mikroskopie, bei der die Tumorsphäroide in Schnittdicken von 0.5 μm durchgescannt wurden. Repräsentative Aufnahmen der Integrin $\alpha 6$ Färbung an CRC Tumorsphäroiden sind in Abbildung 28 dargestellt. Anhand der in grün dargestellten Färbung des Integrin $\alpha 6$ Proteins ist zu erkennen, dass das Protein bei allen Tumorsphäroiden gleichmäßig in dem Sphäroid im Zytoplasma der Zellen exprimiert wird. Die Nuklei sind mittels DAPI-Färbung bläulich dargestellt.

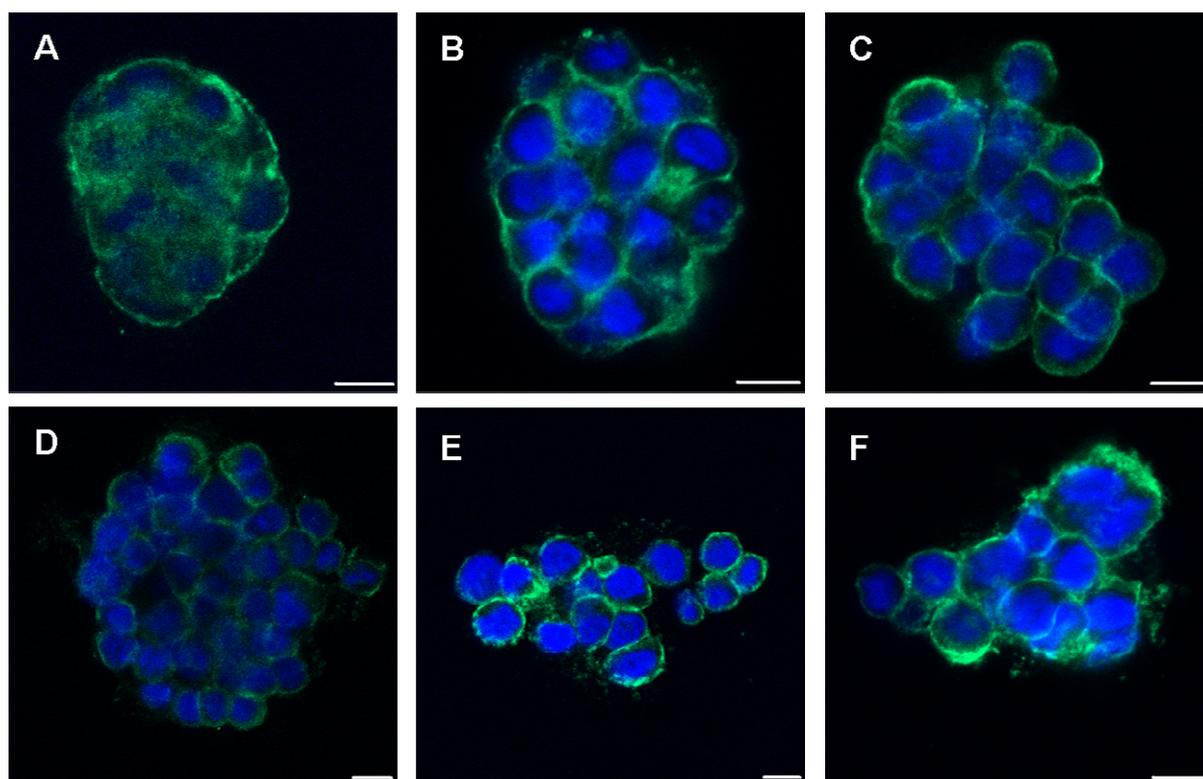


Abbildung 28: Untersuchung der Expression und räumlichen Verteilung von Integrin $\alpha 6$ in CRC Sphäroiden mittels Immunfluoreszenzfärbung und konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie. Dargestellt ist die Analyse von Integrin $\alpha 6$ im konfokalen Laser-Raster-Mikroskop bei Sphäroiden der Zelllinien CACO-2 (A), DLD-1 (B), HT-29 (C), SW-480 (D), COLO 205 (E) und LOVO (F). Die Kultivierung der Sphäroide erfolgte über einen Zeitraum von sieben Tagen im IrECM „on-top“ Modell. Im Anschluss wurden diese aus der Matrix herausgelöst und auf Objektträger übertragen. Im Folgenden wurde Integrin $\alpha 6$, mit Hilfe des Anti-Integrin $\alpha 6$ Antikörpers unter Verwendung des Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rat Sekundärantikörpers, angefärbt und im konfokalen Laser-Raster-Mikroskop beurteilt. Die Integrin $\alpha 6$ Färbung ist hier in grün dargestellt. Die Nuklei der Sphäroide wurden mit DAPI angefärbt und sind in blau zu sehen. Der eingezeichnete Größenstandard entspricht 10 μm .

Auch die Expression von Integrin $\beta 1$ konnte, wie in Abbildung 29 dargestellt, in allen untersuchten CRC Tumorsphäroiden nachgewiesen werden. Wiederum anhand der grünlichen Färbung dargestellt ist das Protein Integrin $\beta 1$, welches in allen Tumorsphäroiden exprimiert wurde, allerdings in verschiedenen Ausmaßen. Am geringsten wurde das Protein in den Sphäroiden der Zelllinien CACO-2 und LOVO exprimiert, die grünliche Farbintensität ist deutlich schwächer als bei den übrigen Tumorsphäroiden. Dieses Ergebnis steht auch im

Einklang mit dem Proteinnachweis von Integrin $\beta 1$ in der Western Blot Analyse (siehe Abbildung 26). Die Nuklei der Sphäroid-bildenden Zellen sind wiederum mittels DAPI Färbung in blau dargestellt (siehe Abbildung 29).

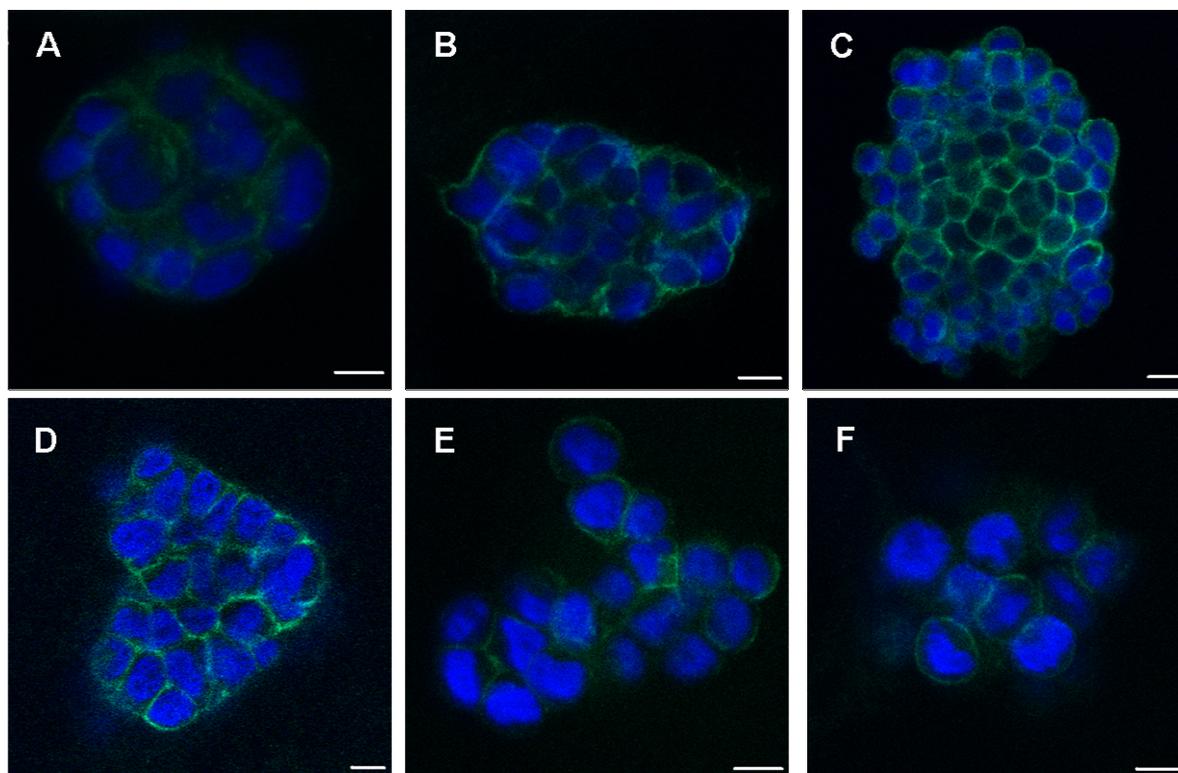


Abbildung 29: Untersuchung der Expression und räumlichen Verteilung von Integrin $\beta 1$ in CRC Sphäroiden mittels Immunfluoreszenzfärbung und konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie. Die Zelllinien CACO-2 (A), DLD-1 (B), HT-29 (C), SW-480 (D), COLO-206F (E) und LOVO (F) wurden sieben Tage im IrECM „on-top“ Modell kultiviert. Anschließend wurden sie aus der Matrix herausgelöst, auf Objektträger übertragen und das Protein Integrin $\beta 1$, mit Hilfe des spezifischen Anti-Integrin $\beta 1$ Antikörpers sowie des Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse Sekundärantikörpers, mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie visualisiert. Die Integrin $\beta 1$ Expression ist in grün dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt und sind in blau abgebildet.

3.9 Vergleichende Transkriptomanalyse von 2D und IrECM „on-top“ kultivierten Zellen

Die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR, bei der ausgewählte Zielgene aus den Bereichen der Zellproliferation, Zelladhäsion und molekularen, therapeutischen Zielstruktur analysiert wurden, zeigten eine differentielle Genexpression der CRC Zelllinien zwischen der 2D Kultur und der IrECM „on-top“ Kultur. Um weitläufigere Einblicke in die aufgrund des Einflusses der IrECM entstandenen Veränderungen der Genexpression zu erhalten, wurden Transkriptomanalysen mittels „Agilent Human 8x60K High Density Oligonucleotide Microarrays“ durchgeführt. Die Datenanalyse erfolgte mit der „GeneSpring GX Software“

(Version 10.5; Agilent Technologies) und wurde in Zusammenarbeit mit der „Core-Facility“ des BMFZ durchgeführt. Ein Arbeitsplan des durchgeführten Experimentes ist in Abbildung 30 dargestellt.

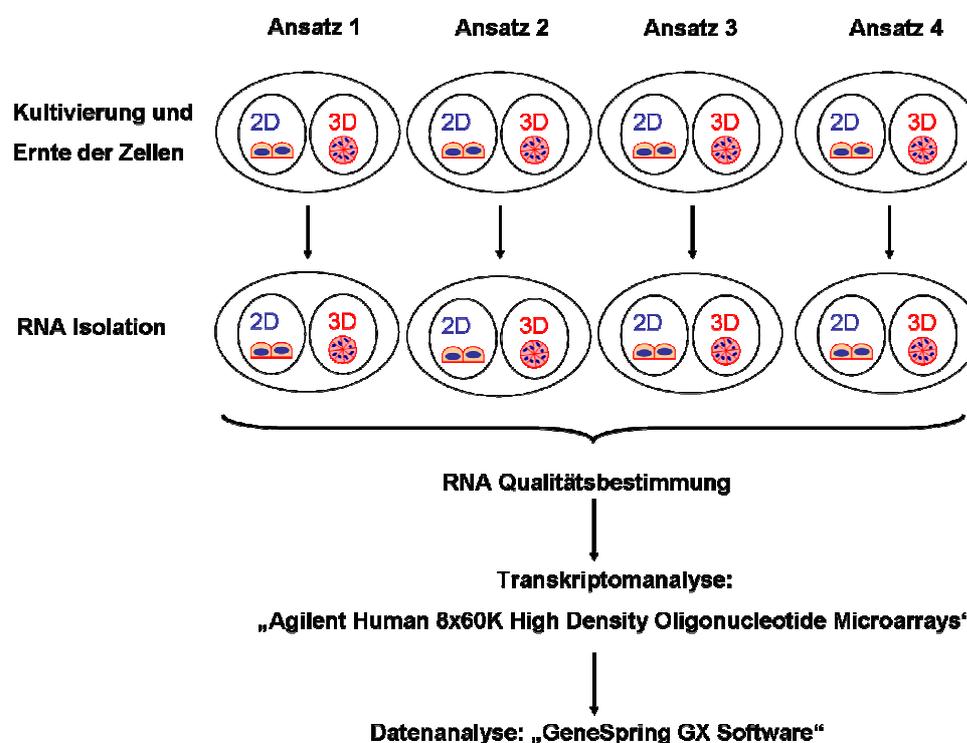


Abbildung 30: Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte zur Generierung der Transkriptomanalyse von 2D und lrECM „on-top“ kultivierten CRC Zelllinien. Die Zelllinien SW-480, HT-29, DLD-1, LOVO, CACO-2, COLO 205 und COLO-206F wurden als 2D Kultur und lrECM „on-top“ Kultur (3D) in vier unabhängigen Ansätzen kultiviert und geerntet. Die RNA Isolation eines Ansatzes erfolgte für beide Kultursysteme zeitgleich, die RNA Isolationen der verschiedenen Ansätze jedoch an vier unterschiedlichen Tagen. Anschließend wurde die RNA Qualität aller Proben gleichzeitig ermittelt, die RNA Proben auf „Agilent Human 8x60K High Density Oligonucleotide Microarrays“ hybridisiert und abschließend eine Datenanalyse mithilfe der „GeneSpring GX Software“ durchgeführt.

Für jede Zelllinie und jedes Zellkulturmodell wurden jeweils vier voneinander unabhängige, biologische Replikate angefertigt. Dem RNA Isolations-Prozess folgte die RNA Qualitätsanalyse und mithilfe der „Agilent Bioanalyzer 2100 Software“ wurde der RIN-Wert ermittelt. Dieser ist für alle angefertigten RNA Proben in Tabelle 15 aufgelistet. Alle präparierten Proben wiesen demnach eine ausreichende bis optimale Qualität für die nachfolgenden Microarray-Hybridisierungen auf.

Tabelle 15: Auflistung der „RNA Integrity Number“ (RIN) der RNA Proben. Anhand der ribosomalen Untereinheiten 28S- zu 18S-rRNA und deren Verhältnis sowie degradierten Abbauprodukten wird von der „Agilent Bioanalyzer 2100 Software“ ein RIN-Wert berechnet. Dieser kann zwischen eins und zehn liegen, wobei ein Wert von eins einer vollständig degradierten RNA und ein Wert von zehn einer völlig intakten RNA entspricht.

Ansatz 1		
Probe	RIN-Wert 2D Kultur	RIN-Wert lrECM Kultur
SW-480	10	10
HT-29	10	10
DLD-1	10	10
LOVO	10	10
CACO-2	10	N/A
COLO 205	10	10
COLO206F	10	10
Ansatz 2		
Probe	RIN-Wert 2D Kultur	RIN-Wert lrECM Kultur
SW-480	10	10
HT-29	10	10
DLD-1	10	10
LOVO	10	10
CACO-2	10	10
COLO 205	10	10
COLO-206F	10	10
Ansatz 3		
Probe	RIN-Wert 2D Kultur	RIN-Wert lrECM Kultur
SW-480	9.9	10
HT-29	8.1	10
DLD-1	10	10
LOVO	10	10
CACO-2	10	10
COLO 205	10	10
COLO-206F	10	10
Ansatz 4		
Probe	RIN-Wert 2D Kultur	RIN-Wert lrECM Kultur
SW-480	10	10
HT-29	10	10
DLD-1	10	10
LOVO	10	10
CACO-2	10	10
COLO 205	10	10
COLO 206F	10	10

Nach eingehender Qualitätskontrolle der einzelnen Hybridisierungen wurden insgesamt 25 Proben der 2D kultivierten Zellen und 24 Proben der in IrECM „on-top“ kultivierten Zellen in den nachfolgenden Analysen berücksichtigt. Eine Auflistung über die Anzahl der analysierten Proben der einzelnen Zelllinien und der entsprechenden Kulturbedingung sind in Tabelle 16 aufgelistet.

Tabelle 16: Auflistung der Anzahl der Proben, die für die „Agilent Human 8x60K High Density Oligonucleotide Microarray“ Analyse verwendet wurden.

Zelllinie	Anzahl an 2D kultivierten Proben	Anzahl an IrECM „on-top“ kultivierten Proben
CACO-2	3	3
COLO 205	4	3
COLO-206F	3	4
DLD-1	4	3
HT-29	3	3
LOVO	4	4
SW-480	4	4

Zunächst wurde eine hierarchische Clusteranalyse der insgesamt sieben im 2D oder IrECM „on-top“ Modell kultivierten CRC Zellen durchgeführt, die in Abbildung 31 dargestellt ist. Diese Clusteranalyse zeigt einen Teilausschnitt der über 23200 Transkripte, bzw. „Features“ auf dem Array, die in mindestens 75 % der RNA aller analysierten Zellkulturproben in einer der beiden, oder beiden Kulturbedingungen über Hintergrund exprimiert wurden. Wie anhand der Abbildung 31 ersichtlich, bildete jede Zelllinie für sich ein eigenes Cluster. Innerhalb einer Zelllinie clusterten dann jeweils die Proben zusammen, die aus dem gleichen Zellkulturmodell, 2D versus IrECM „on-top“ Modell, stammten. Ausnahmen hiervon waren die Zelllinien HT-29 und LOVO, bei denen auch teilweise Proben der unterschiedlichen Zellkulturmodelle ein gemeinsames Cluster bildeten. Weiterhin auffällig war, dass alle Zelllinien des „Grape-like“-Morphologietyps, LOVO, COLO 205 und COLO-206F, ein gemeinsames Cluster bildeten. Die Genexpressionsprofile aller Zellen eines 3D Morphologietyps, „Grape-like“ versus „Mass“, waren untereinander ähnlich und bildeten eigenständige Cluster, während die Genexpressionsprofile von Zelllinien der

unterschiedlichen 3D Morphologietypen keine Ähnlichkeit aufwiesen. Eine Ausnahme hiervon stellte nur die Zelllinie CACO-2 dar, welche der „Mass“-Morphologie angehört, allerdings in das Cluster der „Grape-like“-bildenden Zelllinien fiel.

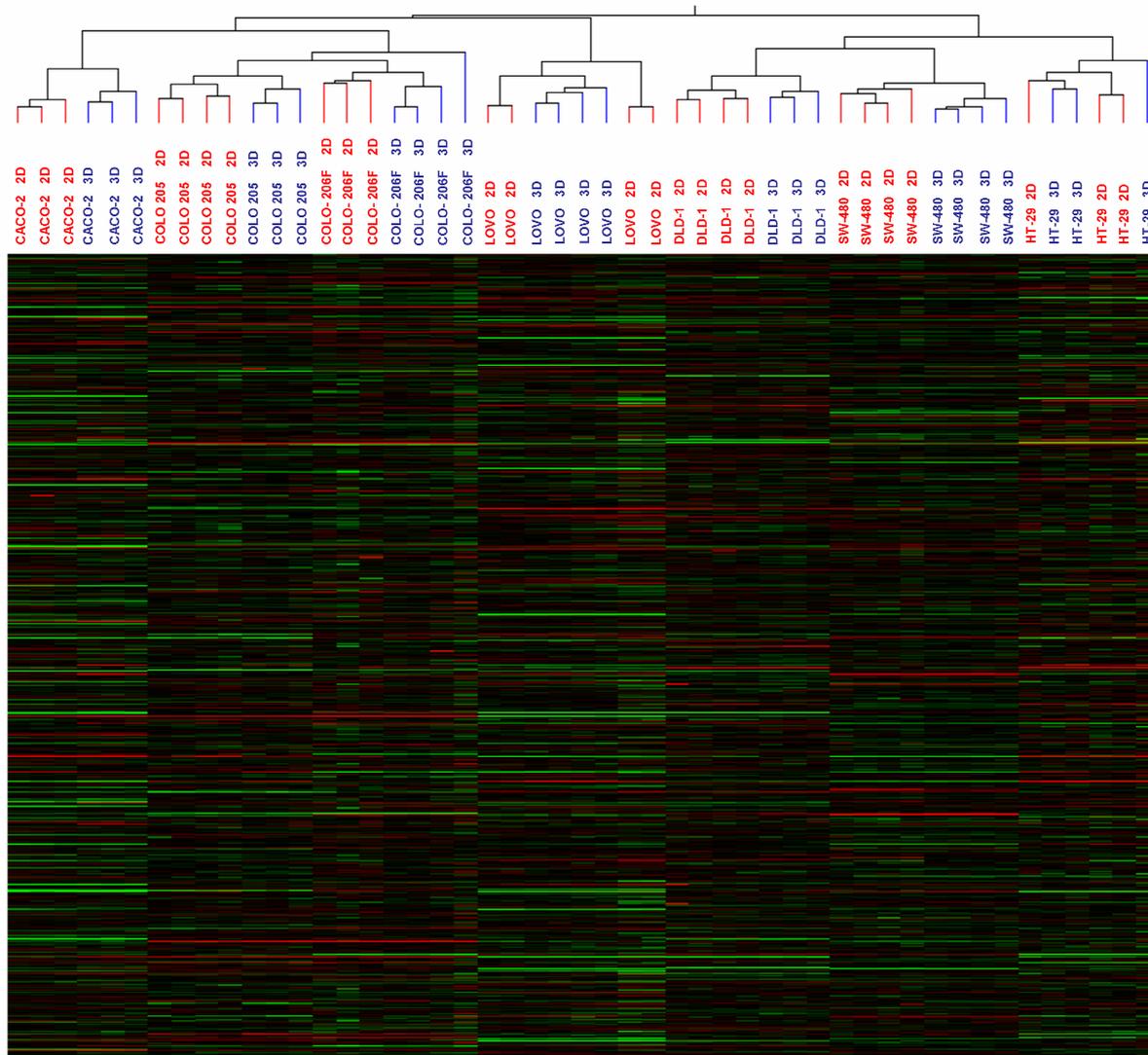


Abbildung 31: Hierarchische Clusteranalyse von 2D und lrECM „on-top“ kultivierten CRC Zelllinien. Insgesamt wurden 23200 Transkripte unabhängig voneinander geclustert. Dargestellt ist hier ein Ausschnitt der Clusteranalyse. Jede Zelllinie für sich bildet ein eigenes Cluster und mit der Ausnahme der Zelllinien HT-29 und LOVO ist außerdem ein eindeutiges Clustering innerhalb der Kultivierungsmodelle 2D versus lrECM „on-top“ (3D) Modell innerhalb jeder einzelnen Zelllinie zu beobachten.

Eine separate Clusterbildung zwischen den verschiedenen Kulturbedingungen konnte nicht beobachtet werden. Dennoch bestand die Annahme, dass es einige Gene gibt, welche innerhalb der beiden Zellkulturbedingungen differentiell reguliert werden. In Abbildung 32 ist eine „Heatmap“ der 225 Gene dargestellt, die zwischen den beiden Kultursystemen (2D versus lrECM „on-top“ Modell) als statistisch signifikant differentiell reguliert, identifiziert werden konnten (Mann-Whitney U-Test, $p \leq 0.05$, korrigiert nach Benjamini-Hochberg).

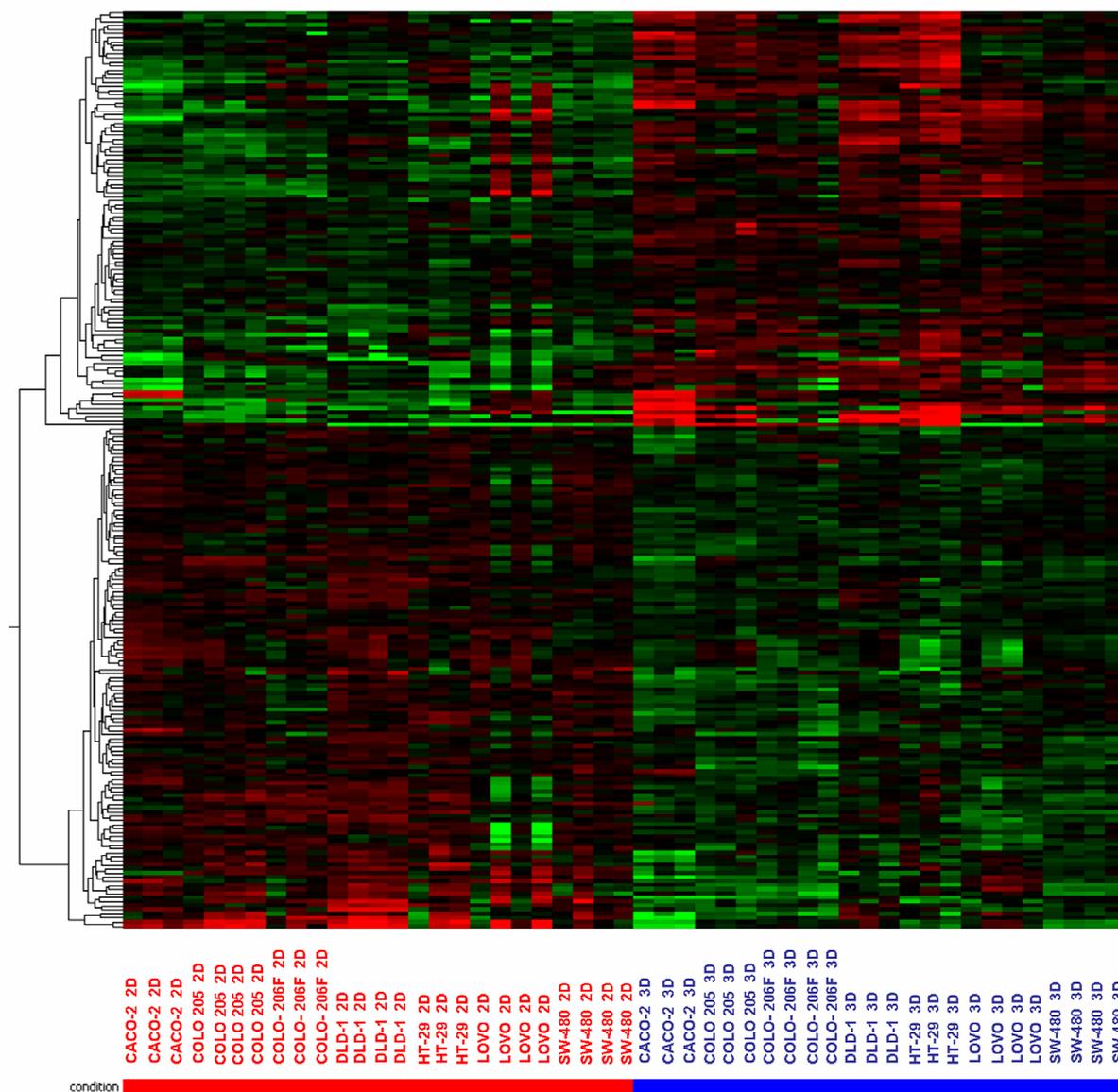


Abbildung 32: „Heatmap“ der statistisch signifikant differentiell regulierten Gene zwischen 2D und IrECM „on-top“ (3D) kultivierten CRC Zelllinien. Insgesamt sind nach dem Mann-Whitney-U-Test, und der Korrektur für multiples Testen nach Benjamini-Hochberg, 225 Gene zwischen den beiden Kultursystemen signifikant differentiell reguliert.

Die signifikant differentiell regulierten Gene konnten folgenden „Gene-Ontology“ Gruppen zugeordnet werden: (1) biologischer Prozess, (2) molekulare Funktion und (3) zelluläre Komponenten und die weiter aufgegliederten Prozesse, an denen diese Gene beteiligt sind, sind in Tabelle 17 aufgelistet.

Tabelle 17: Auflistung der Prozesse an denen die signifikant differentiell regulierten Gene zwischen dem 2D und dem IrECM „on-top“ Modell beteiligt sind.

Biologischer Prozess	Molekulare Funktion	Zelluläre Komponente
Hexose Stoffwechselprozess	Transition Metallion Bindung	Nukleus
Zellulärer Makromolekül Stoffwechselprozess	Zinkion Bindung	
Monosaccharid Stoffwechselprozess	L-Ascorbinsäure Bindung	
Glukose Stoffwechselprozess	Aminoacyl-tRNA Ligase Aktivität	
Hexose Abbauvorgang	Ligase Aktivität, Formierung von Aminoacyl-tRNA und verwandten Produkten	
Monosaccharid Abbauvorgang	Ligase Aktivität, Formierung Kohlenstoff-Sauerstoff Bindung	
Glykolyse	Nukleinsäurebindung	
Small Molecule Stoffwechselprozess		
Zellulärer Kohlenhydrat Stoffwechselprozess		
Alkohol Katabolitprozess		
Zellulärer Kohlenhydrat Katabolitprozess		
Glukose Katabolitprozess		
Zellulärer Stoffwechselprozess		
Alkohol Stoffwechselprozess		

Des Weiteren wurde mit den signifikant differentiell regulierten Genen eine „Pathway“-Analyse mit Hilfe des „GeneSpring GX 10.5 Programms“ durchgeführt. In der Abbildung 33 sind die Gene dargestellt, die signifikant differentiell zwischen den beiden Kulturbedingungen reguliert wurden und von denen aus Literaturquellen bekannt ist, dass zwischen ihnen eine Interaktion stattfindet bzw. ein Zusammenhang besteht. Der rote bzw.

der grüne Pfeil neben dem Gennamen-Symbol gibt an, ob das entsprechende Gen in der IrECM „on-top“ Kultur gegenüber 2D kultivierten Zellen verstärkt oder vermindert exprimiert wurde. Diese insgesamt 14 Gene sind die einzigen der insgesamt 225 signifikant differentiell regulierten Gene, von denen eine Interaktion untereinander bekannt ist. Hierunter befinden sich interessanterweise auffällig viele Gene, die in die biologischen Prozesse der Zellproliferation und der Apoptose beteiligt sind, wie z.B. *JUND*, *BTG2*, *GNRH1*, *NDGG1* und *BCL6*. Eine vollständige Auflistung aller signifikant unterschiedlich regulierten Gene befindet sich im Anhang in Tabelle 1.

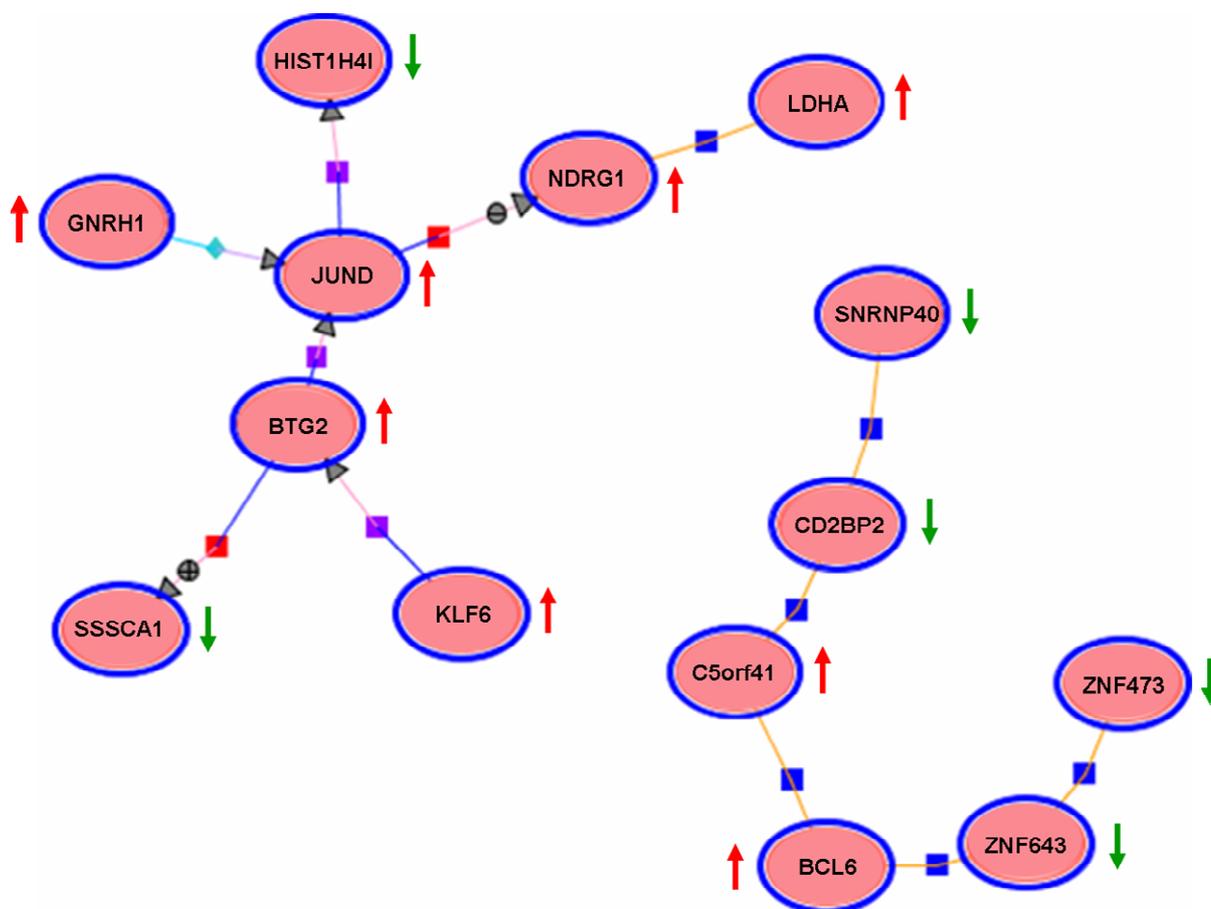


Abbildung 33: „Pathway“-Analyse der Gene die innerhalb der beiden Zellkulturmodelle, 2D versus IrECM „on-top“, signifikant differentiell reguliert sind. Dargestellt sind die 14 Gene von den insgesamt 225 signifikant differentiell regulierten, von denen anhand von Literaturangaben Interaktionen untereinander bekannt sind. Ein roter Pfeil symbolisiert die verstärkte Expression des jeweiligen Gens in der IrECM „on-top“ Kultur während der grüne Pfeil eine verminderte Expression anzeigt.

3.10 Die Wirksamkeit der EGF-Rezeptor Inhibition in dem 2D und IrECM „on-top“ Zellkulturmodell

In den vorangehenden Versuchen konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die Expression der molekularen, therapeutischen Zielstruktur EGFR sowohl auf mRNA Ebene als auch auf dem Proteinlevel in Zellen, die im IrECM „on-top“ Modell kultiviert wurden, im Vergleich zu Zellen aus der 2D Kultur, herunterreguliert wurde. Daraus resultierend entstand die Arbeitshypothese, dass die Diskrepanz in der EGFR Expression zu unterschiedlichen Effekten bei EGFR Inhibitions-Versuchen führen würde.

Um diese Arbeitshypothese zu überprüfen, wurden drei CRC Zelllinien in beiden Zellkulturmodellen, 2D versus IrECM „on-top“ Modell, über einen Zeitraum von 48 h mit dem spezifischen EGFR Inhibitor AG1478 in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt und die Zellviabilität mittels MTT-Assays bestimmt. Für diesen Versuchsansatz wurde die *KRAS* und *BRAF* wildtypische Zelllinie CACO-2, die *KRAS* mutierte aber *BRAF* wildtypische Zelllinie DLD-1, sowie die *KRAS* wildtypische und *BRAF* mutierte Zelllinie HT-29 ausgewählt (siehe Tabelle 7). Im Anschluss wurde der IC_{50} Wert (Inhibitory Concentration), bei dem eine halbmaximale inhibitorische Wirkung vorliegt, mit Hilfe des „GraphPad Prism Programms“ (Version 5.01) berechnet. Dieser Wert gibt darüber Auskunft, bei welcher Inhibitor Konzentration die Zellvitalität um 50 % inhibiert wird. Die im Folgenden dargestellten Dosis-Antwort-Kurven beschreiben das Verhältnis zwischen der Antwort auf die EGFR Inhibitor Behandlung und der Inhibitor Dosis bzw. deren Konzentration. Sie zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen Versuchen. Auf den x-Achsen der Abbildung 34, Abbildung 35, Abbildung 36 und Abbildung 37 ist die Konzentration des EGFR Inhibitors in μM aufgetragen, während die y-Achsen die Zellvitalität (%) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle anzeigen.

Für die Zelllinie CACO-2 verlaufen die Dosis-Antwort-Kurven beider Kultursysteme, wie in Abbildung 34 dargestellt, sigmoid. Mit zunehmender Konzentration des Inhibitors nimmt die gemessene Zellvitalität (%) stark ab. Insgesamt betrachtet, ist die ermittelte Zellvitalität (%) gegenüber unbehandelten Kontrollzellen bei allen verwendeten Inhibitorkonzentrationen in der 2D Kultur geringer als in dem IrECM „on-top“ Modell. Während der berechnete IC_{50} Wert des Inhibitors AG1478 im 2D Modell mit $4.1 \mu\text{M}$ im erwarteten Konzentrationsbereich liegt, ist der berechnete IC_{50} Wert in dem IrECM „on-top“ Modell mit einem Wert von $9.0 \mu\text{M}$ mehr als doppelt so hoch. Die Unterschiede in der EGFR Inhibition zwischen den beiden Kulturmodellen ist mit einem Wert von $p=0.0077$ im gepaarten t-Test signifikant.

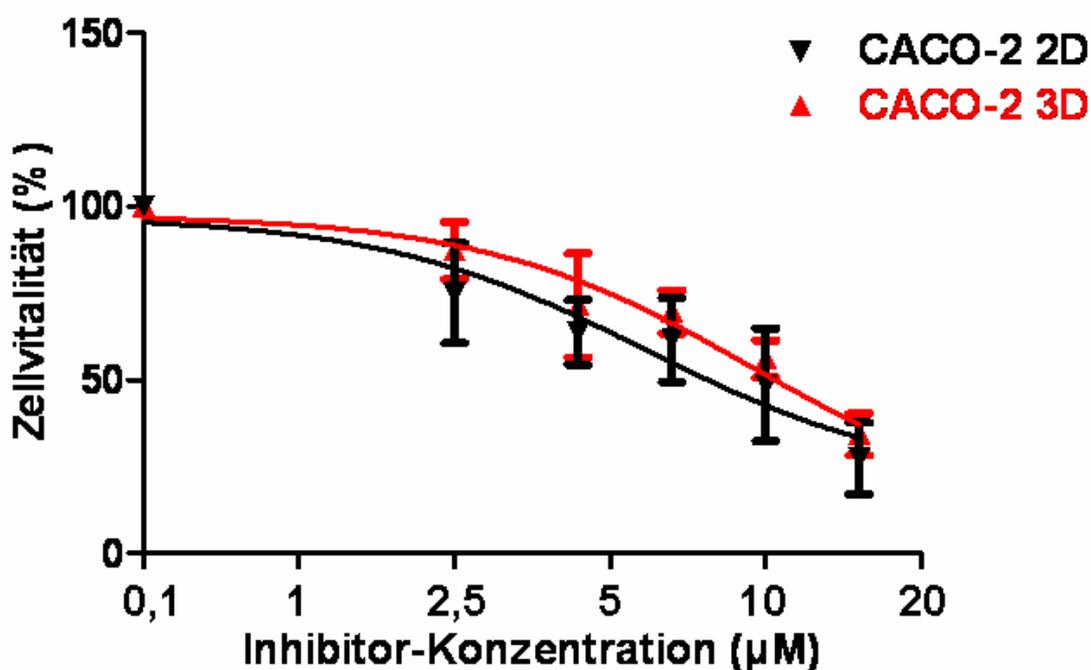


Abbildung 34: Inhibition des EGF-Rezeptors in CACO-2 Zellen mittels AG1478 Behandlung im 2D versus lrECM „on-top“ Modell. Die Zellvitalität gegenüber unbehandelten Kontrollzellen wurde nach 48 h Behandlung der Zellen mit dem EGFR spezifischen Inhibitor AG1478 mittels MTT-Assays bestimmt und anschließend der IC_{50} Wert berechnet. Mit zunehmender AG1478 Inhibitorkonzentration nimmt die Zellvitalität (%) stark ab. Zellen die in dem lrECM „on-top“ Modell kultiviert wurden wiesen gegenüber den Zellen aus dem 2D Kulturmodell, bei gleicher Inhibitorkonzentration, eine höhere Zellvitalität (%) auf. Die berechneten IC_{50} Werte liegen bei 4.1 µM im 2D Modell und bei 9.0 µM im lrECM „on-top“ Modell.

Da bei 48 h Inkubation der CRC Zelllinien in der lrECM noch keine ausgeprägte Sphäroid Morphologie vorliegt, sollte zusätzlich die Wirkung des EGFR spezifischen Inhibitors AG1478 auf die Zellen, welche ein Sphäroid bilden, analysiert werden. Dafür wurde die Zelllinie CACO-2 über einen Zeitraum von vier Tagen in dem lrECM „on-top“ Modell kultiviert und mit dem EGFR Inhibitor AG1478 behandelt. Die Zellvitalität wurde wiederum mittels MTT-Assays ermittelt. Außerdem wurden die Ergebnisse der 48 h Inhibitorinkubation mit der viertägigen Inhibitorinkubation verglichen, um einen Einblick in die zeitabhängige Wirkung des Inhibitors zu erlangen. In Abbildung 35 ist ein repräsentativer EGF-Rezeptor Inhibitor Versuch, über den Behandlungszeitraum von vier Tagen für die Zelllinie CACO-2, dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte der technischen Replikate \pm Standardabweichung. Ähnlich zu der 48 h Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor, kann auch für die viertägige Behandlung ein sigmoider Kurvenverlauf der Dosis-Antwort-Kurve für die 2D kultivierten Zellen beobachtet werden. In Abhängigkeit der ansteigenden Inhibitorkonzentration nimmt die Zellvitalität (%) stark ab. Der berechnete IC_{50} Wert von

4.3 μM entspricht dem Wert, der für die 48 h Inhibitor Behandlung berechnet wurde. Die IrECM „on-top“ kultivierten Zellen weisen eine vergleichsweise höhere Zellvitalität (%) auf. Hier wird eine Reduktion der Zellvitalität (%) gegenüber unbehandelten Kontrollzellen nur bei sehr hohen Inhibitorkonzentrationen beobachtet. So wird bei einer Inhibitorkonzentration von 10 μM eine Reduktion der Zellvitalität (%) um nur ca. 25 % beobachtet. Der berechnete IC_{50} Wert liegt mit einem Wert von 258938 μM weit über der maximal eingesetzten Inhibitor Dosis von 20 μM .

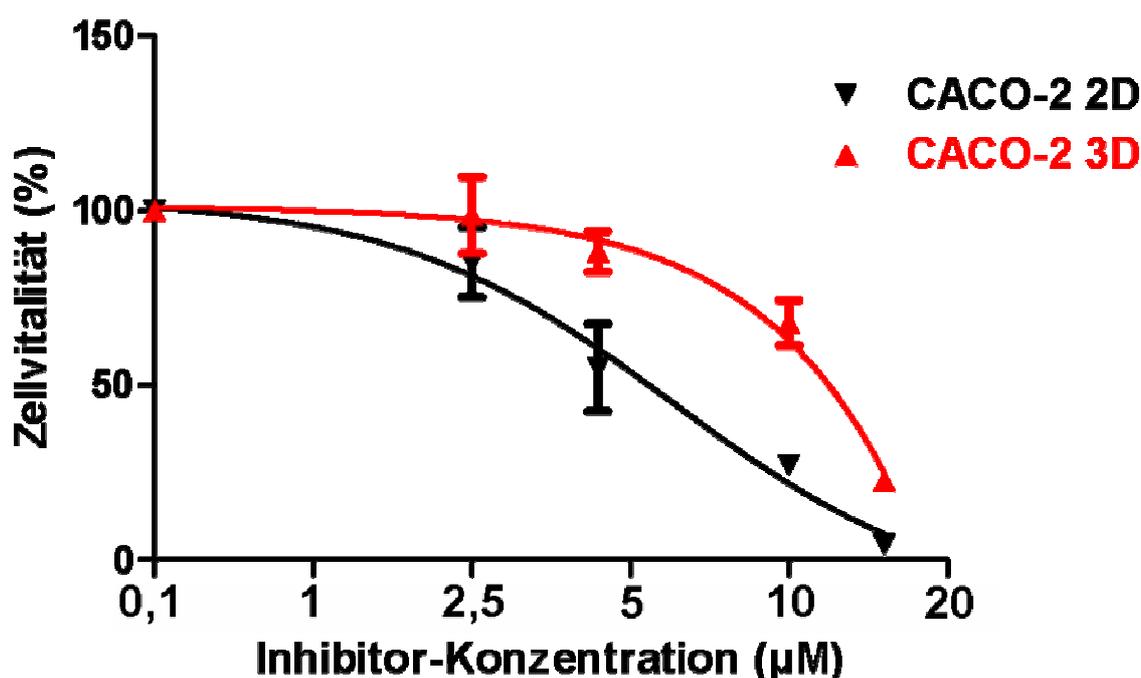


Abbildung 35: Inhibition des EGF-Rezeptors in CACO-2 Zellen mittels AG1478 Behandlung im 2D versus IrECM „on-top“ Modell über einen Zeitraum von vier Tagen. Die Zellvitalität (%) wurde mittels MTT-Assays bestimmt und anschließend der IC_{50} Wert berechnet. Mit zunehmender AG1478 Inhibitorkonzentration nimmt die Zellvitalität (%) der 2D kultivierten Zellen stark ab, während die Zellvitalität (%) der IrECM „on-top“ kultivierten Zellen nur bei sehr hohen Inhibitorkonzentrationen leicht abnimmt. Der berechneten IC_{50} Wert der 2D kultivierten CACO-2 Zellen liegt bei 4.3 μM . Hingegen wurde für die IrECM „on-top“ kultivierten Zellen ein IC_{50} Wert von 258938 μM berechnet.

Die Abbildung 36 und Abbildung 37 zeigen die Zellvitalität (%) der Zelllinien DLD-1 und HT-29 unter 48 h EGFR Inhibition im Vergleich zu den unbehandelten Zellen an. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen Versuchen. Im Vergleich zu dem Verlauf der Dosis-Antwort-Kurven der CACO-2 Zelllinie bei 48 h Inhibitor Behandlung handelt es sich hierbei nicht um einen sigmoiden Verlauf. Die Plateauphasen der Kurven sind vergleichsweise deutlich länger als für CACO-2. Für die Zelllinie DLD-1 ist die Zellvitalität (%) im IrECM „on-top“ Modell bei geringen Inhibitor Konzentrationen, gegenüber dem 2D Modell bei gleicher Inhibitorkonzentration leicht verringert. Insgesamt betrachtet, findet eine Reduktion der Zellvitalität (%) für beide

Kulturmodelle nur bei sehr hohen Inhibitorkonzentrationen statt. Daraus resultierend ergeben sich berechnete IC_{50} Werte von 379708 μM im 2D Modell und 333093 μM im IrECM „on-top“ Modell. Wiederum liegen beide berechneten IC_{50} Werte deutlich über der maximal verwendeten Inhibitorkonzentration von 20 μM . Eine statistische Signifikanz in der Reduktion der Zellvitalität (%), vermittelt durch eine Inhibition des EGF-Rezeptors, konnte im gepaarten t-Test mit einem Wert von $p=0.2218$ nicht beobachtet werden.

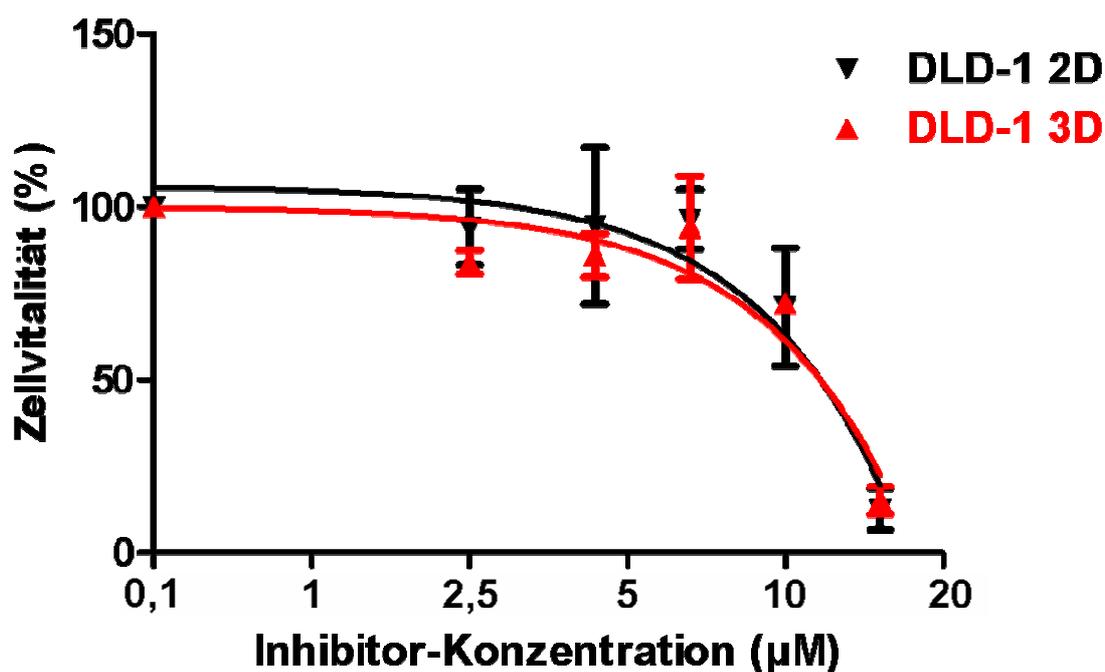


Abbildung 36: EGF-Rezeptor Inhibition in DLD-1 Zellen durch AG1478 Behandlung im 2D versus IrECM „on-top“ Modell. Die Vitalität von DLD-1 Zellen im 2D und IrECM „on-top“ Modell nach 48 h Behandlung der Zellen mit dem EGFR spezifischen Inhibitor AG1478 wurde mittels MTT-Assays bestimmt. Im Anschluss wurde der IC_{50} Wert berechnet. Eine Reduktion der Zellvitalität (%) gegenüber unbehandelten Kontrollzellen ist nur bei sehr hohen Inhibitorkonzentrationen zu sehen. Die berechneten IC_{50} Werte liegen bei 379708 μM im 2D Modell und bei 333093 μM im IrECM „on-top“ Modell.

Im Folgenden sind die Dosis-Antwort-Kurven für 2D und IrECM „on-top“ kultivierte HT-29 Zellen bei 48 h Inkubation mit dem spezifischen EGF-Rezeptor Inhibitor AG1478 dargestellt. Abgebildet sind wiederum die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen Versuchen. Eine Inhibition des EGF-Rezeptors und die damit verbundene Reduktion der Zellvitalität (%) gegenüber unbehandelten Kontrollzellen zeigt sich, wie bereits für die Zelllinie DLD-1 beschrieben, erst bei Gabe von sehr hohen Inhibitorkonzentrationen. Zellen beider Zellkulturmodelle weisen eine nur minimale Reduktion der Zellvitalität (%) auf. Ein berechneter IC_{50} Wert von 256535 μM wurde für die 2D kultivierten HT-29 Zellen ermittelt, der IC_{50} Wert im IrECM „on-top“ Modell wurde mit

384664 μM berechnet. Damit liegen die berechneten IC_{50} Werte beider Zellkulturmodelle wiederum weit über der mit 20 μM eingesetzten maximalen InhibitorKonzentration. Die Reduktion der Zellvitalität (%) unterscheidet sich in den beiden Kulturmodellen, 2D versus lrECM „on-top“ Modell, nicht signifikant, wie mittels gepaarten t-Test mit einem Wert von $p=0.2498$ berechnet wurde.

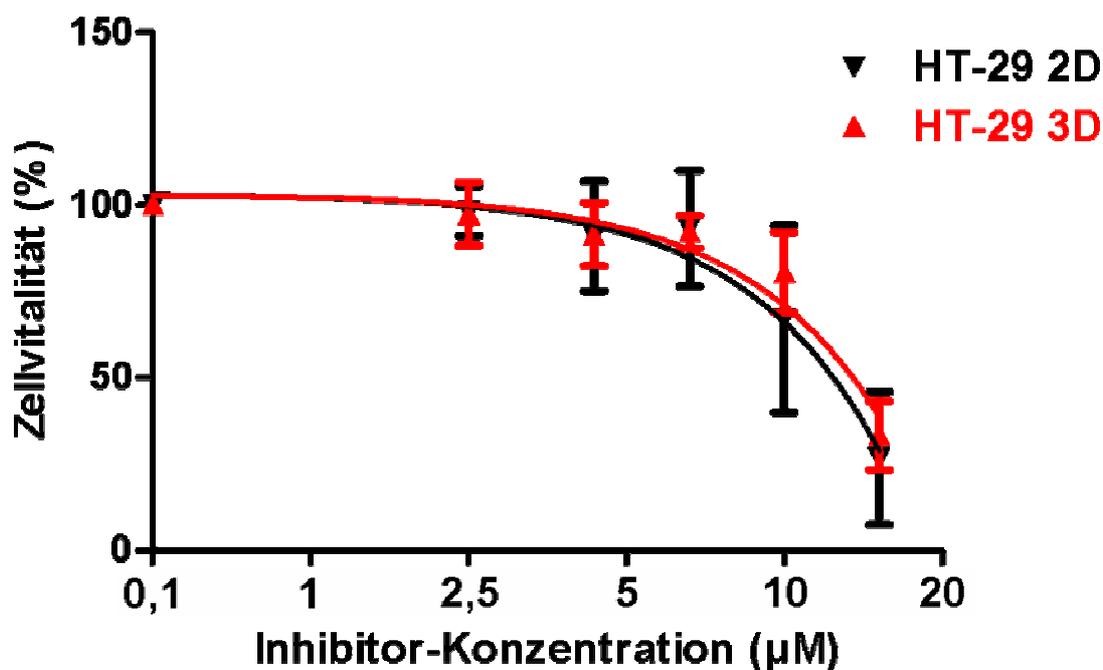


Abbildung 37: Inhibition des EGF-Rezeptors mittels AG1478 Behandlung in HT-29 Zellen im 2D und lrECM „on-top“ Modell. Die Zellvitalität (%) gegenüber unbehandelten Kontrollzellen wurde nach 48 h Inkubation des EGF-Rezeptor Inhibitors AG1478 mittels MTT-Assays ermittelt. Eine Reduktion der Zellvitalität (%) findet nur bei sehr hohen InhibitorKonzentrationen statt. Unterschiede in der Responsivität zwischen den beiden Zellkulturmodellen sind nicht zu sehen. Der berechnete IC_{50} Wert liegt bei 256535 μM für die 2D kultivierten Zellen und bei 384664 μM im lrECM „on-top“ Modell.

3.11 Untersuchung des EGF-Rezeptorsignalwegs mittels Western Blots

Wie in Abbildung 26 dargestellt, wiesen die untersuchten CRC Zelllinien zwischen den beiden Zellkulturmodellen, 2D versus lrECM „on-top“ Modell, unterschiedliche Proteinexpressionsprofile für EGFR auf. Zellen, die in der lrECM kultiviert wurden, zeigten in der Western Blot Analyse eine schwächere Proteinbande als Zellen, die auf Plastikware kultiviert wurden. Dies spricht für eine geringere Expression des untersuchten Proteins.

Daraus resultierend stellte sich die Frage, ob die verminderte EGFR Expression, in Zellen die im lrECM „on-top“ Modell kultiviert wurden, auch Veränderungen in EGFR nachgeschalteten Signalwegen bewirkt. Hierfür wurden die beiden EGFR nachgeschalteten Proteine Akt1 und p44/42 MAPK (ERK 1/2) ausgewählt und deren Proteinexpression

analysiert. Zusätzlich dazu sollte der aktivierte Zustand dieser Proteine, also ihre phosphorylierte Form, untersucht werden.

Die Zelllinien CACO-2 und HT-29 wurden für diesen Versuchsansatz verwendet und 40 µg Gesamt-Protein in einer 10 %-igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Die Zelllinie CACO-2 besitzt keine Mutationen in den Genen *EGFR*, *KRAS* oder *BRAF*, während die Zelllinie HT-29 eine *BRAF* Mutation aufweist, für die anderen beiden Gene aber ebenfalls wildtypisch ist. Die Zelllinie SKBR3 exprimiert sehr hohe Level des EGF-Rezeptors und wurde daher als Antikörper-Positivkontrolle ausgewählt.

Wie in Abbildung 38 dargestellt, exprimierten die Zelllinien HT-29 und CACO-2 das Protein Akt1 in beiden Zellkulturmodellen gleich stark, wie anhand der gleichmäßigen Proteinbandenstärke ersichtlich ist. Phospho-Akt (Ser473) konnte für HT-29 weder in der 2D Kultur noch im lrECM „on-top“ Modell nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde die phosphorylierte Form von Akt in der CACO-2 Zelllinie in dem 2D Modell deutlich stärker als im lrECM „on-top“ Modell exprimiert. Die Bandenintensität war deutlich stärker. Die Expression von p44/42 MAPK (Erk 1/2) konnte für beide Zelllinien in ebenfalls beiden Kulturmodellen nachgewiesen werden, allerdings wurde das Protein p44 MAPK in den 2D Modellen, gegenüber dem lrECM „on-top“ Modell, schwächer exprimiert. Die detektierte Bande ist eindeutig weniger intensiv. Phospho-p44/42 MAPK (Erk 1/2) (Thr202/Tyr204) wurde in den lrECM „on-top“ Modellen beider Zelllinien stärker exprimiert, eine intensivere Bande als in dem 2D Zustand wurde detektiert. Im Fall von HT-29 liegt in dem 2D Zustand nahezu keine Expression vor. Die Proteinbanden der β -actin Kontrolle sind recht gleichmäßig, was belegt, dass der Unterschied der Bandenintensitäten nicht auf ungleichmäßigem Proteinnengeneinsatz basiert. Die deutlichen Proteinbanden der Zelllinie SKBR3 zeigen außerdem die Spezifität sowie die Intaktheit der verwendeten Antikörper.

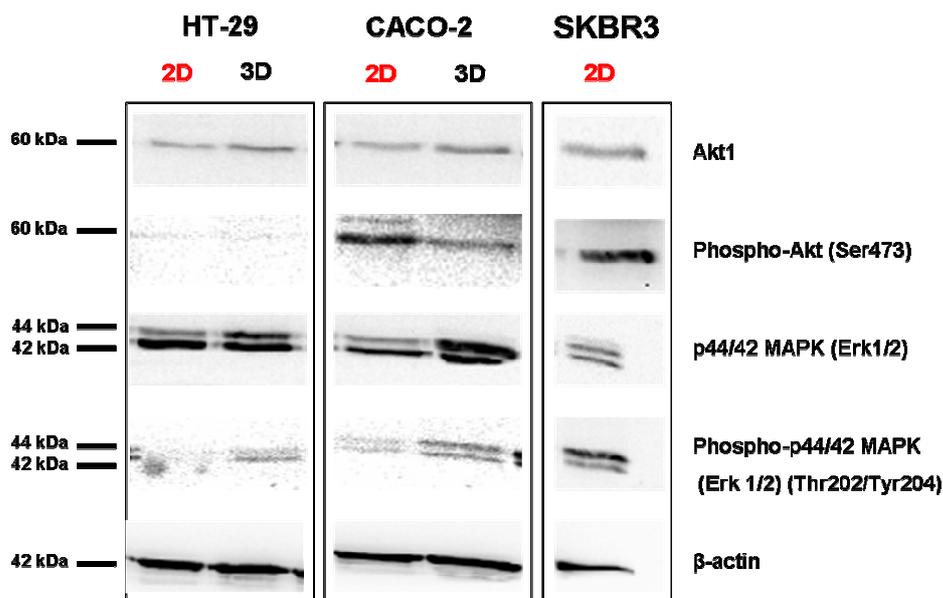


Abbildung 38: Western Blot Analyse von Akt1, Phospho-Akt, p44/42 MAPK und Phospho-p44/42 MAPK in HT-29, CACO-2 und SKBR3 Zellen. Die Zelllinien HT-29 und CACO-2 wurden im 2D und IrECM „on-top“ Modell (3D) kultiviert. Das Gesamtzellprotein wurde isoliert und jeweils 40 μ g in einem 10 %-igen Polyacrylamid Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen Akt1, p44/42 MAPK (Erk1/2) und deren phosphorylierten Varianten. Als Ladekontrolle diente β -actin. Die Zelllinie SKBR3 exprimiert per se hohe Level des EGFR Proteins und wurde daher als Positivkontrolle für die Antikörperspezifität gewählt.

4 Diskussion

Das kolorektale Karzinom ist ein maligner Tumor epithelialer Herkunft und weltweit die dritthäufigste Krebserkrankung und die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache (Arnold and Seufferlein, 2010; Labianca et al., 2010). Im Mittelpunkt der Behandlung des CRC steht die Chirurgie als kurative Maßnahme, bei der eine komplette Resektion des Tumors und der möglicherweise aufgetretenen Metastasen durchgeführt wird. Aber auch molekulare Therapien, bei denen für Tumorzellen relevante Signalwege wie der EGFR-Signalweg im Mittelpunkt stehen, finden Anwendung in der Therapie des CRCs. Der EGF-Rezeptor wird in 60-80 % aller CRCs überexprimiert (Mayer et al., 1993; Overman and Hoff, 2007) und kann sowohl mittels einer Antikörper basierten Therapie, als auch mit „Small Molecule Inhibitors“ wie den Tyrophostinen, therapiert werden.

Trotz verbesserten Therapiekonzepten ist das CRC eine der häufigsten krebsbedingten Todesursachen weltweit (Arnold and Seufferlein, 2010; Labianca et al., 2010). Um erfolgreichere Therapiekonzepte entwickeln zu können, muss die Biologie des CRCs noch intensiver studiert und verstanden werden. Dabei spielen permanente Tumorzelllinien, welche die Untersuchung von humanen Tumorzellen unter kontrollierten Bedingungen ermöglichen, eine wichtige Rolle.

Bis heute werden *in vitro* Zellkulturen überwiegend als Monolayer auf Plastiksubstraten kultiviert (2D Zellkulturmodell), obwohl Primärtumoren und Metastasen komplexe, heterotypische, dreidimensionale Strukturen ausbilden. Mittlerweile finden neben der 2D Zellkultur auch diverse 3D Zellkulturmodelle Anwendung, die auf verschiedenen Substraten basieren. Elsdale und Kollegen konnten bereits 1972 Unterschiede in der Zellmorphologie, Motilität, Adhäsion und Proliferation zwischen Zellen die in der 2D Zellkultur, gegenüber Zellen die in einem dreidimensionalen Modell kultiviert wurden, nachweisen (Elsdale and Bard, 1972).

Von besonderer Bedeutung für das CRC könnte das IrECM „on-top“ Modell sein, bei dem die Tumorzellen auf einer rekonstruierten Basalmembran kultiviert werden. Denn die IrECM bietet den epithelialen CRC Zellen einen basalen Bestandteil ihrer natürlichen *in vivo* Umgebung. Die ECM ist entscheidend an der Organisation der Gewebestruktur beteiligt, da sie bedeutenden Einfluss auf verschiedenste biologische Prozesse wie das Zellwachstum, die Differenzierung von Zellen, ihre Polarität und Motilität ausübt (Ghajar and Bissell, 2008; Hagios et al., 1998; Simons and Mlodzik, 2008). Aber auch das Ansprechen von gezielten Therapien wird durch die ECM beeinflusst (Kenny, 2007; Weigelt et al., 2009).

Da bisweilen keine detaillierten, mechanistischen Studien über den Einfluss der ECM auf den Phänotyp des CRCs und das Ansprechen auf die EGFR Therapie unter IrECM Kulturbedingungen vorliegen, sollte dieser analysiert werden. Um diese Analysen durchführen zu können, wurde zunächst das IrECM „on-top“ Kulturmodell etabliert, bei dem die CRC Zellen auf einer rekonstruierten Basalmembran unter physiologischeren Bedingungen kultiviert werden. Im Anschluss wurden insgesamt sieben häufig verwendete und repräsentative CRC Zelllinien, in dem zuvor etablierten IrECM „on-top“ Modell, kultiviert und der Einfluss der IrECM auf die Morphologie dieser Zellen, auf Tumor-assoziierte, biologische Eigenschaften, das Gen- und Proteinexpressionsprofil und die EGF-Rezeptor basierte CRC Therapie systematisch untersucht.

4.1 Der Einfluss der IrECM auf die 3D Zellmorphologie von CRC Zelllinien

Mechanistische Studien über humane Tumoren beruhen in den meisten Fällen auf *ex vivo* Kulturen, die mit etablierten Zelllinien durchgeführt werden. Hierbei handelt es sich in den meisten Fällen um immortale Zelllinien, die auf einem Plastiksubstrat kultiviert werden. Obwohl die ECM ein natürliches Umfeld für benigne und maligne epitheliale Zellen darstellt, wird diese wesentliche Komponente bei der Kultivierung von permanenten Tumorzelllinien, als homotypischer Monolayer auf Plastikwaren in der 2D Kultur, völlig außer Betracht gelassen. Aus Pionierarbeiten der Arbeitsgruppe von Mina Bissell und anderen, konnten wir lernen, dass die Kultivierung von epithelialen Zellen in einer IrECM dramatische Effekte auf den Phänotyp und den biochemischen Zustand der Zellen, im Vergleich zu Zellen, die auf Plastikware kultiviert wurden, ausübt (Bissell *et al.*, 2005; Kenny, 2007; Kenny *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007). Studien an Brustdrüsenzellen belegten, dass die ECM bedeutende Signale an die Zellen in Bezug auf die Bildung und die Aufrechterhaltung der Gewebespezifität ausübt. Die Kultivierung dieser Zellen in einer IrECM bewirkt die Arretierung der Zellproliferation und die strukturelle Differenzierung in polarisierte, Drüsen-ähnliche Strukturen. Diese sind in der Lage, die endogene Basalmembran zu bilden und ECM-Zell-Rezeptoren auf der äußeren, basalen Zelloberfläche zu exprimieren, während Sialomucin in das zentrale, apikale Lumen sekretiert wird (Bissell *et al.*, 2002). Die funktionelle und morphologische Differenzierung der Zellen, die bei der Kultivierung auf einem Plastiksubstrat verloren gegangen ist, kann wiederhergestellt werden, indem die Zellen in einer rekonstruierten Basalmembran, die den Zellen die essentiellen Signale der ECM

Proteine auf welche die Zellen normalerweise *in vivo* reagieren, kultiviert werden (Barcellos-Hoff *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1987; Petersen *et al.*, 1992). So bewirkt die Kultivierung von primären Mamma Epithelzellen auf Plastiksubstrat, dass diese schon nach einem kurzen Zeitraum nicht mehr in der Lage sind die meisten Milchproteine zu synthetisieren. Hingegen können über 90 % dieser Zellen bei Kultivierung in einer rekonstruierten Basalmembran große Mengen des Milchproteins Beta-Kasein produzieren (Li *et al.*, 1987). Weitere Studien an malignen Mamma Zellen führten zu der Erkenntnis, dass maligne von benignen Zellen durch eine Kultivierung in einer IrECM Kultur voneinander unterschieden werden können, da nicht maligne Zellen nur wenige Zellteilungen durchlaufen und sich anschließend zu organisierten, wachstumsarretierten Kolonien formierten, welche morphologische Merkmale von Brustdrüsengängen aufwiesen (Petersen *et al.*, 1992), während die malignen Zellen aus Primärtumoren, als auch aus etablierten Tumorzelllinien verschiedenste 3D Morphologien ausbildeten. Dabei besitzen diese Zellen einige gemeinsame Merkmale wie den Verlust der Gewebepolarität, eine disorganisierte Architektur und ein permanentes Wachstum (Park *et al.*, 2006; Petersen *et al.*, 1992). Daher ist es überraschend, dass nur wenige systematische Untersuchungen, die den Effekt der IrECM auf permanente Tumorzelllinien untersuchen, publiziert wurden. Die bisher durchgeführten Studien wurden hauptsächlich an Mammakarzinom Zellen vorgenommen. So analysierten Kenny *et al.* systematisch den Effekt der IrECM auf verschiedene Mammakarzinom Zellen und beobachteten, dass alle untersuchten Zelllinien in der IrECM Zellkultur Sphäroide ausbildeten. Sie verzeichneten dabei verschiedene Sphäroidmorphologien, die sie in vier unterschiedliche Kategorien einteilten und als „Round“- , „Mass“- , „Grape-like“- und „Stellate“-Typ bezeichneten. Die Morphologietypen variierten dabei von benigne erscheinenden Sphäroiden mit gut organisierten Nuklei („Round“-Typ) bis hin zu maligne erscheinenden Sphäroidstrukturen, die disorganisierte Nuklei und invasive Strukturen („Stellate“-Typ) aufwiesen (Kenny *et al.*, 2007). Kürzlich und parallel zu der hier vorgestellten Arbeit wurde von einer anderen Arbeitsgruppe ähnliche Beobachtungen für maligne und benigne Prostatazellen gemacht. Diese bildeten bei Kultivierung in der IrECM ebenfalls die von Kenny *et al.* klassifizierten 3D Strukturen „Mass“, „Round“, „Grape-like“ und „Stellate“ aus (Harma *et al.*, 2010).

Für die Beurteilung des Einflusses der IrECM auf die 3D Morphologie und den Phänotyp, der in der vorliegenden Arbeit untersuchten CRC Zelllinien, wurde nicht nur das von Kenny *et al.* beschriebene IrECM „on-top“ Kultivierungssystem, sondern auch das von ihnen erstellte Morphologie Klassifizierungssystem verwendet, um vergleichende Daten in verschiedenen Tumorentitäten zu erhalten. Bei den für diese Arbeit ausgewählten CRC

Zelllinien handelt es sich um gut etablierte und häufig verwendete Zelllinien, die aufgrund ihrer Herkunft und ihres Mutationsstatus die Heterogenität des CRCs repräsentieren (Dexter *et al.*, 1979; Drewinko *et al.*, 1976; Leibovitz *et al.*, 1976; Rousset, 1986; Semple *et al.*, 1978). Alle verwendeten Zelllinien sind kommerziell bei den Biorepositorien DSMZ, ATCC und ECACC erhältlich. Die klinische und pathologische Beschreibung der einzelnen Zelllinien ist in Auszügen in der Tabelle 8 dargelegt.

Von den insgesamt sieben untersuchten, verschiedenen CRC Zelllinien bildeten alle Zelllinien in der IrECM Kultur bereits nach 48-stündiger Kultivierung eine Sphäroidstruktur aus, die mittels Phasenkontrast-Mikroskopie, Immunfluoreszenzfärbung und anschließender konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie beurteilt wurde. Allerdings konnten nur Morphologien des als „Mass“- und „Grape-like“-Typs bezeichneten Wachstumsmusters identifiziert werden (siehe Abbildung 14, Abbildung 16, Abbildung 17). Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere, an dieser Stelle nicht untersuchten CRC Zelllinien, die beiden übrigen Morphologietypen „Round“ und „Stellate“ in dem IrECM „on-top“ Modell ausbilden würden. Die beobachteten Sphäroidmorphologien der untersuchten Zelllinien waren in über zehnfachen, unabhängigen Wiederholungsversuchen reproduzierbar und wiesen in jedem Versuchsdurchlauf die gleiche, typische Morphologie auf. Bemerkenswerterweise bildeten alle aus Metastasen generierten Zelllinien in der IrECM „on-top“ Kultur die „Grape-like“-Morphologie aus, während Zelllinien die aus Tumorzellen von Primärtumoren etabliert wurden ausschließlich der „Mass“-Kategorie angehörten. Diese Korrelation war im Fishers-Exact-Test statistisch signifikant (p-Wert = 0.028). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Beobachtungen von Kenny *et al.*, da von insgesamt neun „Grape-like“-Struktur-bildenden Mammakarzinom Zelllinien acht aus Metastasen isoliert wurden und fünf der insgesamt sieben „Mass“-bildenden Zelllinien aus Primärtumoren stammten (Kenny *et al.*, 2007). Auch hierfür wurde von uns berechnet ob diese Beobachtung statistische Signifikanz besitzt. Die Berechnung erfolgte ebenfalls mit dem Fishers-Exact-Test und ein p-Wert von 0.035 wurde ermittelt, womit es sich hierbei auch um eine statistisch signifikante Beobachtung handelt. Dies lässt vermuten, dass Zelllinien je nach ihrer Herkunft (Primärtumoren oder Metastasen) charakteristische Eigenschaften beibehalten, die nur dann wahrnehmbar werden, wenn diese Zelllinien in einem adäquaten Umfeld, z.B. der IrECM, kultiviert werden. In diesem Kontext ist weiterhin zu erwähnen, dass die aus Metastasen stammenden CRC Zelllinien COLO-206F und LOVO in der IrECM „on-top“ Kultur zwar beide den „Grape-like“-Typ ausbildeten, jedoch deutlich unterschiedliche Morphologien in der 2D Kultur auf Plastikware aufwiesen. Während die Zelllinie COLO-206F bei

Kultivierung auf Plastiksubstrat eine hauptsächlich runde Morphologie aufwies und nur ca. 80 % der Zellen adhärent wuchsen, wuchs die Zelllinie LOVO komplett adhärent und besaß eine spindelförmige Morphologie. Die Eigenschaften der aus Metastasen stammenden Zellen führte offenbar in Kontakt zur IrECM zu lockeren Zell-Zell-Kontakten und der daraus resultierenden typischen „Grape-like“-Morphologie ihrer Sphäroide. Dagegen bildeten die von Primärtumoren abstammenden Zelllinien kompakte Strukturen aus. Die lockere Struktur der „Grape-like“-Typen basiert möglicherweise darauf, dass diese Zellen sich *in vivo* vom Primärtumor abgelöst haben müssen, um Metastasen ausbilden zu können. Ein weiterer Hinweis auf die charakteristischen Merkmale der Zellen, die sich in Abhängigkeit der Kulturbedingung unterschiedlich ausprägen, zeigten die Reinkultivierungsversuche der Sphäroide (siehe Abbildung 18). So zeigte sich nach dem Herauslösen der Sphäroide aus der IrECM und der anschließenden Reinkultivierung auf einem Plastiksubstrat, dass die CRC Zellen nach einigen Tagen wieder ihre ursprüngliche, typische Monolayer Morphologie annahmen. Anhand dieser Versuche konnte demonstriert werden, dass der deutliche Einfluss der IrECM Umgebung auf den Phänotyp der CRC Zellen reversibel ist und nicht genetisch fixiert wird. Unterstützt wird diese Aussage zusätzlich durch die in Abbildung 31 dargestellten Clusteranalysen der Transkriptomanalysen, mit denen gezeigt werden konnte, dass jede einzelne Zelllinie, unabhängig von der Kultivierungsmethode (2D oder IrECM „on-top“) ein für die Zelllinie typisches Transkriptomprofil aufwies und nicht alle Zelllinien eines Kultivierungszustandes ein gemeinsames Cluster bildeten. Diese Daten belegen, dass die IrECM „on-top“ Kultivierungsmethode keine generellen und umfassenden Veränderungen in der Genexpression bewirkt. Weiterhin belegen diese Daten, dass die IrECM die CRC Zellen nicht so stark beeinflusst, dass sie ihre epigenetischen sowie genetischen Charakteristika verlieren, da die Genexpressionsprofile einer Zelllinie aus den verschiedenen Kulturbedingungen ansonsten kein eigenes Cluster bilden würde.

Interessanterweise waren sich die Transkriptionsprofile der Zelllinien der „Mass“-Gruppe untereinander ähnlicher als die der „Grape-like“-Gruppe, ebenfalls unabhängig von der Methode der Zellkultivierung. Eine Ausnahme bildeten hier jedoch die Transkriptionsprofile der zu der „Mass“-Gruppe zugehörigen Zelllinie CACO-2, deren Transkriptionsprofile sowohl aus der 2D Kultur wie aus der IrECM „on-top“ Kultur den „Grape-like“ Zelllinien ähnlicher war. Tatsächlich wurde auch bei einer Genexpressionsstudie von IrECM kultivierten Mammakarzinom Zelllinien beobachtet, dass sich die Transkriptionsprofile der Zelllinien einer Morphologiegruppe („Round“, „Mass“, „Grape-like“, „Stellate“) stark ähnelten und eigenständige Gruppen in der hierarchischen

Clusteranalyse bildeten (Kenny *et al.*, 2007). Auch diese Beobachtungen lassen Rückschlüsse darauf ziehen, dass jede Zelllinie eine bestimmte genetische bzw. epigenetische Kodierung besitzt, die zu der Ausbildung einer typischen Morphologie führt, die allerdings erst bei der Kultivierung in der lrECM ersichtlich wird. Dies spricht außerdem für eine Interaktion der lrECM mit den epithelialen Zellen, bei der die Zellen Signale von der lrECM erhalten, welche das genetische bzw. epigenetische Programm der Zelllinie aktivieren, so dass es zu der Ausbildung der Zelllinien-typischen 3D Morphologie führt.

4.2 Die Korrelation der 3D Morphologie der untersuchten CRC Zelllinien und ihren zellbiologischen Eigenschaften

Eine ausgeprägte Invasivität, eine hohe Migrationsfähigkeit, sowie eine schnelle Proliferation sind Kennzeichen aggressiver Tumorzelllinien. Es wurde nun die Hypothese aufgestellt, dass Zelllinien, die unter lrECM Kulturbedingungen dem „Grape-like“-Typ angehören und alle aus Metastasengewebe generiert wurden, in Bezug auf die genannten zellbiologischen Eigenschaften einen aggressiveren Phänotyp aufweisen, als die dem „Mass“-Typ zugeordneten CRC Zelllinien. Wie aus den Daten der Tabelle 14 und der Abbildung 20 ersichtlich, konnte eine solche Korrelation zwischen dem Migrationsverhalten bzw. der invasiven Eigenschaft der CRC Zelllinien und ihrer 3D Morphologie nicht nachgewiesen werden. Bei Mammakarzinom Zelllinien wurde eine gegensätzliche Beobachtung getätigt. Während Mammakarzinom Zellen des „Stellate“-Typs alle hoch invasive Eigenschaften aufwiesen, besaßen die Mammakarzinom Zellen des 3D „Round“-Typs kein invasives Potential, womit eine Korrelation zwischen dem 3D Morphologietyp und dem Invasionspotential bei Mammakarzinom Zellen besteht (Kenny *et al.*, 2007). Dies ließ Kenny *et al.* die Hypothese aufstellen, dass der 3D Kolonie-Morphologie Assay ein funktioneller Assay sein könnte, um das invasive Potential von Zelllinien untersuchen zu können (Kenny *et al.*, 2007). Die Daten der hier vorliegenden Arbeit können diese Annahme für CRC Zellen nicht bestätigen, da sowohl Zellen des „Grape-like“-Typs als auch Zellen der „Mass“-Kategorie ein ähnliches invasives Potential aufwiesen, bzw. die Invasivität innerhalb der beiden Gruppen, aber besonders in der „Mass“-Gruppe, variierte. Dennoch zeigte sich, mit der Ausnahme der Zelllinie HT-29, insgesamt betrachtet die Tendenz, dass die Gruppe der „Grape-like“-bildenden Zelllinien ein insgesamt höheres Invasionspotential aufwies, als die Gruppe der „Mass“-bildenden Zelllinien.

In einem orthotopen Nacktmaus Modell wurden unter anderem die CRC Zelllinien SW-480, HT-29 und CACO-2 in sechs bis acht Wochen alte weibliche BALB/c Nacktmäuse

(nu/nu) injiziert und ihr Potential Tumoren und Metastasen zu bilden untersucht (Flatmark *et al.*, 2004). Alle drei Zelllinien bildeten nach subkutaner Injektion Tumoren, die bei einer Größe von 1cm^3 entnommen wurden. Anschließend wurden Teilstücke dieser Tumoren für die weitere Implantation verwendet. Alle Zelllinien bildeten bei subkutaner Injektion Tumoren, die „Take-up“ Rate in dem orthotopen Modell war jedoch unterschiedlich. So lag sie bei 100 % für SW-480, bei 69 % für HT-29 und bei 40 % für CACO-2. Interessanterweise bildete die Zelllinie HT-29 in 83 % der Fälle Lymphknotenmetastasen aus, während die Zelllinie CACO-2 nur in 25 % aller Fälle in der Lage war, Metastasen zu bilden (Flatmark *et al.*, 2004). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde das höchste Invasionspotential für die Zelllinie HT-29 und das vergleichsweise niedrigste Invasionspotential für die Zelllinie CACO-2 mit Hilfe des Boyden 2-Kammer Versuches nachgewiesen. Nur für die Zelllinie SW-480 konnten keine übereinstimmenden Ergebnisse erzielt werden, da sie in dem Mausmodell keine Metastasen ausbildete (Flatmark *et al.*, 2004), in dem Boyden 2-Kammer Invasionsversuch jedoch ein vergleichbar mittelmäßig starkes Invasionspotential aufwies. Dies ist möglicherweise auf die verschiedenen Modellsysteme zurück zu führen, da es sich zum einen um ein orthotopes *in vivo* Mausmodell, zum anderen um ein *in vitro* Invasionsmodell handelt, welches nicht alle Aspekte eines *in vivo* Modells rekonstruiert und berücksichtigt.

Die lrECM „on-top“ Kulturmethode übte aber nicht nur signifikante Effekte auf die Morphologie der CRC Zelllinien, sondern auch auf ihre Proliferation aus. Wie in Abbildung 23 dargestellt wiesen alle sieben untersuchten CRC Zelllinien in der lrECM „on-top“ Kultur gegenüber den Zellen, die auf Plastikware kultiviert wurden, eine signifikante, um 10-30 % reduzierte Proliferationsrate auf. Dieses Ergebnis könnte durch molekulare Signale, die direkt von der lrECM an die Zellen gegeben werden, verursacht werden, denkbar ist aber auch, dass dies durch die umliegenden Zellen verursacht wird. So kann die verminderte Zellproliferation der CRC Sphäroide durch die in Abbildung 26 nachgewiesene, verminderte Expression des EGFR- und Integrin $\beta 1$ -Proteins, als auch die mittels quantitativer RT-PCR nachgewiesene Reduktion der mRNA Expression der Gene *EGFR*, *Integrin $\beta 1$* sowie *MKI67* erklärt werden. Zusätzlich geben die mittels Array-Analyse durchgeführten Transkriptomanalysen Hinweise darauf, dass weitere Gene, welche mit der Zellproliferation assoziiert werden, in den lrECM „on-top“ Kulturen vermindert exprimiert werden. Ein Beispiel hierfür ist das Gen *MINA*, dessen Funktion noch im späteren erläutert wird. Eine ebenfalls reduzierte Zellproliferation von CRC Zellen gegenüber 2D kultivierten Zellen wurde von Kanwar *et al.* bei Kolon Sphäroiden, die in serumfreiem Stammzellmedium auf hoch-bindungsarmen 24-well Platten

generiert und kultiviert wurden, nachgewiesen. Die Kolon Sphäroide zeigten eine um 30-40 % reduzierte Zellproliferation gegenüber den als Monolayer kultivierten Mutterzellen (Kanwar *et al.*, 2010). Die Autoren vermuteten, dass der Wnt/ β -catenin Signalweg eine kritische Rolle bei der Wachstumsregulation und der Erhaltung der Kolon Sphäroide spielt, da ein deutlicher Verlust von membrangebundenem β -catenin, der phosphorylierten Form von β -catenin und Axin 1, aber erhöhte Level von totalem (unphosphoryliertem) β -catenin und phosphoryliertem GSK3B (glycogen synthase kinase 3 beta) in den Kolon Sphäroiden beobachtet wurde (Kanwar *et al.*, 2010). Des Weiteren wurde eine erhöhte Proteinexpression von Cyclin-D1 und c-Myc in den Kolon Sphäroiden gegenüber den entsprechenden 2D kultivierten Zelllinien nachgewiesen (Kanwar *et al.*, 2010). Die in der vorliegenden Arbeit auf Array-basierten Transkriptomanalysen zeigen ebenfalls eine signifikant differentielle Regulation verschiedener Gene, zwischen 2D und lrECM „on-top“ kultivierten Zellen. Einige dieser Gene sind an der Regulation der Zellproliferation beteiligt, zu denen *MINA*, *JUND*, *BTG2*, *KLF6*, *NDRG1* und *BCL6* gehören.

Eine verminderte Expression des Gens *MINA*, welches ein direktes Zielgen von *c-MYC* ist, wurde in den hier beschriebenen Versuchen mittels Agilent Array Analyse nachgewiesen. Dieses Gen ist nachweislich an der Zellproliferation beteiligt (Tsuneoka *et al.*, 2002). Tsuneoka *et al.* konnte in HL60 Zellen durch eine Suppression des MINA Proteins mittels RNA Interferenz Technik eine deutliche Reduktion der Zellproliferation nachweisen (Tsuneoka *et al.*, 2002). Außerdem ist bekannt, dass MINA in Tumoren des Kolons stark exprimiert wird und zusätzlich konnten Teye *et al.* in *in vitro* Experimenten nachweisen, dass MINA an der Proliferation von Kolon Tumorzellen beteiligt ist (Teye *et al.*, 2004). Bei Betrachtung der statistisch signifikant regulierten Gene jeder einzelnen Zelllinie (Daten nicht dargestellt), konnte eine verminderte Expression von *c-MYC* in den lrECM „on-top“ Kulturen nachgewiesen werden, mit der Ausnahme von SW-480 und LOVO, bei denen keine verminderte Expression von *c-MYC* vorlag. Die in den Transkriptomanalysen beobachtete statistisch signifikant verminderte Expression von *c-MYC* und *MINA* in den lrECM „on-top“ Kulturen könnte erklären, warum die lrECM „on-top“ kultivierten CRC Zellen langsamer proliferierten, als solche die auf Plastiksubstrat kultiviert wurden. Darüber hinaus konnte in den Transkriptomdaten *BTG2* (B Cell Translocation Gene 2) als ein signifikant stärker exprimiertes Gen bei den lrECM „on-top“ kultivierten CRC Zellen nachgewiesen werden. *BTG2* ist ein Interaktionspartner von *JUND* und ist in verschiedenen Tumorarten häufig herunterreguliert, so dass es offenbar als Tumorsuppressor wirkt. So wurde gezeigt, dass eine gesteigerte *BTG2* Expression das Wachstum und die Proliferation von Magenkarzinom Zellen

einschränken kann (Zhang *et al.*, 2010). *BTG2* wirkt als negativer Regulator der Apoptose und der Zellproliferation, indem das *BTG2* Protein den Zellzyklus Checkpoint an der G1- zu S-Phase Transition in Fibroblasten und neuronalen Zellen über die direkte Inhibition der Aktivität des *CCND1* (*Cyclin D1*) Promotors inhibiert (Farioli-Vecchioli *et al.*, 2007; Guardavaccaro *et al.*, 2000; Montagnoli *et al.*, 1996).

Eine Korrelation zwischen dem 3D Morphologietyp und der Zellproliferation konnte, wie in Abbildung 22 und in Abbildung 23 dargestellt, weder in den 2D kultivierten Zellen noch im lrECM „on-top“ Modell nachgewiesen werden. In der 2D Kultur proliferierten die Zelllinien die der „Grape-like“-Morphologie angehören geringfügiger als die Zelllinien der „Mass“-Kategorie, wobei sich dieser Unterschied im ungepaarten t-Test mit einem Wert von $p=0.025$ als statistisch signifikant erwies. Die Proliferationsreduktion in der lrECM „on-top“ Kultur gegenüber der 2D Kultur fiel bei den „Grape-like“-bildenden Strukturen geringfügiger als bei den „Mass“-Sphäroiden aus. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant und daher kann anhand der Sphäroid Morphologie keine Aussage über die Proliferationsfähigkeit der CRC Sphäroide getroffen werden. Dieses Ergebnis wurde auch von Kenny *et al.* beschrieben, die ebenfalls keine signifikante Korrelation von der Zellproliferation zu der Sphäroid-Morphologie bzw. der Abstammung der Tumorzelle, Primärtumor versus Metastase, nachweisen konnten (Kenny *et al.*, 2007).

4.3 Die lrECM Kultivierung führt zu messbaren Veränderungen der Gen- und Proteinexpression

Die Ausbildung von Sphäroiden der CRC Zelllinien in der lrECM „on-top“ Kultur und der signifikant differentielle Proliferationsunterschied zwischen den beiden Zellkulturmodellen führten zu der Annahme, dass generelle Unterschiede in der Genexpression zwischen den 2D und lrECM „on-top“ Kulturen vorliegen müssen. Um diese Hypothese zu testen wurden in einem ersten Schritt verschiedene Gene, die an der Zellproliferation und der Zelladhäsion beteiligt sind, analysiert. Hierfür wurden die Gene *CDH1*, *CTNNB1*, *EPCAM*, *ITGB1*, *EGFR* und *MKI67* ausgewählt. *EGFR* und *EPCAM* sind außerdem auch relevante, molekulare, therapeutische Zielstrukturen bei der Therapie des CRCs. Die Expression dieser Gene wurde zunächst mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. In drei unabhängigen biologischen Replikaten konnten Unterschiede zwischen den 2D und lrECM „on-top“ kultivierten Zellen festgestellt werden. Anhand von Abbildung 24 wird jedoch deutlich, dass nicht bei allen biologischen Replikaten und jeder untersuchten Zelllinie eine einheitliche Reduktion bzw.

Erhöhung der mRNA Level der untersuchten Gene zwischen den beiden Kulturbedingungen detektiert wurde. Wenn diese quantitativen RT-PCR Daten in einer „Heatmap“ zusammengefasst wurden (siehe Abbildung 25), zeigte sich die Tendenz, dass in nahezu allen Fällen die Expression der untersuchten Gene in den IrECM „on-top“ Kulturen herunterreguliert wurde. Eine Ausnahme hierbei war der Proliferationsmarker *MKI67*, der in den „Grape-like“-bildenden Zelllinien COLO 205, COLO-206F und LOVO in der IrECM „on-top“ Kultur leicht erhöht exprimiert wurde. Interessanterweise war genau bei diesen Zelllinien die Reduktion der Proliferation in der IrECM „on-top“ Kultur gegenüber der 2D Kultur weniger deutlich als bei den übrigen Zelllinien, was durchaus durch die leicht erhöhte Expression von *MKI67* zu erklären ist. Außerdem war die Expression des Zelladhäsionsmoleküls *CDH1* in drei der sieben untersuchten Zelllinien in der IrECM „on-top“ Kultur ebenfalls leicht erhöht. Die deutlichste Reduktion der Expression wurde für die Gene *ITGB1* und die beiden molekularen, therapeutischen Zielstrukturen *EPCAM* und *EGFR* beobachtet.

Um tiefere Einblicke in die IrECM vermittelten Veränderungen der Genexpression zu erlangen, wurden im Anschluss an die quantitativen RT-PCR Analysen Transkriptomanalysen mittels „Agilent Human 8x60K High Density Oligonucleotide Microarrays“ durchgeführt. Hierfür wurde jede Zelllinie in vier voneinander unabhängigen Ansätzen im 2D und IrECM „on-top“ Modell kultiviert, sodass je Kulturmodell vier voneinander unabhängige biologische Replikate für die Analysen zur Verfügung standen. Die RNA Isolation aus den 2D und IrECM „on-top“ kultivierten Zellen erfolgte pro Kultivierungsansatz jeweils parallel. Für dieses Versuchsdesign wurde ein passender statistischer Test ausgewählt (ungepaarter Mann-Whitney-U-Test mit korrigiertem p-Value, $p \leq 0.05$) und um mögliche falsch positive Ergebnisse zu eliminieren, wurden die erhaltenen Ergebnisse dem multiplen Testen unterzogen. Die Hybridisierung aller Proben erfolgte zeitgleich. Anhand dieser Array-basierten Transkriptomanalysen wurde unter anderem ersichtlich, dass die mittels quantitativer RT-PCR untersuchten Genen nicht zu denjenigen gehörten, welche zwischen den 2D und IrECM „on-top“ kultivierten Zellen signifikant unterschiedlich reguliert wurden. Dies erklärt auch, warum Schwankungen in der mRNA Expression der untersuchten Gene und nicht einheitliche, eindeutige Ergebnisse für alle drei biologischen Replikate in der quantitativen RT-PCR Analyse beobachtet wurden. Da viele Signaltransduktionsmoleküle aber eher über eine Phosphorylierung des Proteins als auf der transkriptionellen Ebene reguliert werden, wäre möglicherweise ein deutlicherer Unterschied zwischen den beiden Kulturbedingungen auf Proteinebene nachweisbar.

Des Weiteren zeigten die in Abbildung 31 dargestellten, auf der Transkriptomanalyse beruhenden, hierarchischen Clusteranalysen der CRC Zelllinien, dass die 2D und lrECM „on-top“ Genexpressionsprofile der einzelnen Zelllinien, unabhängig vom Kultivierungssubstrat, ein jeweils eigenständiges Cluster bilden. Dieses Ergebnis belegt, dass die lrECM „on-top“ Kultur keine gleichmäßige und umfassende Veränderung in der Genexpression der Zelllinien hervorgerufen hat. Die Kultivierung der verschiedenen Zelllinien in der lrECM „on-top“ Kultur führte somit nicht zu einer universellen und allen Zelllinien gemeinsamen Genexpression. Dennoch wurde ein gewisses Set an Genen identifiziert, welches in den CRC Zellen, die in den beiden verschiedenen Kulturmodellen kultiviert wurden, signifikant unterschiedlich exprimiert wurde. Insgesamt beinhaltet dieses Set eine Anzahl von insgesamt 225 Genen, die in Tabelle 1 des Anhangs aufgelistet sind. Diese Gene konnten den „Gene-Ontology“ (GO) Gruppen „Biologischer Prozess“, „Molekulare Funktion“ und „Zelluläre Komponente“ zugeordnet werden, wobei die erste Gruppe die meisten Gene beinhaltete. Ähnliche Beobachtungen wurde auch von Kenny *et al.* in ihrer Mammakarzinom Studie getätigt, bei der insgesamt 96 Gene zwischen den beiden Kulturbedingungen statistisch signifikant reguliert wurden. Diese Gene fielen in die „Gene-Ontology“ Gruppen „Bindung“, „Strukturmolekül Aktivität“, „Dynamische Arbeit (Bewegung)“, „Enzymregulator Aktivität“, „Transporter Aktivität“, „Katalytische Aktivität“ und „Signaltransduktions Aktivität“ (Kenny *et al.*, 2007).

Im weiteren Verlauf wurde analysiert, ob die beobachteten Veränderungen in der Genexpression auch Auswirkungen auf die Proteinexpression mit sich bringen. Daher wurden totale Proteine von 2D und lrECM „on-top“ kultivierten Zellen isoliert und in einer Western Blot Analyse mittels spezifischer Antikörper gegen die Proteine Integrin $\beta 1$, EPCAM, EGFR, β -catenin und E-cadherin nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass auch auf Proteinebene deutliche Unterschiede in der Expression zwischen den 2D und lrECM „on-top“ kultivierten Zellen bestehen. Besonders auffällig war hierbei ein differentielles Proteinbandenmuster in den beiden Kultursystemen für die Proteine Integrin $\beta 1$ und EPCAM (siehe Abbildung 26). Während Zellen, die auf Plastiksubstrat kultiviert wurden, beide immunoreaktiven Proteinbanden des Proteins Integrin $\beta 1$ aufwiesen, konnte in den lrECM „on-top“ kultivierten Zellen nur die untere Proteinbande nachgewiesen werden. Diese beiden Banden des Integrin $\beta 1$ Proteins wurden von Bellis *et al.* als die teilweise, sowie die gänzlich glykosylierte Variante des Proteins beschrieben (Bellis, 2004). Folglich ist anzunehmen, dass das in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene differentielle Integrin $\beta 1$ Proteinbandenmuster durch den Einfluss der lrECM entstanden ist, die den Phänotyp der CRC Zellen verändert hat.

Generell beeinflusst die Glykosylierung von Proteinen ihre Faltung, den intrazellulären Transport, ihre Lokalisation und die Degradationsrate (Janik *et al.*, 2010). Außerdem werden Zell-Zell-Interaktionen (Ono and Hakomori, 2004) sowie Zell-ECM-Interaktionen durch die Glykosylierung von Proteinen beeinflusst (Varki, 1993). Des Weiteren ist bekannt, dass eine aberrante *N*-Glykosylierung mit Tumorzell-Eigenschaften wie veränderter Adhäsion zu ECM Liganden, erhöhter Zell Motilität und Ankerungs-unabhängigem Wachstum einhergeht (Bellis, 2004). Auch für die Formation von Integrin α - und β -Heterodimeren ist die Glykosylierung verantwortlich (Zheng *et al.*, 1994). Außerdem tritt die differentielle Integrin β 1 Glykosylierung in Verbindung mit verschiedenen biologischen Prozessen auf, unter ihnen die onkogene Transformation und die Metastasierung (Bellis, 2004; Oz *et al.*, 1989; Seales *et al.*, 2003). Des Weiteren beschreiben Bellis *et al.*, dass die Glykosylierung von Integrin β 1 in Abhängigkeit von physiologischen Reizen auftritt. Die Autoren formulieren die Vermutung, dass eine veränderte Zelladhäsion und Motilität, induziert durch Ereignisse wie Zelldifferenzierung oder Transformation, zumindest zum Teil durch die verschiedene Glykosylierung von β 1-beihaltenden Integrin Heterodimeren reguliert wird (Bellis, 2004). Des Weiteren postulierten sie, dass die unterschiedliche Glykosylierung die Assoziation von Integrinen mit anderen Membran-assoziierten Proteinen, welche wiederum nachgeschaltete Integrin-abhängige Prozesse regulieren, verändern kann. Die direkte Manipulation der Integrin β 1 Glykosylierung, mittels enzymatischer Methoden, verändert deutlich die Integrin Konformation und die Liganden-Bindungs-Aktivität, was dafür spricht, dass die Glykosylierung von Integrinen einen wichtigen regulatorischen Mechanismus von Integrinen darstellt (Bellis, 2004).

Neben dem veränderten Proteinbandenmuster von Integrin β 1 wurde ein weiteres differentielles Bandenmuster zwischen den beiden Kultursystemen für das EPCAM Protein nachgewiesen. Die beiden erwarteten Proteinbanden des EPCAM Proteins von 34 kDa und 40 kDa wurden von Munz *et al.* als die glykosylierte und die nicht-glykosylierte Variante des Proteins beschrieben (Munz *et al.*, 2008). Mit der Ausnahme der Zelllinie CACO-2 wurde für die 2D kultivierten Zellen eine stärkere immunoreaktive Bande von 40 kDa und eine schwächere von 34 kDa beobachtet, während die 34 kDa große Proteinbande in den IrECM kultivierten Zellen stärker als bei den 2D kultivierten Zellen vorlag (siehe Abbildung 26). Pauli *et al.* beschrieben ein unterschiedliches Glykosylierungsmuster von EPCAM an Kopf-Hals Geweben. Während nahezu alle Tumore eine starke Glykosylierung des Proteins aufwiesen, wurde ausschließlich die nicht-glykosylierte Proteinvariante in den Normalgeweben nachgewiesen (Pauli *et al.*, 2003). Somit könnte das gewebspezifische

Glykosylierungsmuster Einfluss auf die Funktion von EPCAM in den gesunden bzw. malignen Geweben haben. In Bezug auf das lrECM „on-top“ Modell könnte dies bedeuten, dass durch den Kontakt der Zellen zu der lrECM teilweise der maligne Phänotyp der Zellen revertiert wird. Darüber hinaus ist bereits bekannt, dass die Glykosylierung von Proteinen eine wesentliche Rolle in der Liganden-Rezeptor-Erkennung spielt. Beispiele hierfür sind Immunglobuline, CD 44 und ECM-Matrixproteine wie Fibrin und Vitronectin (Bobbink *et al.*, 1997a; Bobbink *et al.*, 1997b; Katoh *et al.*, 1999; Mimura *et al.*, 2001; Radaev and Sun, 2001; Rudzki and Jothy, 1997). Die nachgewiesenen, unterschiedlichen Glykosylierungsmuster des EPCAM Proteins zwischen den beiden Zellkulturmodellen könnte somit eine unterschiedliche Ligandenbindung bewirken. Weitere Studien zur Untersuchung der Glykosylierung von ECM Bestandteilen wie Laminin und Kollagen IV belegen, dass die Adhäsion von Neuronen auf glykosyliertem Kollagen IV Substrat signifikant reduziert wird. Die Glykosylierung von Laminin, als auch von Kollagen IV, verursachte einen erheblichen morphologischen Unterschied der kultivierten Neuronen (Luo *et al.*, 2002). Somit ist vorstellbar, dass die Glykosylierung von ECM-Proteinen und Proteinen die mit der ECM interagieren, wie z.B. den Integrinen, nicht nur zu einer veränderten Ligandenbindung führt, sondern auch bei Prozessen, wie dem Verlust der Zelladhäsion oder bei morphologischen Veränderungen der Zelle, beteiligt ist.

Das veränderte Glykosylierungsmuster der Proteine Integrin $\beta 1$ und EPCAM spielt jedoch auch in einem weiteren Zusammenhang eine wichtige Rolle, da beide Proteine als therapeutische Zielstrukturen diskutiert werden, bzw. bereits klinische Studien durchgeführt wurden. Hierbei muss eine solche differentielle Proteinexpression in Form einer Glykosylierung von Integrin $\beta 1$ und EPCAM in Abhängigkeit des „Mikroenvironments“ der Zellen berücksichtigt werden. Nicht zuletzt bei der Therapie mit monoklonalen Antikörpern kommt der Glykosylierung von Proteinen eine wichtige Bedeutung zu, da durch eine aberrante Glykosylierung möglicherweise die Bindung des Antikörpers an das Zielprotein verhindert, oder zumindest verändert werden könnte. Im Falle von Integrin $\beta 1$ könnte die in Abhängigkeit des „Mikroenvironments“ typische Glykosylierung außerdem zu einer veränderten oder reduzierten Bildung von Integrin Heterodimeren führen, sodass die Wirkung von spezifischen Antikörpern gegen bestimmte Integrin Heterodimere aufgehoben werden könnte.

Eine generelle Veränderung der Integrin Expression zwischen 2D und lrECM kultivierten Zellen konnte bereits an Mammakarzinom Zellen nachgewiesen werden. Die Kultivierung der Mamma Tumorzelllinie AU565 in einer lrECM führte zu einer verminderten

Expression von Integrin $\beta 1$ (Weigelt *et al.*, 2009). Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren, wurde neben Integrin $\beta 1$ auch die Expression von Integrin $\alpha 6$ zwischen den beiden Kultursystemen unterschiedlich exprimiert (siehe Abbildung 26 und Abbildung 27). Diese beiden Integrin Untereinheiten bilden als Heterodimer zusammen einen der wichtigsten Lamininrezeptoren. Alle untersuchten CRC Zelllinien, die in der lrECM kultiviert wurden, exprimierten die beiden Proteine deutlich geringfügiger als Zellen in der 2D Kultur. Neben den unterschiedlichen Proteinbandenmuster für Integrin $\beta 1$ und EPCAM wurden jedoch noch weitere, deutliche Unterschiede zwischen 2D und lrECM „on-top“ kultivierten Zellen beobachtet. Die deutlichste Herunterregulation der mittels quantitativer RT-PCR und Western Blot Analyse untersuchten Gene/Proteine in der lrECM Kultur, wurde für die therapeutische Zielstruktur EGFR, sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene, beobachtet (siehe Abbildung 25 und Abbildung 26). Ein ähnliches Ergebnis wurde auch in diversen Mamma Tumorzelllinien nachgewiesen. Diese Zellen wiesen bei Kultivierung in der lrECM Matrix eine deutlich verminderte Expression des EGFR Proteins gegenüber Zellen auf, die auf Plastiksubstrat kultiviert wurden (Pickl and Ries, 2009; Weigelt *et al.*, 2009). Der EGR-Rezeptor ist ein 170 kDa transmembranärer Wachstumsfaktorrezeptor, der durch die Bindung von einem seiner zehn verschiedenen Liganden einer Homo- oder Heterodimerisierung unterläuft. In Folge wird eine Reihe von Signalkaskaden über die Rezeptor vermittelte Tyrosinkinase aktiviert, hauptsächlich durch RAS/RAF/MEK und den Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt Signalweg (Ciardiello and Tortora, 2008; Shepard *et al.*, 2008). Bei der Analyse der EGFR nachgeschalteten Proteine Akt1 und p44/42 MAPK zeigte sich, dass nicht nur die therapeutische Zielstruktur EGFR selbst, sondern auch Akt1 und MAPK in Abhängigkeit der Kulturbedingung unterschiedlich reguliert wurden (siehe Abbildung 38). Während die Expression des Akt1 Proteins sowohl bei der Zelllinie HT-29 als auch bei CACO-2 in beiden Kultursystemen gleich stark exprimiert wurde, war die aktivierte, also phosphorylierte Form von Akt, bei der Zelllinie CACO-2 unter 2D Kulturbedingungen stärker exprimiert als unter lrECM Bedingungen. Interessanterweise wurden ähnliche Beobachtungen von Pickl und Ries getätigt, die ebenfalls eine gleich starke Expression von Akt1 aber eine stärkere Expression des Phospho-Akt Proteins in der 2D Kultur bei der Mammakarzinom Zelllinie SKBR-3 nachwiesen (Pickl and Ries, 2009). Akt1 ist eine Serin/Threonin Protein Kinase, die in verschiedene biologische Prozesse wie den Glukose Metabolismus, die Zellproliferation, die Apoptose, die Transkription, die Zellmigration und den Zellzyklus involviert ist (Manning and Cantley, 2007). Außerdem ist bekannt, dass die Aktivierung von Akt zu einem Verlust der Zellzyklus Kontrollpunkte G1 (Ramaswamy *et al.*,

1999) und G2 (Kandel *et al.*, 2002) führt, was wiederum ein unkontrolliertes Wachstum mutierter Zellen und somit die Tumorprogression erleichtert. Ein weiterer wichtiger Mechanismus, der neben den bereits erwähnten Veränderungen auf transkriptioneller Ebene, für die geringere Proliferationsrate der CRC Zellen in der IrECM verantwortlich sein könnte, ist der unterschiedliche Phosphorylierungsstatus von Akt in den beiden Zellkulturmodellen. IrECM „on-top“ kultivierte CACO-2 Zellen weisen gegenüber 2D kultivierten Zellen eine geringere Menge des phosphorylierten Akt Proteins auf. Auch an dieser Stelle zeigen die ermittelten Daten erneut, wie wichtig die Kultivierung von Tumorzellen in einem der *in vivo* Situation ähnlicherem Modell ist, um für die Tumorbilogie relevante Prozesse unter realistischeren Bedingungen untersuchen und verstehen zu können. Auch die vergleichende Analyse von MAPK (ERK1/2) und seiner phosphorylierten Form wies Unterschiede zwischen den beiden Kulturbedingungen auf. Während p44 MAPK in den 2D kultivierten Zellen schwächer als in den IrECM „on-top“ kultivierten Zellen exprimiert wurde, zeigte sich eine gleichmäßige Expression von p42 MAPK zwischen den beiden Kultursystemen. Allerdings wurde ein „Switch“ der aktivierten Form von p44/42 MAPK, Phospho-p44/42 MAPK (Erk 1/2) (Thr202/Tyr204), zwischen der 2D Kultur und dem IrECM „on-top“ Modell, nachgewiesen. Die Expression der aktivierten Form von MAPK war in den Tumorsphäroid Kulturen gegenüber den 2D kultivierten Zellen deutlich erhöht. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Beobachtungen von Pickl und Ries, die ebenfalls eine erhöhte Expression von Phospho-p44/42 MAPK (Erk 1/2) (Thr202/Tyr204) in dem IrECM Modell nachgewiesen haben (Pickl and Ries, 2009). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass das „Mikroenvironment“ in Form der IrECM sowohl die PI3K-Akt als auch die RAS-MAPK Signalkaskade beeinflusst und reguliert. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte auf Integrin-ECM Interaktionen beruhen. Bekanntermaßen führt die Bindung von Zellen an ECM Proteine wie Fibronectin, Vitronectin, Kollagen, Tenascin und Laminin über Ligation von $\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha \nu\beta 6$ und $\alpha 6\beta 4$ Integrinen zur Aktivierung des MAPK Signalwegs (Chen *et al.*, 1994; Mainiero *et al.*, 1997; Schlaepfer *et al.*, 1994; Yokosaki *et al.*, 1996). Gleichermäßen bewirkt die Interaktion von Integrinen mit der ECM die Aktivierung der Serin/Threonin Kinase Akt über die Lipid-Kinase PI3K (Lee and Juliano, 2000). Eine veränderte Expression von Matrixproteinen oder von Integrinen könnte somit ein möglicher Mechanismus sein, der zu einer unterschiedlichen Regulation dieser Signalwege führt. Zusätzlich könnte diese Signalkaskade, induziert über Wachstumsfaktoren, die sich in der ECM befinden, über den EGF-Rezeptor gesteuert werden. Eine aberrante Expression des EGF-Rezeptors zwischen den beiden Kulturmodellen, 2D versus IrECM „on-top“ Modell, wurde, wie in Abbildung 26

dargestellt, nachgewiesen. Demzufolge ist auch eine veränderte Expression der EGFR nachgeschalteten Signalmoleküle MAPK und Akt zwischen den beiden Zellkultur Systemen zu erklären.

Die CRC Zelllinien sind in der Lage sich schnell an das neue „Mikroenvironment“ und die davon abstammenden Signale zu gewöhnen und ihre intrazelluläre Signalgebung, die unter anderem die Zellproliferation und das Zellüberleben regulieren, zu verändern. Die Untersuchung von Zellen im Umfeld der physiologisch relevanten ECM bietet die Möglichkeit die Signalgebung innerhalb der Zelle unter Bedingungen zu analysieren, die dem *in vivo* „Mikroenvironment“ entsprechen und somit insgesamt die *in vivo* Situation unter realistischeren Umständen widerspiegeln.

4.4 Die IrECM Kulturbedingung beeinflusst das Ansprechen auf EGF-Rezeptor Inhibition

In Folge der nachgewiesenen, verminderten EGFR Proteinexpression in den IrECM „on-top“ Kulturen und den beobachteten Veränderungen in den PI3K-Akt und RAS-MAPK Signalwegen, stellte sich die Frage, inwieweit diese Ereignisse mit einem veränderten Ansprechen auf eine Anti-EGFR basierte Therapie des CRCs assoziiert sind. Der EGF-Rezeptor wird auf der Oberfläche von normalen Epithelien exprimiert und ist in ca. 60-80 % aller CRCs überexprimiert (Mayer *et al.*, 1993; Overman and Hoff, 2007), was mit einer schlechten Prognose und einer erhöhten Metastasenbildung assoziiert ist (Hemming *et al.*, 1992; Mayer *et al.*, 1993). Drei verschiedene CRC Zelllinien, die entweder komplett wildtypisch für die Gene *EGFR*, *BRAF* und *KRAS* sind, oder eine Mutation für eines der drei Gene aufweisen, wurden über einen Zeitraum von 48 h mit verschiedenen Konzentrationen des EGF-Rezeptor spezifischen Inhibitors AG1478 in beiden Zellkulturmodellen behandelt, anschließend die Zellvitalität bestimmt und der IC_{50} Wert berechnet. Der IC_{50} Wert beschreibt die Konzentration des Inhibitors bei der eine halbmaximale Inhibition der Zellvitalität vorliegt. Bekanntermaßen blockiert der Inhibitor AG1478 sowohl die Phosphorylierung von EGFR, Akt, und ERK1/2 in proximalen Tubuluszellen der Niere und inhibiert deren Zellproliferation (Zhuang *et al.*, 2004). Die Zelllinie CACO-2, die sowohl für das *EGFR* Gen, als auch für *KRAS* und *BRAF* wildtypisch ist, wies in der IrECM „on-top“ Kultur ein signifikant reduziertes Ansprechen auf (siehe Abbildung 34). Die berechneten IC_{50} Werte lagen bei der 2D Kultur bei 4.1 μ M und in dem IrECM „on-top“ Modell bei 9.0 μ M und waren signifikant unterschiedlich. Literaturangaben zeigen unterschiedliche IC_{50} Werte für

AG1478 auf. So benennen Levitzki *et al.* einen IC_{50} Wert von 3 nM, wobei der Zelltyp und die Bedingungen unter denen dieser Wert ermittelt wurde nicht genauer beschrieben werden (Levitzki and Gazit, 1995). Des Weiteren werden IC_{50} Werte von 5.6 μ M und 5.7 μ M für Leiomyom- und Myometrium-Zellkulturen angegeben (Shushan *et al.*, 2004). Ob der Effekt der geringfügigeren Responsivität der in IrECM „on-top“ kultivierten Zellen durch die insgesamt verminderte EGFR Proteinexpression zustande kommt, oder auch zusätzlich durch die ECM vermittelte Signalgebung beeinflusst wird, kann anhand dieser Experimente jedoch nicht abschließend geklärt werden. Ein weiterer Mechanismus über den die erhöhte Zellvitalität von CACO-2 in der IrECM „on-top“ Kultur gegenüber den 2D kultivierten Zellen unter AG1478 Behandlung zu erklären ist, liegt möglicherweise an den erhöhten Mengen an phosphoryliertem und somit aktiviertem MAPK Protein in den IrECM „on-top“ kultivierten Zellen (siehe Abbildung 38). Hingegen wurde die phosphorylierte Proteinvariante von MAPK in den 2D kultivierten Zellen geringfügiger exprimiert. Eine Stimulation von Tyrosinkinase-Rezeptoren wie dem EGF-Rezeptor führen über eine mehrschrittige Signalkaskade zur Aktivierung von MAPK. Eine Phosphorylierung von p44 MAPK und p42 MAPK bewirkt deren Translokation in den Nukleus, wo sie Transkriptionsfaktoren aktivieren. Die damit verbundene Änderung der Genexpression führt unter anderem zur Zellproliferation (Hill and Treisman, 1995; Seger and Krebs, 1995; Zhang and Liu, 2002). Eine gegensätzliche Regulation zeigte sich bei der Untersuchung des phosphorylierten Akt Proteins. Dieses wurde erstaunlicherweise in den IrECM „on-top“ kultivierten Zellen geringfügiger als in den 2D kultivierten Zellen exprimiert. Das aktivierte Akt Protein fördert das Zellüberleben und verhindert die Apoptose über die Aktivierung oder Inhibition von verschiedenen nachgeschalteten Signalmolekülen. Ein möglicher Signalweg ist hierbei die Aktivierung von Mdm-2 über phospho-Akt, die zu einer Inhibition des proapoptotischen Faktors p53 führt (Mayo and Donner, 2001; Mayo and Donner, 2002; Zhou *et al.*, 2001). Weitere Mechanismen, die zur Inhibition der Apoptose und somit zum Zellüberleben beitragen, sind die Inhibition von FoxO1 durch Akt (Manning and Cantley, 2007) und Bad (Datta *et al.*, 1997; del Peso *et al.*, 1997). Das die Zellvitalität bei Behandlung der CACO-2 Zellen mit AG1478 jedoch in dem IrECM „on-top“ Modell gegenüber dem 2D Modell erhöht war, spricht dafür, dass eine Regulation eher über den MAPK- als den Akt-Signalweg vermittelt wurde. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse der EGFR Inhibition in der CRC Zelllinie CACO-2 stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Weigelt *et al.*, die den Einfluss der Anti-HER2 gerichteten Agenzien Trastuzumab, Pertuzumab und Lapatinib auf Mammakarzinom Zelllinien in dem IrECM „on-top“ Modell

und der 2D Zellkultur getestet haben (Weigelt *et al.*, 2009). In Abhängigkeit der Zelllinie und dem verwendeten Medikament wurden sowohl signifikant erhöhte, als auch verringerte Sensitivitäten gegenüber den Anti-HER2 Therapien über 48 h zwischen den beiden Zellkulturmodellen beobachtet (Weigelt *et al.*, 2009). Des Weiteren konnten Weigelt *et al.* ebenfalls für alle untersuchten Mammakarzinom Zelllinien einen „Switch“ in der Aktivierung zwischen dem PI3K-Akt und dem RAS-MAPK Signalweg zwischen den 2D versus lrECM „on-top“ Bedingungen nachweisen (Weigelt *et al.*, 2009), wie es auch unter 3.11 für die untersuchten CRC Zelllinien beschrieben wurde. Die Ergebnisse der EGFR Behandlungsversuche belegen, dass die differentielle Genexpression zwischen 2D und lrECM „on-top“ kultivierten Zellen auch Konsequenzen auf die EGFR Inhibition ausübt, da signifikant unterschiedliche Antworten auf die Inhibition des EGF-Rezeptors zwischen den beiden Kulturmodellen beobachtet wurden. Unter Betrachtung dessen, dass das lrECM „on-top“ Modell ein der *in vivo* Situation ähnlicheres System zur Analyse von Zellen bietet und die Unterschiede im Ansprechen auf Therapien zwischen den beiden Zellkulturmodellen demonstriert wurde, sollten Studien zur Testung von Medikamenten vorzugsweise im physiologischeren lrECM „on-top“ Modell durchgeführt werden. Besondere Bedeutung bekommt das lrECM „on-top“ Modell auch vor dem Hintergrund, dass anhand von Genexpressionsprofilen der Zellen Aussagen über ihre Sensitivität bzw. ihrer Resistenz gegenüber verschiedenen chemotherapeutischen Agenzien gemacht werden können, wie verschiedene Autoren belegen (Bild *et al.*, 2006; Potti *et al.*, 2006). Wie anhand der Array-basierten Transkriptomanalysen nachgewiesen, variieren die Genexpressionsprofile der einzelnen Zelllinien, zumindest teilweise, zwischen den beiden Zellkulturmodellen, 2D versus lrECM „on-top“ Modell. Dies führt möglicherweise dazu, dass keine zuverlässigen Aussagen über die Sensitivität bzw. die Resistenz einer Zelllinie gegenüber chemotherapeutischen Agenzien anhand von 2D Zellkulturmodellen gemacht werden können. Vielmehr sollte die Beurteilung über die Sensitivität oder die Resistenz gegenüber chemotherapeutischen Agenzien anhand des Genexpressionsprofils von Zellen die in dem lrECM „on-top“ Modell kultiviert wurden durchgeführt werden, da dieses System ein realistischeres *in vitro* Tumor-Modell darstellt.

Neben der 48 h Behandlung der CACO-2 Zellen mit dem EGFR spezifischen Inhibitor AG1478 wurden außerdem noch Behandlungsversuche über einen Zeitraum von vier Tagen durchgeführt, um einen Einblick in die zeitabhängige Wirkung des Inhibitors auf die Zellvitalität der CACO-2 Zellen zu erlangen. Wie in Abbildung 35 dargestellt, wiesen die 2D kultivierten CACO-2 Zellen einen ähnlichen Kurvenverlauf in den erstellten

Dosis-Antwort-Kurven auf und auch der berechnete IC_{50} Wert stimmte nahezu mit dem für 48 h Behandlung berechneten IC_{50} Wert überein. Hingegen war die ermittelte Zellviabilität in den IrECM „on-top“ kultivierten Zellen nach viertägiger AG1478 Behandlung deutlich höher als die nach 48 h Behandlung. Der berechnete IC_{50} Wert lag weit über der maximal eingesetzten Inhibitorkonzentration von 20 μ M. Diese Beobachtung lässt sich möglicherweise damit erklären, dass nach 48 h Behandlung noch keine kompakten 3D Morphologien ausgeprägt waren, sondern die Zellen vielmehr als wenigzellige Aggregate in der IrECM vorlagen. Hingegen bildeten die CACO-2 Zellen bei viertägiger Kultivierung und Behandlung mit AG1478 kompakte Morphologien des „Mass“-Typs aus, so dass eine Bindung des Inhibitors möglicherweise nur an die Oberflächen der äußeren Zellen des Sphäroids möglich war. Dies wiederum bedeutet, dass nur einige EGF-Rezeptoren der kompletten Sphäroidstruktur, und zwar die der äußeren Sphäroidoberfläche, durch die Behandlung mit AG1478 inhibiert werden und somit die Zellproliferation nur geringfügiger vermindert wird als bei kompletter Inhibition aller EGF-Rezeptoren.

Die beiden anderen mit AG1478 behandelten Zelllinien HT-29 und DLD-1 sind im *BRAF*- bzw. *KRAS*-Gen mutiert. Aktivierende Mutationen in einem dieser beiden Gene treten beim CRC häufig auf und Literaturangaben belegen, dass sich Mutationen in diesen beiden Genen gegenseitig ausschließen (Rizzo *et al.*, 2010). Bei beiden Proteinen handelt es sich um Signalmoleküle die dem EGF-Rezeptor nachgeschaltet sind und über den MAPK-Signalweg das Zellwachstum und die Progression des CRCs fördern (Rizzo *et al.*, 2010). Dabei ist BRAF der erstrangig nachgeschaltete Effektor von KRAS. KRAS ist bislang der einzige in der Klinik verwendete prädiktive Marker der zur Beurteilung einer erfolgreichen molekularen Anti-EGFR Therapie, von der ein Patient mit CRC profitiert, dient (Deschoolmeester *et al.*, 2010), während die Relevanz von BRAF als prädiktiver Marker kontrovers diskutiert wird. Viele Studien belegen mittlerweile, dass ausschließlich Patienten mit *KRAS* wildtypischen Tumoren von einer monoklonalen Anti-EGFR Therapie profitieren (Amador and Hidalgo, 2004; Benvenuti *et al.*, 2007; Lievre *et al.*, 2006). Neuere Studien liefern außerdem Hinweise darauf, dass auch das *BRAF* Gen in seiner wildtypischen Variante vorliegen muss, damit Patienten Nutzen aus einer Anti-EGFR Therapie mittels der therapeutischen Antikörper Cetuximab oder Panitumumab ziehen (Di Nicolantonio *et al.*, 2008).

Im Gegensatz zu der Zelllinie CACO-2 sprachen sowohl die Zelllinie HT-29, als auch die Zelllinie DLD-1 nicht auf eine EGFR spezifische Therapie mit AG1478 an (siehe Abbildung 36 und Abbildung 37). Die Plateauphasen der Zellvitalitätskurven in Abhängigkeit der Inhibitorkonzentration waren gegenüber der Zellvitalitätskurve für CACO-2 deutlich

verlängert, was auf ein schlechteres Ansprechen des Inhibitors hinweist. Nur bei sehr hohen Konzentrationen, die unspezifische, toxische Effekte verursachen, war bei diesen beiden Zelllinien überhaupt eine Abnahme der Zellvitalität zu beobachten. Diese resultierte aber wahrscheinlich auch nicht auf einer EGFR Inhibitions-vermittelten Abnahme der Zellproliferation, sondern vielmehr verursachen die enorm hohen Konzentrationen des Inhibitors unspezifische, toxische Effekte, die zum Zelltod führen. Daraus resultierend waren die berechneten IC_{50} Werte sowohl für HT-29, als auch DLD-1 unter beiden Kultivierungsbedingungen, 2D sowie IrECM „on-top“ Modell, entsprechend sehr hoch.

Wie bereits erwähnt weisen die beiden Zelllinien HT-29 und DLD-1 Mutationen in den Genen *BRAF* und *KRAS* auf. *KRAS* gehört zu der Gruppe der Ras-GTP-bindenden Proteine zu der ebenfalls N-Ras und H-Ras gehören und spielt eine wichtige Rolle als Mediator bei Signaltransduktionswegen, die über Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie z.B. den EGF-Rezeptor, induziert werden (Arnold and Seufferlein, 2010). Spezifische Mutationen in den Codons 12, 13 und 61 des *KRAS* Gens führen dazu, dass es zu einem konstitutiv aktiven Onkogen wird (Bos, 1989), welches dann unabhängig von „upstream“ Regulatoren intrazelluläre Signalwege induziert (Arnold and Seufferlein, 2010). Mutationen des Codons 12 und 13 sind die meist häufigsten Veränderungen im *KRAS* Gen und repräsentieren insgesamt über 90 % aller Mutationen (Sundstrom *et al.*, 2010). Aktivierende somatische Punktmutationen im *KRAS* Gen treten bei ca. 40 % aller CRCs auf (Amado *et al.*, 2008; Arnold and Seufferlein, 2010; Bachet *et al.*, 2007; De Roock *et al.*, 2008; Freeman *et al.*, 2008). Neben *KRAS* stellt auch *BRAF* ein Onkogen dar. Eine Mutation, die einen Austausch von Thymin zu Adenin verursacht, resultiert in einer Substitution von Valin mit Glutamat (V600E). Diese Substitution konvertiert *BRAF* in ein dominant transformiertes Protein, welches unabhängig von RAS eine konstitutive Aktivierung des MAPK-Signalwegs induziert (Davies *et al.*, 2002; Garcia-Saenz *et al.*, 2009). Eine V600E *BRAF* Mutation wird bei 4-15 % aller CRCs nachgewiesen (Garcia-Saenz *et al.*, 2009). Di Nicolantonio *et al.* konnten in einer Studie nachweisen, dass nur Patienten mit wildtypischem *BRAF* von einer Panitumumab oder Cetuximab Therapie profitieren und das anhand des *BRAF* Statuses eine Selektion der Patienten, die von einer Anti-EGFR Therapie profitieren, durchgeführt werden kann (Di Nicolantonio *et al.*, 2008). Die V600E *BRAF* Mutation liegt auch bei der Zelllinie HT-29 vor, weshalb sie in verschiedenen Untersuchungen gegenüber einer gegen EGFR-gerichteten Therapie (z.B. mit Panitumumab) resistent war (Garcia-Saenz *et al.*, 2009). Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Resistenz der Zelllinien HT-29 und DLD-1 gegenüber der Anti-EGFR Therapie mit dem „Small Molecule“ Inhibitor AG1478 ist somit durch den

BRAF- bzw. den *KRAS*-Mutationsstatus dieser Zelllinien zu erklären. Die für HT-29 beschriebenen Ergebnisse spiegeln die Beobachtungen von Partik *et al.* wieder, die ebenfalls eine Reduktion der Zellvitalität/Proliferation von HT29/HI1 Zellen nach Behandlung mit AG1478 nur bei sehr hohen Inhibitorkonzentrationen nachweisen konnten. Eine effektive Inhibition der Zellproliferation wurde erst bei Inhibitorkonzentrationen von 10 µg/ml (entspricht 31.665 µM) beobachtet, während Konzentrationen von 5 µg/ml (entspricht 15.83 µM) keine Reduktion der Zellproliferation bewirkten (Partik *et al.*, 1999). Der Unterschied in der von Partik *et al.* und der vorliegenden Arbeit angegebenen effektiven Inhibitorkonzentration, basiert möglicherweise auf der Verwendung von zwei verschiedenen Detektionssystemen zur Erfassung der Zellvitalität.

Die vorliegenden Ergebnisse der Anti-EGFR behandlungssensitiven Zelllinie CACO-2 belegen deutlich, dass die Kultivierung der CRC Zellen in den beiden untersuchten Zellkulturmodellen zu unterschiedlichen Sensitivitäten gegenüber dem EGFR Inhibitor führen. Unter Betrachtung dessen, dass das IrECM „on-top“ Modell der *in vivo* Situation ähnlicher ist als das 2D Modell und somit ein physiologischeres System zur Untersuchung von therapeutischen Agenzien darstellt, sollte dieses Modell bei der Entwicklung und anschließenden Testung von Anti-Tumor Therapeutika mehr Beachtung finden.

4.5 Datenintegration und Perspektive

Die Kultur von permanenten Tumorzelllinien ist eine essentielle Methode, um Tumoren unter kontrollierten Bedingungen *in vitro* untersuchen zu können. Dabei ist nach wie vor die Kultivierung der Zellen in Form von Monolayern auf Plastikware die vorherrschende Methode, obwohl seit vielen Jahren verschiedene 3D Zellkulturmodelle entwickelt wurden, die eine realistischere *in vitro* Modellierung von Tumoren erlauben. Besonders interessant scheint hier das IrECM Modell zu sein, da bei diesem die Tumorzellen in einer extrazellulären Matrix kultiviert werden, welche nicht nur ihre natürliche Umgebung *in vivo* bildet, sondern ihnen auch essentielle Signale für die Polarität, das Zellwachstum und das Zellüberleben vermittelt. Die hier anhand von CRC Zelllinien gewonnenen Daten zeigen deutlich, welche erheblichen Änderungen des Phänotyps und der biochemischen Signalwege mit der Kultivierung in IrECM im Vergleich zur 2D Kultur auf Plastiksubstrat einhergehen. So bewirkte die Kultivierung der CRC Zelllinien in der IrECM, dass sich Tumor-ähnliche, dreidimensionale Strukturen mit einer für die Zelllinien typischen und reproduzierbaren Morphologie ausbildeten. Die im Vergleich zur 2D Kultur mit den IrECM „on-top“

Kulturbedingungen beobachteten biochemischen Veränderungen waren sehr komplex und konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht in ihrer Gänze erfasst werden. Aber am Beispiel des EGFR-Signalweges konnte jedoch verdeutlicht werden, wie wichtig das realistischere lrECM „on-top“ Modell für präklinische Therapiestudien sein könnte. Der EGFR-Signalweg, welcher beim CRC ein wichtiger Angriffspunkt für molekulare Therapien ist, wurde durch die lrECM „on-top“ Kultur so beeinflusst, dass ein signifikant schlechteres Ansprechverhalten der Zellen unter Anti-EGFR-Therapie festzustellen war. Natürlich kann das hier vorgestellte Modell der CRC Zelllinien nicht als Tumormodell für alle Schritte von der Tumorinitiation bis zur Metastasierung dienen. Am ehesten entspricht die Situation von etablierten Tumorzelllinien in der lrECM „on-top“ Kultur der Entstehung von Mikrometastasen, bevor diese eigene Blutgefäße ausbilden („angiogenic switch“). Da sich das hier vorgestellte CRC lrECM „on-top“ Modell auch als Hochdurchsatz-Verfahren ausbauen lassen sollte, könnte es als präklinisches Modell für die Testung neuer adjuvanter Therapien dienen und dabei auch helfen, die Resistenzmechanismen beim Auswachsen von Mikrometastasen zu verstehen, was nach wie vor die Heilungschance des CRCs einschränkt.

5 Zusammenfassung

Die Kultivierung permanenter Tumorzelllinien ist die wichtigste Möglichkeit unter kontrollierten Bedingungen funktionelle Studien an humanen Tumorzellen *in vitro* durchzuführen. Die am häufigsten angewandte Methode hierbei ist die Kultivierung der Tumorzellen als zweidimensionaler (2D) Monolayer auf Plastiksubstraten, bei der die Tumorzellen jedoch völlig getrennt von ihrer natürlichen *in vivo* Umgebung betrachtet werden. Daher wurden Kultursysteme entwickelt, die eine realistischere Modellierung von Tumoren *in vitro* erlauben. In diesem Zusammenhang ist die Kultivierung in extrazellulärer Matrix (ECM) ein sehr interessantes Modell. Die ECM ist ein essentieller Bestandteil der natürlichen Umgebung von Tumorzellen *in vivo* und liefert den Tumorzellen essentielle Signale für Zellpolarität, Wachstum und Zellüberleben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, für repräsentative, permanente Tumorzelllinien des kolorektalen Karzinoms (CRC) ein ECM Kultivierungsmodell zu etablieren und die zellbiologischen, sowie molekularen Auswirkungen der unterschiedlichen Kultursysteme systematisch zu untersuchen. Für die ECM Kultur wurden die CRC Zelllinien in lamininreiche extrazelluläre Matrix (lrECM) eingebettet („on-top“ Assay), wobei jede der untersuchten Zelllinien eine eigene und reproduzierbare Tumor-ähnliche Morphologie ausbildete. Diese ließ jedoch keine Rückschlüsse auf das morphologische Bild der 2D Kultur zu. Es zeigten sich grundsätzlich zwei verschiedene Morphologietypen: locker aufgebaute Sphäroide, sowie kompakt wachsenden Sphäroide. Interessanterweise entwickelten sich alle locker aufgebauten Sphäroide aus Zelllinien, die aus Metastasen isoliert wurden, während alle kompakten Sphäroide von Zelllinien gebildet wurden, die von Primärtumoren abstammten. Jedoch zeigten sich in Bezug auf diese Morphologietypen keine Unterschiede in der Migrations- oder Invasionsfähigkeit der Zelllinien. Die Zellproliferation der locker aufgebauten Sphäroide war, gegenüber den kompakt wachsenden Sphäroiden, in der lrECM „on-top“ Kultur signifikant reduziert. Die beobachteten, erheblichen morphologischen Änderungen im lrECM „on-top“ Assay, im Vergleich zur 2D Kultur auf Plastiksubstrat, gingen auch mit messbaren Änderungen der Expressionsprofile auf Transkriptions- und Proteinebene einher. Dies zeigte sich bei der Analyse ausgewählter Gene, welche bei der ECM-Zell-Interaktion, der Zell-Zell-Adhäsion und der Proliferation eine Rolle spielen. Um diese Änderungen auf Transkriptionsebene genomweit erfassen zu können, wurde eine Analyse des Transkriptoms aller sieben analysierten CRC Zelllinien mittels Agilent Array Analyse durchgeführt. Innerhalb jeder Zelllinie ließen sich in der hierarchischen

Clusteranalyse die beiden Kulturbedingungen alleine anhand der Expressionsprofile trennen, was den erheblichen Einfluss der lrECM „on-top“ Kultur verdeutlicht. Insgesamt konnten 225 signifikant differentiell regulierte Gene identifiziert werden, wovon bei 14 Genen eine Interaktion untereinander bekannt war. Hierunter befanden sich interessanterweise auffällig viele Gene, die an der Zellproliferation und der Apoptose beteiligt sind. Diese Daten können gut die um 10-30 % reduzierte Proliferation der Zellen unter lrECM „on-top“ Kulturbedingungen im Vergleich zur 2D Kultur erklären. Weiterhin konnte bei der lrECM Kultur, sowohl eine verminderte EGFR-Expression, als auch eine differentielle Aktivierung innerhalb der EGFR-Signalkaskade nachgewiesen werden, was zu einem signifikant schlechteren Ansprechverhalten auf eine Anti-EGFR Behandlung führte. Dies ist beim CRC von besonderer Bedeutung, da hier EGFR eine wichtige therapeutische Zielstruktur ist.

Insgesamt scheint die lrECM „on-top“ Kultur ein *in vitro* CRC Tumormodell zu sein, das die physiologische Umgebung und die Wachstumsbedingungen von Tumorzellen besser abbildet, auch wenn dieses Modell nicht alle Prozesse von der Tumorentstehung bis hin zur Metastasierung rekonstruieren kann. Es könnte jedoch ein geeignetes Modell für das Anwachsen von disseminierten Zellen zu Mikrometastasen darstellen. Die vorliegende Arbeit bietet nun einen ersten Einblick, welchen Einfluss die lrECM auf CRC Tumorzelllinien ausübt. Ein Ausbau dieses Modells als Hochdurchsatz-Verfahren könnte im Besonderen für präklinische Therapiestudien von wichtiger Bedeutung sein, um die Testung von neuen adjuvanten Therapiesubstanzen unter realistischeren Bedingungen durchführen zu können.

6 Abstract

The cultivation of permanent tumour cell lines represents the most important approach to conduct mechanistic studies on human tumour cells *in vitro* under controlled conditions. The cultivation of tumour cells as a two-dimensional (2D) monolayer on plastic substrates is still the most commonly used cultivation method although the cells are completely separated from their natural environment. Therefore, culture systems have been developed that allow a more realistic tumour modelling *in vitro*. In this context, the extracellular matrix (ECM) model appears to be particularly interesting because the ECM is an integral component of the natural environment of tumour cells *in vivo* interacting with the cells and providing them with essential signals for cell polarity, growth and cell survival.

The aim of this study was to establish an ECM culture model for representative, permanent colorectal cancer (CRC) cell lines and to further systematically investigate the impact of the two different cell culture systems in cell biological and molecular terms. For the ECM culture (“on-top” assay), cells were embedded in laminin-rich extracellular matrix (lrECM). All cell lines formed tumour-like structures with a typical as well as reproducible morphology in the lrECM “on-top” model. The 3D morphologies were not correlated to the 2D phenotype of the CRC cell lines. Two different spheroid types were identified: a grape-like morphology with loose cell-cell interactions and a compact growing, mass-like spheroid. Interestingly, all grape-like spheroids were generated from cell lines derived from metastases, while all cell lines derived from primary tumours formed compact growing spheroids. A correlation between the migratory or the invasive capacity and the two different morphology types was not observed. Grape-like spheroids showed a significantly reduced overall cell proliferation compared to the compact growing spheroid type in the lrECM “on-top” assay. The observed, extensive morphological alterations in the lrECM “on-top” assay compared to 2D culture on plastic substrata were associated with measurable expression changes on the transcription- and protein-level. This was shown by the analysis of selected genes that play a crucial role in ECM-cell-interaction, cell-cell-adhesion und cell proliferation. In order to investigate the observed changes at the transcriptional level more globally, a transcriptome analysis of all seven investigated CRC cell lines was performed using Agilent Arrays. Hierarchical cluster analysis separated clearly the two culture conditions for every cell line according to their expression profiles demonstrating the considerable impact of the lrECM “on-top” culture on the cell lines. A set of 225 significantly differentially regulated genes was identified. Fourteen of these genes are known interaction partners and

most of them are involved in cell proliferation and apoptosis. This observation might explain the reduction of cell proliferation by 10-30% that was noted under lrECM “on-top” conditions. Furthermore, upon lrECM culture condition a reduced EGFR expression as well as a differential activation within the EGFR-pathway was observed. This resulted in a statistically significant decreased response to anti-EGFR therapy, which is from a clinical point of view a relevant finding considering the importance of EGFR for CRC therapy.

Taken together, the lrECM “on-top” cell culture model seems to represent a more physiological *in vitro* CRC tumour model. Of course, this model cannot represent all CRC progression steps from tumour initiation to metastasis. However, it should be a suitable model for the development of micrometastases, a most critical step for metastasis formation. In addition, the present work provides a first insight into the molecular changes associated with the interaction of CRC tumour cell lines with the lrECM. Since this lrECM model could be easily extended to a high-throughput scale, it could represent an effective *in vitro* strategy for preclinical therapeutic studies to test new adjuvant therapeutic substances under more realistic conditions.

7 Abkürzungsverzeichnis

A

AG1478	4-(3-Chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline
Akt1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
APC	Adenomatosis Polyposis Coli
AR	amphiregulin
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat

B

BCL6	B-cell CLL/lymphoma 6
BM	Basalmembran
BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BSA	Bovine Serum Albumin
BTC	betacellulin
BTG2	BTG family, member 2

C

cDNA	complementary DNA
CRC	Kolorektales Karzinom (colorectal cancer)
CSC	Tumorstammzelle (cancer stem cell)
C(t)	Cycle threshold

D

DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

E

ECACC	European Collection of Cell Cultures
ECM	Extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm

EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EPCAM	epithelial cell adhesion molecule
EPG	epigen
EPR	epiregulin
F	
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FBS	Fetal Bovine Serum
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
G	
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GNRH1	gonadotropin-releasing hormone 1
GTP	Guanosintriphosphat
H	
h	Stunden
HB-EGF	heparin bindung EGF-like growth factor
HER2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog
HNPCC	Hereditäres non-polypöse kolorektales Karzinom
HRP	horseradish peroxidase
I	
IC ₅₀	Konzentration eines Inhibitors, bei dem eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird
IgG1/2	Immunglobulin G1/2
J	
JUND	jun D proto-oncogene
K	
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
M	
MAPK/ p44/42 MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAZ	Metastase Asites Flüssigkeit
MCC	mutated in colorectal cancer

min	Minute
ml	Milliliter
MLH1	mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)
mLK	Metastasierender Lymphknoten
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA
MSH2	mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
L	
lrECM	Lamininreiche extrazelluläre Matrix
P	
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PIK3CA	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
PT	Primärtumor
R	
qRT-PCR	Quantitative Real-time PCR
RAS	rat sarcoma viral oncogene homolog
RIN	RNA Integrity Number
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
STR	Short tandem repeat
T	
TBST	Tris-Buffered Saline Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-Tetra-Methyl-Ethylenediamid
TGF- α	transforming growth factor- α
TKI	Tyrosinkinase Inhibitor
TNM	Tumor Lymphknoten Metastase (tumor nodal metastasis)

TP53	tumor protein p53
TGFBR2	transforming growth factor, beta receptor II
TGF- β	transforming growth factor, beta
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
U	
UICC	Union internationale contre le cancer
V	
VEGF	vascular endothelial growth factor
Z	
ZVS	Zellsuspensionsvolumen
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar

8 Literaturverzeichnis

Magazine

Abranches E, Bekman E, Henrique D, Cabral JM (2007). Expansion of mouse embryonic stem cells on microcarriers. *Biotechnol Bioeng* **96**: 1211-21.

Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ *et al* (2008). Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* **26**: 1626-34.

Amador ML, Hidalgo M (2004). Epidermal growth factor receptor as a therapeutic target for the treatment of colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* **4**: 51-62.

Arnold D, Seufferlein T (2010). Targeted treatments in colorectal cancer: state of the art and future perspectives. *Gut* **59**: 838-58.

Aumailley M, Battaglia C, Mayer U, Reinhardt D, Nischt R, Timpl R *et al* (1993). Nidogen mediates the formation of ternary complexes of basement membrane components. *Kidney Int* **43**: 7-12.

Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA (2008). Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer* **8**: 604-17.

Avraham R, Yarden Y (2011). Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 104-17.

Bachet JB, Afchain P, Fermanian C, Bouchahda M, Mitry E, Landi B *et al* (2007). Cetuximab efficacy in patients treated routinely in university hospitals. *Gastroenterol Clin Biol* **31**: 941-9.

Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM *et al* (1989). Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* **244**: 217-21.

Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B (1990a). Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* **249**: 912-5.

Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK *et al* (1990b). p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* **50**: 7717-22.

Balmain A, Gray J, Ponder B (2003). The genetics and genomics of cancer. *Nat Genet* **33 Suppl**: 238-44.

Barcellos-Hoff MH, Aggeler J, Ram TG, Bissell MJ (1989). Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane. *Development* **105**: 223-35.

-
- Baselga J (2002). Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *Oncologist* **7 Suppl 4**: 2-8.
- Bellis SL (2004). Variant glycosylation: an underappreciated regulatory mechanism for beta1 integrins. *Biochim Biophys Acta* **1663**: 52-60.
- Benton G, George J, Kleinman HK, Arnaoutova IP (2009). Advancing science and technology via 3D culture on basement membrane matrix. *J Cell Physiol* **221**: 18-25.
- Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S *et al* (2007). Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res* **67**: 2643-8.
- Berardi R, Onofri A, Pistelli M, Maccaroni E, Scartozzi M, Pierantoni C *et al* (2010). Panitumumab: the evidence for its use in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Core Evid* **5**: 61-76.
- Berridge MV, Tan AS (1993). Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **303**: 474- 82
- Bild AH, Yao G, Chang JT, Wang Q, Potti A, Chasse D *et al* (2006). Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature* **439**: 353-7.
- Bissell MJ, Kenny PA, Radisky DC (2005). Microenvironmental regulators of tissue structure and function also regulate tumor induction and progression: the role of extracellular matrix and its degrading enzymes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **70**: 343-56.
- Bissell MJ, Radisky DC, Rizki A, Weaver VM, Petersen OW (2002). The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation* **70**: 537-46.
- Bissell MJ, Rizki A, Mian IS (2003). Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Curr Opin Cell Biol* **15**: 753-62.
- Bobbink IW, de Boer HC, Tekelenburg WL, Banga JD, de Groot PG (1997a). Effect of extracellular matrix glycation on endothelial cell adhesion and spreading: involvement of vitronectin. *Diabetes* **46**: 87-93.
- Bobbink IW, Tekelenburg WL, Sixma JJ, de Boer HC, Banga JD, de Groot PG (1997b). Glycated proteins modulate tissue-plasminogen activator-catalyzed plasminogen activation. *Biochem Biophys Res Commun* **240**: 595-601.
- Boland CR, Koi M, Chang DK, Carethers JM (2008). The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer* **7**: 41-52.

-
- Boman BM, Wicha MS (2008). Cancer stem cells: a step toward the cure. *J Clin Oncol* **26**: 2795-9.
- Bonnet D, Dick JE (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* **3**: 730-7.
- Bos JL (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* **49**: 4682-9.
- Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ *et al* (1987). Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* **327**: 293-7.
- Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG (2010). Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol* **20**: 161-8.
- Bowers SL, Banerjee I, Baudino TA (2009). The extracellular matrix: at the center of it all. *J Mol Cell Cardiol* **48**: 474-82.
- Boyden S (1962). The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* **115**: 453-66.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA (1994). Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* **264**: 569-71.
- Carteni G, Fiorentino R, Vecchione L, Chiurazzi B, Battista C (2007). Panitumumab a novel drug in cancer treatment. *Ann Oncol* **18 Suppl 6**: vi16-21.
- Carter WG, Wayner EA, Bouchard TS, Kaur P (1990). The role of integrins alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 in cell-cell and cell-substrate adhesion of human epidermal cells. *J Cell Biol* **110**: 1387-404.
- Chen Q, Kinch MS, Lin TH, Burrridge K, Juliano RL (1994). Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **269**: 26602-5.
- Cho KR, Vogelstein B (1992). Genetic alterations in the adenoma--carcinoma sequence. *Cancer* **70**: 1727-31.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-9.
- Ciardiello F, Tortora G (2008). EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* **358**: 1160-74.
- Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL *et al* (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* **66**: 9339-44.

-
- Compton SJ, Jones CG (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* **151**: 369-74.
- Costa FF, Le Blanc K, Brodin B (2007). Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer. *Stem Cells* **25**: 707-11.
- Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J *et al* (1985). Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* **230**: 1132-9.
- Cox D, Brennan M, Moran N (2010). Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **9**: 804-20.
- Cukierman E, Pankov R, Yamada KM (2002). Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol* **14**: 633-9.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y *et al* (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**: 231-41.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S *et al* (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**: 949-54.
- de Pereda JM, Ortega E, Alonso-Garcia N, Gomez-Hernandez M, Sonnenberg A (2009). Advances and perspectives of the architecture of hemidesmosomes: lessons from structural biology. *Cell Adh Migr* **3**: 361-4.
- De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N *et al* (2008). KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol* **19**: 508-15.
- Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS (2003). Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* **30**: 256-68.
- del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* **278**: 687-9.
- Delbaldo C, Raymond E, Vera K, Hammershaimb L, Kaucic K, Lozahic S *et al* (2008). Phase I and pharmacokinetic study of etaracizumab (Abegrin), a humanized monoclonal antibody against alphavbeta3 integrin receptor, in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs* **26**: 35-43.
- Derynck R, Roberts AB, Winkler ME, Chen EY, Goeddel DV (1984). Human transforming growth factor-alpha: precursor structure and expression in *E. coli*. *Cell* **38**: 287-97.
- Deschoolmeester V, Baay M, Specenier P, Lardon F, Vermorcken JB (2010). A review of the most promising biomarkers in colorectal cancer: one step closer to targeted therapy. *Oncologist* **15**: 699-731.

-
- Dexter DL, Barbosa JA, Calabresi P (1979). N,N-dimethylformamide-induced alteration of cell culture characteristics and loss of tumorigenicity in cultured human colon carcinoma cells. *Cancer Res* **39**: 1020-5.
- Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P *et al* (2008). Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* **26**: 5705-12.
- Douglas EJ, Fiegler H, Rowan A, Halford S, Bicknell DC, Bodmer W *et al* (2004). Array comparative genomic hybridization analysis of colorectal cancer cell lines and primary carcinomas. *Cancer Res* **64**: 4817-25.
- Drewinko B, Romsdahl MM, Yang LY, Ahearn MJ, Trujillo JM (1976). Establishment of a human carcinoembryonic antigen-producing colon adenocarcinoma cell line. *Cancer Res* **36**: 467-75.
- Efeyan A, Serrano M (2007). p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle* **6**: 1006-10.
- Elsdale T, Bard J (1972). Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol* **54**: 626-37.
- Erickson AC, Couchman JR (2000). Still more complexity in mammalian basement membranes. *J Histochem Cytochem* **48**: 1291-306.
- Farioli-Vecchioli S, Tanori M, Micheli L, Mancuso M, Leonardi L, Saran A *et al* (2007). Inhibition of medulloblastoma tumorigenesis by the antiproliferative and pro-differentiative gene PC3. *FASEB J* **21**: 2215-25.
- Fearon ER (2010). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol* **6**: 479-507.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9**: 669-76.
- Flatmark K, Maelandsmo GM, Martinsen M, Rasmussen H, Fodstad O (2004). Twelve colorectal cancer cell lines exhibit highly variable growth and metastatic capacities in an orthotopic model in nude mice. *Eur J Cancer* **40**: 1593-8.
- Freeman DJ, Juan T, Reiner M, Hecht JR, Meropol NJ, Berlin J *et al* (2008). Association of K-ras mutational status and clinical outcomes in patients with metastatic colorectal cancer receiving panitumumab alone. *Clin Colorectal Cancer* **7**: 184-90.
- Futaki S, Hayashi Y, Yamashita M, Yagi K, Bono H, Hayashizaki Y *et al* (2003). Molecular basis of constitutive production of basement membrane components. Gene expression profiles of Engelbreth-Holm-Swarm tumor and F9 embryonal carcinoma cells. *J Biol Chem* **278**: 50691-701.
- Garcia-Saenz JA, Sastre J, Diaz-Rubio Garcia E (2009). Biomarkers and anti-EGFR therapies for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Clin Transl Oncol* **11**: 737-47.
-

-
- Ghajar CM, Bissell MJ (2008). Extracellular matrix control of mammary gland morphogenesis and tumorigenesis: insights from imaging. *Histochem Cell Biol* **130**: 1105-18.
- Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK (2010). Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J* **278**: 16-27.
- Giancotti FG, Ruoslahti E (1999). Integrin signaling. *Science* **285**: 1028-32.
- Gil J, Stembalska A, Pesz KA, Sasiadek MM (2008). Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *J Appl Genet* **49**: 193-9.
- Goss KH, Groden J (2000). Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol* **18**: 1967-79.
- Grady WM, Markowitz SD (2002). Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **3**: 101-28.
- Gray A, Dull TJ, Ullrich A (1983). Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000-molecular weight protein precursor. *Nature* **303**: 722-5.
- Green KJ, Jones JC (1996). Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *FASEB J* **10**: 871-81.
- Grobstein C (1953). Morphogenetic interaction between embryonic mouse tissues separated by a membrane filter. *Nature* **172**: 869-70.
- Guardavaccaro D, Corrente G, Covone F, Micheli L, D'Agnano I, Starace G *et al* (2000). Arrest of G(1)-S progression by the p53-inducible gene PC3 is Rb dependent and relies on the inhibition of cyclin D1 transcription. *Mol Cell Biol* **20**: 1797-815.
- Hagios C, Lochter A, Bissell MJ (1998). Tissue architecture: the ultimate regulator of epithelial function? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **353**: 857-70.
- Hamilton G (1998). Multicellular spheroids as an in vitro tumor model. *Cancer Lett* **131**: 29-34.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.
- Harma V, Virtanen J, Makela R, Happonen A, Mpindi JP, Knuutila M *et al* (2010). A comprehensive panel of three-dimensional models for studies of prostate cancer growth, invasion and drug responses. *PLoS One* **5**: e10431.
- Hashimoto Y, Skacel M, Adams JC (2008). Association of loss of epithelial syndecan-1 with stage and local metastasis of colorectal adenocarcinomas: an immunohistochemical study of clinically annotated tumors. *BMC Cancer* **8**: 185.
- Heinemann V, Hoff PM (2010). Bevacizumab plus irinotecan-based regimens in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Oncology* **79**: 118-28.

-
- Hemming AW, Davis NL, Klufftinger A, Robinson B, Quenville NF, Liseman B *et al* (1992). Prognostic markers of colorectal cancer: an evaluation of DNA content, epidermal growth factor receptor, and Ki-67. *J Surg Oncol* **51**: 147-52.
- Hermanek P (1989). Colorectal carcinoma: histopathological diagnosis and staging. *Baillieres Clin Gastroenterol* **3**: 511-29.
- Herrera L, Kakati S, Gibas L, Pietrzak E, Sandberg AA (1986). Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. *Am J Med Genet* **25**: 473-6.
- Higashiyama S, Abraham JA, Miller J, Fiddes JC, Klagsbrun M (1991). A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* **251**: 936-9.
- Hill CS, Treisman R (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* **80**: 199-211.
- Hussain SP, Harris CC (2006). p53 biological network: at the crossroads of the cellular-stress response pathway and molecular carcinogenesis. *J Nippon Med Sch* **73**: 54-64.
- Hynes NE, Lane HA (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* **5**: 341-54.
- Hynes RO (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**: 673-87.
- Hynes RO (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* **326**: 1216-9.
- Hynes RO, Yamada KM (1982). Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol* **95**: 369-77.
- Ip YT, Davis RJ (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 205-19.
- Issa JP (2004). CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* **4**: 988-93.
- Iyer L, Ratain MJ (1998). Clinical pharmacology of camptothecins. *Cancer Chemother Pharmacol* **42 Suppl**: S31-43.
- Janik ME, Litynska A, Vereecken P (2010). Cell migration-the role of integrin glycosylation. *Biochim Biophys Acta* **1800**: 545-55.
- Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW (2010). Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* **138**: 2044-58.
- Jin H, Varner J (2004). Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br J Cancer* **90**: 561-5.
- Kalluri R, Zeisberg M (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**: 392-401.
- Kandel ES, Skeen J, Majewski N, Di Cristofano A, Pandolfi PP, Feliciano CS *et al* (2002). Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage. *Mol Cell Biol* **22**: 7831-41.
-

- Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H *et al* (1997). Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* **57**: 808-11.
- Kanwar SS, Yu Y, Nautiyal J, Patel BB, Majumdar AP (2010). The Wnt/beta-catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres. *Mol Cancer* **9**: 212.
- Katoh S, Miyagi T, Taniguchi H, Matsubara Y, Kadota J, Tominaga A *et al* (1999). Cutting edge: an inducible sialidase regulates the hyaluronic acid binding ability of CD44-bearing human monocytes. *J Immunol* **162**: 5058-61.
- Kenny PA (2007). Three-dimensional extracellular matrix culture models of EGFR signalling and drug response. *Biochem Soc Trans* **35**: 665-8.
- Kenny PA, Lee GY, Myers CA, Neve RM, Semeiks JR, Spellman PT *et al* (2007). The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol* **1**: 84-96.
- Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S *et al* (2005). Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* **121**: 823-35.
- Kim SH, Turnbull JE, Guimond SE (2011). Extracellular matrix and cell signalling - the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol*.
- Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ *et al* (1991). Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* **251**: 1366-70.
- Kinzler KW, Vogelstein B (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**: 159-70.
- Kleinman HK, Klebe RJ, Martin GR (1981). Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J Cell Biol* **88**: 473-85.
- Kleinman HK, Martin GR (2005). Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* **15**: 378-86.
- Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW *et al* (1986). Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* **25**: 312-8.
- Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K, Martin GR (1982). Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* **21**: 6188-93.
- Kondo Y, Issa JP (2004). Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* **23**: 29-39.
- Kraus MH, Issing W, Miki T, Popescu NC, Aaronson SA (1989). Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor

-
- family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 9193-7.
- Kruser TJ, Wheeler DL (2010). Mechanisms of resistance to HER family targeting antibodies. *Exp Cell Res* **316**: 1083-100.
- Labianca R, Beretta GD, Kildani B, Milesi L, Merlin F, Mosconi S *et al* (2010). Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **74**: 106-33.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.
- Landen CN, Kim TJ, Lin YG, Merritt WM, Kamat AA, Han LY *et al* (2008). Tumor-selective response to antibody-mediated targeting of alphavbeta3 integrin in ovarian cancer. *Neoplasia* **10**: 1259-67.
- Lee GY, Kenny PA, Lee EH, Bissell MJ (2007). Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat Methods* **4**: 359-65.
- Lee JW, Juliano RL (2000). alpha5beta1 integrin protects intestinal epithelial cells from apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B-dependent pathway. *Mol Biol Cell* **11**: 1973-87.
- Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB, 3rd, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND (1976). Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* **36**: 4562-9.
- Lelievre SA (2010). Tissue polarity-dependent control of mammary epithelial homeostasis and cancer development: an epigenetic perspective. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **15**: 49-63.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* **386**: 623-7.
- Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT *et al* (2009). Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* **139**: 891-906.
- Levine AJ, Momand J, Finlay CA (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature* **351**: 453-6.
- Levitzki A (2002). Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *Eur J Cancer* **38 Suppl 5**: S11-8.
- Levitzki A, Gazit A (1995). Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* **267**: 1782-8.
- Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V *et al* (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* **67**: 1030-7.
- Li ML, Aggeler J, Farson DA, Hatier C, Hassell J, Bissell MJ (1987). Influence of a reconstituted basement membrane and its components on casein gene expression and secretion in mouse mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 136-40.
-

Li Q, Chow AB, Mattingly RR (2009). Three-dimensional overlay culture models of human breast cancer reveal a critical sensitivity to mitogen-activated protein kinase kinase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* **332**: 821-8.

Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF *et al* (2006). KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* **66**: 3992-5.

Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S (1980). Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* **284**: 67-8.

Litjens SH, de Pereda JM, Sonnenberg A (2006). Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes. *Trends Cell Biol* **16**: 376-83.

Liu H, Radisky DC, Wang F, Bissell MJ (2004). Polarity and proliferation are controlled by distinct signaling pathways downstream of PI3-kinase in breast epithelial tumor cells. *J Cell Biol* **164**: 603-12.

Liu Y, Gray NS (2006). Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nat Chem Biol* **2**: 358-64.

Lu Z, Jiang G, Blume-Jensen P, Hunter T (2001). Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* **21**: 4016-31.

Luo ZJ, King RH, Lewin J, Thomas PK (2002). Effects of nonenzymatic glycosylation of extracellular matrix components on cell survival and sensory neurite extension in cell culture. *J Neurol* **249**: 424-31.

Lurje G, Lenz HJ (2009). EGFR signaling and drug discovery. *Oncology* **77**: 400-10.

Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO *et al* (2007). Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* **132**: 2542-56.

Mainiero F, Murgia C, Wary KK, Curatola AM, Pepe A, Blumberg M *et al* (1997). The coupling of alpha6beta4 integrin to Ras-MAP kinase pathways mediated by Shc controls keratinocyte proliferation. *EMBO J* **16**: 2365-75.

Malda J, Kreijveld E, Temenoff JS, van Blitterswijk CA, Riesle J (2003a). Expansion of human nasal chondrocytes on macroporous microcarriers enhances redifferentiation. *Biomaterials* **24**: 5153-61.

Malda J, van Blitterswijk CA, Grojec M, Martens DE, Tramper J, Riesle J (2003b). Expansion of bovine chondrocytes on microcarriers enhances redifferentiation. *Tissue Eng* **9**: 939-48.

Manning BD, Cantley LC (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**: 1261-74.

-
- Marinkovich MP (2007). Tumour microenvironment: laminin 332 in squamous-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer* **7**: 370-80.
- Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J *et al* (1995). Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* **268**: 1336-8.
- Markowitz SD, Bertagnolli MM (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med* **361**: 2449-60.
- Masters JR (2000). Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 233-6.
- Matsuda Y, Ishiwata T, Kawamoto Y, Kawahara K, Peng WX, Yamamoto T *et al* (2011). Morphological and cytoskeletal changes of pancreatic cancer cells in three-dimensional spheroidal culture. *Med Mol Morphol* **43**: 211-7.
- Mayer A, Takimoto M, Fritz E, Schellander G, Kofler K, Ludwig H (1993). The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and mdr gene expression in colorectal cancer. *Cancer* **71**: 2454-60.
- Mayo LD, Donner DB (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 11598-603.
- Mayo LD, Donner DB (2002). The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends Biochem Sci* **27**: 462-7.
- Mendelsohn J, Baselga J (2006). Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin Oncol* **33**: 369-85.
- Meyerhardt JA, Mayer RJ (2005). Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* **352**: 476-87.
- Mimura Y, Sondermann P, Ghirlando R, Lund J, Young SP, Goodall M *et al* (2001). Role of oligosaccharide residues of IgG1-Fc in Fc gamma RIIb binding. *J Biol Chem* **276**: 45539-47.
- Montagnoli A, Guardavaccaro D, Starace G, Tirone F (1996). Overexpression of the nerve growth factor-inducible PC3 immediate early gene is associated with growth inhibition. *Cell Growth Differ* **7**: 1327-36.
- Moschos SJ, Drogowski LM, Reppert SL, Kirkwood JM (2007). Integrins and cancer. *Oncology (Williston Park)* **21**: 13-20.
- Moschos SJ, Sander CA, Wang W, Reppert SL, Drogowski LM, Jukic DM *et al* (2010). Pharmacodynamic (phase 0) study using etaracizumab in advanced melanoma. *J Immunother* **33**: 316-25.
- Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55-63.
-

-
- Munz M, Fellingner K, Hofmann T, Schmitt B, Gires O (2008). Glycosylation is crucial for stability of tumour and cancer stem cell antigen EpCAM. *Front Biosci* **13**: 5195-201.
- Nagane M, Levitzki A, Gazit A, Cavenee WK, Huang HJ (1998). Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5724-9.
- Nagane M, Narita Y, Mishima K, Levitzki A, Burgess AW, Cavenee WK *et al* (2001). Human glioblastoma xenografts overexpressing a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor sensitized to cisplatin by the AG1478 tyrosine kinase inhibitor. *J Neurosurg* **95**: 472-9.
- Nelson CM, Bissell MJ (2006). Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**: 287-309.
- Nguyen NP, Almeida FS, Chi A, Nguyen LM, Cohen D, Karlsson U *et al* (2010). Molecular biology of breast cancer stem cells: potential clinical applications. *Cancer Treat Rev* **36**: 485-91.
- Nosho K, Irahara N, Shima K, Kure S, Kirkner GJ, Schernhammer ES *et al* (2008). Comprehensive biostatistical analysis of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer using a large population-based sample. *PLoS One* **3**: e3698.
- Oliveira LR, Jeffrey SS, Ribeiro-Silva A (2010). Stem cells in human breast cancer. *Histol Histopathol* **25**: 371-85.
- Ono M, Hakomori S (2004). Glycosylation defining cancer cell motility and invasiveness. *Glycoconj J* **20**: 71-8.
- Osherov N, Gazit A, Gilon C, Levitzki A (1993). Selective inhibition of the epidermal growth factor and HER2/neu receptors by tyrphostins. *J Biol Chem* **268**: 11134-42.
- Overman MJ, Hoff PM (2007). EGFR-targeted therapies in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* **50**: 1259-70.
- Oz OK, Campbell A, Tao TW (1989). Reduced cell adhesion to fibronectin and laminin is associated with altered glycosylation of beta 1 integrins in a weakly metastatic glycosylation mutant. *Int J Cancer* **44**: 343-7.
- Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 839-45.
- Papailiou J, Bramis KJ, Gazouli M, Theodoropoulos G (2010). Stem cells in colon cancer. A new era in cancer theory begins. *Int J Colorectal Dis* **26**: 1-11.
- Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ (2003). Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* **3**: 895-902.
-

-
- Park CC, Zhang H, Pallavicini M, Gray JW, Baehner F, Park CJ *et al* (2006). Beta1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo. *Cancer Res* **66**: 1526-35.
- Partik G, Hochegger K, Schorkhuber M, Marian B (1999). Inhibition of epidermal-growth-factor-receptor-dependent signalling by tyrphostins A25 and AG1478 blocks growth and induces apoptosis in colorectal tumor cells in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* **125**: 379-88.
- Pauli C, Munz M, Kieu C, Mack B, Breinl P, Wollenberg B *et al* (2003). Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule EpCAM in head and neck carcinomas. *Cancer Lett* **193**: 25-32.
- Petersen OW, Ronnov-Jessen L, Howlett AR, Bissell MJ (1992). Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 9064-8.
- Pfeiffer P, Qvortrup C, Eriksen JG (2007). Current role of antibody therapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Oncogene* **26**: 3661-78.
- Pickl M, Ries CH (2009). Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab. *Oncogene* **28**: 461-8.
- Pino MS, Chung DC (2010). The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* **138**: 2059-72.
- Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS, Green JM, Carlton GW, Foy L *et al* (1993). Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 1746-50.
- Plowman GD, Whitney GS, Neubauer MG, Green JM, McDonald VL, Todaro GJ *et al* (1990). Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4905-9.
- Ponz de Leon M, Di Gregorio C (2001). Pathology of colorectal cancer. *Dig Liver Dis* **33**: 372-88.
- Potten CS, Loeffler M (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* **110**: 1001-20.
- Potti A, Dressman HK, Bild A, Riedel RF, Chan G, Sayer R *et al* (2006). Genomic signatures to guide the use of chemotherapeutics. *Nat Med* **12**: 1294-300.
- Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, Mifflin RC (2005). Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**: G2-7.
- Qin J, Vinogradova O, Plow EF (2004). Integrin bidirectional signaling: a molecular view. *PLoS Biol* **2**: e169.

-
- Radaev S, Sun PD (2001). Recognition of IgG by Fcγ receptor. The role of Fc glycosylation and the binding of peptide inhibitors. *J Biol Chem* **276**: 16478-83.
- Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE (2002). Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* **418**: 934.
- Ramaswamy S, Nakamura N, Vazquez F, Batt DB, Perera S, Roberts TM *et al* (1999). Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 2110-5.
- Raymond E, Faivre S, Woynarowski JM, Chaney SG (1998). Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin Oncol* **25**: 4-12.
- Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C *et al* (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**: 111-5.
- Rizzo S, Bronte G, Fanale D, Corsini L, Silvestris N, Santini D *et al* (2010). Prognostic vs predictive molecular biomarkers in colorectal cancer: is KRAS and BRAF wild type status required for anti-EGFR therapy? *Cancer Treat Rev* **36 Suppl 3**: S56-61.
- Rousset M (1986). The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* **68**: 1035-40.
- Rowe RG, Weiss SJ (2009). Navigating ECM barriers at the invasive front: the cancer cell-stroma interface. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**: 567-95.
- Rudzki Z, Jothy S (1997). CD44 and the adhesion of neoplastic cells. *Mol Pathol* **50**: 57-71.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT *et al* (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-91.
- Savage CR, Jr., Cohen S (1972). Epidermal growth factor and a new derivative. Rapid isolation procedures and biological and chemical characterization. *J Biol Chem* **247**: 7609-11.
- Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M *et al* (2008). Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* **451**: 345-9.
- Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI *et al* (1984). The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* **312**: 513-6.
- Scheele S, Nystrom A, Durbeej M, Talts JF, Ekblom M, Ekblom P (2007). Laminin isoforms in development and disease. *J Mol Med* **85**: 825-36.
- Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P (1994). Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* **372**: 786-91.
- Seales EC, Jurado GA, Singhal A, Bellis SL (2003). Ras oncogene directs expression of a differentially sialylated, functionally altered beta1 integrin. *Oncogene* **22**: 7137-45.
-

- Seger R, Krebs EG (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J* **9**: 726-35.
- Seimetz D, Lindhofer H, Bokemeyer C (2010). Development and approval of the trifunctional antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) as a targeted cancer immunotherapy. *Cancer Treat Rev* **36**: 458-67.
- Semple TU, Quinn LA, Woods LK, Moore GE (1978). Tumor and lymphoid cell lines from a patient with carcinoma of the colon for a cytotoxicity model. *Cancer Res* **38**: 1345-55.
- Shapiro L, Cohen S (1997). Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. *Biomaterials* **18**: 583-90.
- Sharma SV, Haber DA, Settleman J (2010). Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat Rev Cancer* **10**: 241-53.
- Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH (2010). The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 288-300.
- Shepard HM, Brdlik CM, Schreiber H (2008). Signal integration: a framework for understanding the efficacy of therapeutics targeting the human EGFR family. *J Clin Invest* **118**: 3574-81.
- Shimada K, Nakamura M, De Velasco MA, Tanaka M, Ouji Y, Miyake M *et al* (2010). Role of syndecan-1 (CD138) in cell survival of human urothelial carcinoma. *Cancer Sci* **101**: 155-60.
- Shing Y, Christofori G, Hanahan D, Ono Y, Sasada R, Igarashi K *et al* (1993). Betacellulin: a mitogen from pancreatic beta cell tumors. *Science* **259**: 1604-7.
- Shoyab M, Plowman GD, McDonald VL, Bradley JG, Todaro GJ (1989). Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. *Science* **243**: 1074-6.
- Shu XZ, Ahmad S, Liu Y, Prestwich GD (2006). Synthesis and evaluation of injectable, in situ crosslinkable synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* **79**: 902-12.
- Shushan A, Rojansky N, Laufer N, Klein BY, Shlomai Z, Levitzki R *et al* (2004). The AG1478 tyrosine kinase inhibitor is an effective suppressor of leiomyoma cell growth. *Hum Reprod* **19**: 1957-67.
- Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Balfour J, Bardelli A (2009). Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* **101**: 1308-24.
- Silva R, D'Amico G, Hodivala-Dilke KM, Reynolds LE (2008). Integrins: the keys to unlocking angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**: 1703-13.
- Simon-Assmann P, Kedinger M, De Arcangelis A, Rousseau V, Simo P (1995). Extracellular matrix components in intestinal development. *Experientia* **51**: 883-900.

Simons M, Mlodzik M (2008). Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annu Rev Genet* **42**: 517-40.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T *et al* (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**: 396-401.

Sobrero A, Guglielmi A, Grossi F, Puglisi F, Aschele C (2000). Mechanism of action of fluoropyrimidines: relevance to the new developments in colorectal cancer chemotherapy. *Semin Oncol* **27**: 72-7.

Steele RE, Preston AS, Johnson JP, Handler JS (1986). Porous-bottom dishes for culture of polarized cells. *Am J Physiol* **251**: C136-9.

Strachan L, Murison JG, Prestidge RL, Sleeman MA, Watson JD, Kumble KD (2001). Cloning and biological activity of epigen, a novel member of the epidermal growth factor superfamily. *J Biol Chem* **276**: 18265-71.

Sundstrom M, Edlund K, Lindell M, Glimelius B, Birgisson H, Micke P *et al* (2010). KRAS analysis in colorectal carcinoma: analytical aspects of Pyrosequencing and allele-specific PCR in clinical practice. *BMC Cancer* **10**: 660.

Sutherland RM (1988). Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* **240**: 177-84.

Svendsen CN, ter Borg MG, Armstrong RJ, Rosser AE, Chandran S, Ostenfeld T *et al* (1998). A new method for the rapid and long term growth of human neural precursor cells. *J Neurosci Methods* **85**: 141-52.

Tamkun JW, DeSimone DW, Fonda D, Patel RS, Buck C, Horwitz AF *et al* (1986). Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* **46**: 271-82.

Tannapfel A, Wittekind C (2010). [The current TNM system for gastrointestinal tumors part II]. *Pathologe* **31**: 348-52.

Teye K, Tsuneoka M, Arima N, Koda Y, Nakamura Y, Ueta Y *et al* (2004). Increased expression of a Myc target gene Mina53 in human colon cancer. *Am J Pathol* **164**: 205-16.

Theocharis AD (2002). Human colon adenocarcinoma is associated with specific post-translational modifications of versican and decorin. *Biochim Biophys Acta* **1588**: 165-72.

Thliveris A, Albertsen H, Tuohy T, Carlson M, Groden J, Joslyn G *et al* (1996). Long-range physical map and deletion characterization of the 1100-kb NotI restriction fragment harboring the APC gene. *Genomics* **34**: 268-70.

Toyoda H, Komurasaki T, Ikeda Y, Yoshimoto M, Morimoto S (1995). Molecular cloning of mouse epiregulin, a novel epidermal growth factor-related protein, expressed in the early stage of development. *FEBS Lett* **377**: 403-7.

-
- Treisman R (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* **8**: 205-15.
- Tsuneoka M, Koda Y, Soejima M, Teye K, Kimura H (2002). A novel myc target gene, mina53, that is involved in cell proliferation. *J Biol Chem* **277**: 35450-9.
- Tsuruta D, Kobayashi H, Imanishi H, Sugawara K, Ishii M, Jones JC (2008). Laminin-332-integrin interaction: a target for cancer therapy? *Curr Med Chem* **15**: 1968-75.
- Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW *et al* (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* **309**: 418-25.
- Varki A (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**: 97-130.
- Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S *et al* (1998). Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 8698-702.
- Vermeulen L, Sprick MR, Kemper K, Stassi G, Medema JP (2008a). Cancer stem cells--old concepts, new insights. *Cell Death Differ* **15**: 947-58.
- Vermeulen L, Todaro M, de Sousa Mello F, Sprick MR, Kemper K, Perez Alea M *et al* (2008b). Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 13427-32.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M *et al* (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* **319**: 525-32.
- Vogelstein B, Kinzler KW (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **10**: 789-99.
- Volchenboum SL, Li C, Li S, Attiyeh EF, Reynolds CP, Maris JM *et al* (2009). Comparison of primary neuroblastoma tumors and derivative early-passage cell lines using genome-wide single nucleotide polymorphism array analysis. *Cancer Res* **69**: 4143-9.
- Wagenaar-Miller RA, Gorden L, Matrisian LM (2004). Matrix metalloproteinases in colorectal cancer: is it worth talking about? *Cancer Metastasis Rev* **23**: 119-35.
- Wang F, Hansen RK, Radisky D, Yoneda T, Barcellos-Hoff MH, Petersen OW *et al* (2002). Phenotypic reversion or death of cancer cells by altering signaling pathways in three-dimensional contexts. *J Natl Cancer Inst* **94**: 1494-503.
- Wang F, Weaver VM, Petersen OW, Larabell CA, Dedhar S, Briand P *et al* (1998). Reciprocal interactions between beta1-integrin and epidermal growth factor receptor in three-dimensional basement membrane breast cultures: a different perspective in epithelial biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14821-6.
-

Waterman EA, Sakai N, Nguyen NT, Horst BA, Veitch DP, Dey CN *et al* (2007). A laminin-collagen complex drives human epidermal carcinogenesis through phosphoinositol-3-kinase activation. *Cancer Res* **67**: 4264-70.

Weaver VM, Lelievre S, Lakins JN, Chrenek MA, Jones JC, Giancotti F *et al* (2002). beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell* **2**: 205-16.

Weaver VM, Petersen OW, Wang F, Larabell CA, Briand P, Damsky C *et al* (1997). Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol* **137**: 231-45.

Weigelt B, Lo AT, Park CC, Gray JW, Bissell MJ (2009). HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment. *Breast Cancer Res Treat* **122**: 35-43.

Wicha MS, Liu S, Dontu G (2006). Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res* **66**: 1883-90; discussion 1895-6.

Worthley DL, Giraud AS, Wang TC (2010). The extracellular matrix in digestive cancer. *Cancer Microenviron* **3**: 177-85.

Xu R, Boudreau A, Bissell MJ (2009). Tissue architecture and function: dynamic reciprocity via extra- and intra-cellular matrices. *Cancer Metastasis Rev* **28**: 167-76.

Yaish P, Gazit A, Gilon C, Levitzki A (1988). Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors. *Science* **242**: 933-5.

Yamada KM, Cukierman E (2007). Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell* **130**: 601-10.

Yang Y, Rossi FM, Putnins EE (2007). Ex vivo expansion of rat bone marrow mesenchymal stromal cells on microcarrier beads in spin culture. *Biomaterials* **28**: 3110-20.

Yarden Y, Sliwkowski MX (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 127-37.

Yeung TM, Gandhi SC, Wilding JL, Muschel R, Bodmer WF (2010). Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 3722-7.

Yokosaki Y, Monis H, Chen J, Sheppard D (1996). Differential effects of the integrins alpha9beta1, alpha5beta3, and alpha5beta6 on cell proliferative responses to tenascin. Roles of the beta subunit extracellular and cytoplasmic domains. *J Biol Chem* **271**: 24144-50.

Yurchenco PD, Cheng YS, Colognato H (1992). Laminin forms an independent network in basement membranes. *J Cell Biol* **117**: 1119-33.

Zhang J, Yang PL, Gray NS (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* **9**: 28-39.

Zhang L, Huang H, Wu K, Wang M, Wu B (2010). Impact of BTG2 expression on proliferation and invasion of gastric cancer cells in vitro. *Mol Biol Rep* **37**: 2579-86.

Zhang W, Liu HT (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* **12**: 9-18.

Zhang YG, Du Q, Fang WG, Jin ML, Tian XX (2008). Tyrphostin AG1478 suppresses proliferation and invasion of human breast cancer cells. *Int J Oncol* **33**: 595-602.

Zhang ZG, Harstrick A, Rustum YM (1992). Modulation of fluoropyrimidines: role of dose and schedule of leucovorin administration. *Semin Oncol* **19**: 10-5.

Zheng M, Fang H, Hakomori S (1994). Functional role of N-glycosylation in alpha 5 beta 1 integrin receptor. De-N-glycosylation induces dissociation or altered association of alpha 5 and beta 1 subunits and concomitant loss of fibronectin binding activity. *J Biol Chem* **269**: 12325-31.

Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC (2001). HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* **3**: 973-82.

Zhuang S, Dang Y, Schnellmann RG (2004). Requirement of the epidermal growth factor receptor in renal epithelial cell proliferation and migration. *Am J Physiol Renal Physiol* **287**: F365-72.

Fachbücher

Grundmann, E. (1992), Allgemeine Pathologie, 2. Auflage. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag

Lodish H., Berk A., Kaiser C et al (2008), Integrating cells into tissues. In: Molecular cell biology, 6th edition. New York: Freeman.)

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989), Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor

Anhang

Tabelle 1: Auflistung der Gene die zwischen den beiden Kultursystemen, 2D versus IrECM „on-top (3D) Modell, signifikant unterschiedlich reguliert wurden.

Symbol	Name	Fold Change 3D versus 2D	Regulation 3D versus 2D	Gen ID
NDRG1	Homo sapiens N-myc downstream regulated 1 (NDRG1), transcript variant 2, mRNA [NM_006096]	7,01	up	10397
CHAC1	Homo sapiens ChaC, cation transport regulator homolog 1 (E. coli) (CHAC1), transcript variant 1, mRNA [NM_024111]	5,09	down	79094
ALDOC	Homo sapiens aldolase C, fructose-bisphosphate (ALDOC), mRNA [NM_005165]	5,01	up	230
CHAC1	Homo sapiens ChaC, cation transport regulator homolog 1 (E. coli) (CHAC1), transcript variant 1, mRNA [NM_024111]	4,59	down	79094
PPFIA4	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 4 (PPFIA4), mRNA [NM_015053]	4,49	up	8497
BCL6	Homo sapiens B-cell CLL/lymphoma 6 (BCL6), transcript variant 2, mRNA [NM_001130845]	3,27	up	604
		3,25	up	
ULBP1	Homo sapiens UL16 binding protein 1 (ULBP1), mRNA [NM_025218]	3,13	down	80329
FGF21	Homo sapiens fibroblast growth factor 21 (FGF21), mRNA [NM_019113]	3,08	down	26291
PFKFB4	Homo sapiens 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4 (PFKFB4), mRNA [NM_004567]	2,93	up	5210
		2,81	up	
MBD5	Homo sapiens methyl-CpG binding domain protein 5 (MBD5), mRNA [NM_018328]	2,77	up	55777
FUT1	Homo sapiens fucosyltransferase 1 (galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase, H blood group) (FUT1), mRNA [NM_000148]	2,71	down	2523
PNRC1	Homo sapiens proline-rich nuclear receptor coactivator 1 (PNRC1), mRNA [NM_006813]	2,70	up	10957
ZBTB1	Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 1 (ZBTB1), transcript variant 2, mRNA [NM_014950]	2,69	up	22890
SLC6A9	Homo sapiens solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9 (SLC6A9), transcript variant 2, mRNA [NM_201649]	2,65	down	6536
PER1	Homo sapiens period homolog 1 (Drosophila) (PER1), mRNA [NM_002616]	2,59	up	5187
PNRC1	Homo sapiens proline-rich nuclear receptor coactivator 1 (PNRC1), mRNA [NM_006813]	2,57	up	10957
YPEL2	Homo sapiens yippee-like 2 (Drosophila) (YPEL2), mRNA [NM_001005404]	2,55	up	388403

BTG2	Homo sapiens BTG family, member 2 (BTG2), mRNA [NM_006763]	2,51	up	7832
P4HA1	Homo sapiens prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I (P4HA1), transcript variant 3, mRNA [NM_001142595]	2,49	up	5033
KCNK7	Homo sapiens potassium channel, subfamily K, member 7 (KCNK7), transcript variant C, mRNA [NM_005714]	2,44	up	10089
EFNA1	Homo sapiens ephrin-A1 (EFNA1), transcript variant 1, mRNA [NM_004428]	2,43	up	1942
PDK1	Homo sapiens pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1 (PDK1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_002610]	2,43	up	5163
KDM3A	Homo sapiens lysine (K)-specific demethylase 3A (KDM3A), transcript variant 1, mRNA [NM_018433]	2,38	up	55818
LDHA	Homo sapiens lactate dehydrogenase A (LDHA), transcript variant 1, mRNA [NM_005566]	2,37	up	3939
GBE1	Homo sapiens glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1 (GBE1), mRNA [NM_000158]	2,30	up	2632
KLF6	Homo sapiens Kruppel-like factor 6 (KLF6), transcript variant A, mRNA [NM_001300]	2,28	up	1316
RIMKLA	Homo sapiens ribosomal modification protein rimK-like family member A (RIMKLA), mRNA [NM_173642]	2,28	up	284716
ASNS	Homo sapiens asparagine synthetase (ASNS), transcript variant 2, mRNA [NM_001673]	2,26	down	440
LDHA	Homo sapiens lactate dehydrogenase A (LDHA), transcript variant 1, mRNA [NM_005566]	2,25	up	3939
DBNL	Homo sapiens mRNA for Drebrin-like protein variant protein. [AB209486]	2,22	up	28988
SESN2	Homo sapiens sestrin 2 (SESN2), mRNA [NM_031459]	2,21	down	83667
C5orf41	Homo sapiens chromosome 5 open reading frame 41 (C5orf41), transcript variant 1, mRNA [NM_153607]	2,19	up	153222
PCK2	Homo sapiens phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial) (PCK2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 2, mRNA [NM_001018073]	2,19	down	5106
INSIG2	Homo sapiens insulin induced gene 2 (INSIG2), mRNA [NM_016133]	2,18	up	51141
PCK2	Homo sapiens phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial) (PCK2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1, mRNA [NM_004563]	2,17	down	5106
SERTAD3	Homo sapiens SERTA domain containing 3 (SERTAD3), transcript variant 2, mRNA [NM_203344]	2,17	up	29946
MXI1	Homo sapiens MAX interactor 1 (MXI1), transcript variant 2, mRNA [NM_130439]	2,16	up	4601
GPR146	Homo sapiens G protein-coupled receptor 146 (GPR146), mRNA [NM_138445]	2,14	up	115330
C4orf3	Homo sapiens chromosome 4 open reading frame 3 (C4orf3), transcript variant 1, mRNA [NM_001170330]	2,10	up	401152

TUBE1	Homo sapiens tubulin, epsilon 1 (TUBE1), mRNA [NM_016262]	2,10	down	51175
LOC100131829	Homo sapiens cDNA FLJ42008 fis, clone SPLEN2031724. [AK124002]	2,10	up	1E+08
ZNF449	Homo sapiens zinc finger protein 449 (ZNF449), mRNA [NM_152695]	2,09	down	203523
BNIP3L	Homo sapiens BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like (BNIP3L), mRNA [NM_004331]	2,09	up	665
IARS	Homo sapiens isoleucyl-tRNA synthetase (IARS), transcript variant long, mRNA [NM_013417]	2,02	down	3376
	lincRNA:chr3:171506370-171528740 reverse strand	2,01	up	
GNRH1	Homo sapiens gonadotropin-releasing hormone 1 (luteinizing-releasing hormone) (GNRH1), transcript variant 1, mRNA [NM_000825]	2,00	up	2796
FUT11	Homo sapiens fucosyltransferase 11 (alpha (1,3) fucosyltransferase) (FUT11), mRNA [NM_173540]	2,00	up	170384
PHF13	Homo sapiens PHD finger protein 13 (PHF13), mRNA [NM_153812]	2,00	up	148479
DIDO1	Homo sapiens death inducer-obliterator 1 (DIDO1), transcript variant 3, mRNA [NM_080797]	1,99	up	11083
FGF11	Homo sapiens fibroblast growth factor 11 (FGF11), mRNA [NM_004112]	1,99	up	2256
BNIP3L	Homo sapiens BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like (BNIP3L), mRNA [NM_004331]	1,99	up	665
TSEN15	Homo sapiens tRNA splicing endonuclease 15 homolog (S. cerevisiae) (TSEN15), transcript variant 1, mRNA [NM_052965]	1,97	down	116461
NCRNA00201	Homo sapiens non-protein coding RNA 201 (NCRNA00201), non-coding RNA [NR_026778]	1,97	up	284702
	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit D [Source:HGNC Symbol;Acc:3278] [ENST00000402116]	1,96	down	
	lincRNA:chr13:92005489-92006835 reverse strand	1,96	down	
ZBTB3	Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 3 (ZBTB3), mRNA [NM_024784]	1,95	down	79842
	lincRNA:chr3:171506370-171528740 reverse strand	1,95	up	
HIC2	Homo sapiens hypermethylated in cancer 2 (HIC2), mRNA [NM_015094]	1,95	up	23119
	lincRNA:chr20:36129478-36132377 reverse strand	1,95	up	
C3orf71	Homo sapiens chromosome 3 open reading frame 71 (C3orf71), mRNA [NM_001123040]	1,93	down	646450
P4HA2	Homo sapiens prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide II (P4HA2), transcript variant 1, mRNA [NM_004199]	1,92	up	8974
MTHFD1L	Homo sapiens methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1-like (MTHFD1L), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_015440]	1,91	down	25902

FAM105B	Homo sapiens family with sequence similarity 105, member B (FAM105B), mRNA [NM_138348]	1,88	up	90268
PABPC1L	Homo sapiens poly(A) binding protein, cytoplasmic 1-like (PABPC1L), mRNA [NM_001124756]	1,88	down	80336
HIST1H4F	Homo sapiens histone cluster 1, H4f (HIST1H4F), mRNA [NM_003540]	1,88	down	8361
YARS	Homo sapiens tyrosyl-tRNA synthetase (YARS), mRNA [NM_003680]	1,86	down	8565
FAM162A	Homo sapiens family with sequence similarity 162, member A (FAM162A), mRNA [NM_014367]	1,86	up	26355
YOD1	Homo sapiens YOD1 OTU deubiquinating enzyme 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (YOD1), mRNA [NM_018566]	1,86	up	55432
ZNF619	Homo sapiens zinc finger protein 619 (ZNF619), transcript variant 5, mRNA [NM_001145083]	1,85	down	285267
CLDN4	Homo sapiens claudin 4 (CLDN4), mRNA [NM_001305]	1,84	up	1364
MIR17HG	Homo sapiens MIR17 host gene (non-protein coding) (MIR17HG), non-coding RNA [NR_027350]	1,84	down	407975
WDR5B	Homo sapiens WD repeat domain 5B (WDR5B), mRNA [NM_019069]	1,83	down	54554
MICALL2	Homo sapiens MICAL-like 2 (MICALL2), transcript variant 1, mRNA [NM_182924]	1,82	up	79778
HIST2H4B	Homo sapiens histone cluster 2, H4b (HIST2H4B), mRNA [NM_001034077]	1,81	down	554313
PGM1	Homo sapiens phosphoglucomutase 1 (PGM1), transcript variant 1, mRNA [NM_002633]	1,79	up	5236
ZNF395	Homo sapiens zinc finger protein 395 (ZNF395), mRNA [NM_018660]	1,78	up	55893
LDLR	Homo sapiens low density lipoprotein receptor (LDLR), mRNA [NM_000527]	1,78	up	3949
PGK1	Homo sapiens phosphoglycerate kinase 1 (PGK1), mRNA [NM_000291]	1,78	up	5230
	lincRNA:chr2:162102827-162107557 forward strand	1,78	down	
HIC2	Homo sapiens hypermethylated in cancer 2 (HIC2), mRNA [NM_015094]	1,77	up	23119
JUND	Homo sapiens jun D proto-oncogene (JUND), mRNA [NM_005354]	1,77	up	3727
ING2	Homo sapiens inhibitor of growth family, member 2 (ING2), mRNA [NM_001564]	1,77	up	3622
	lincRNA:chr11:65190190-65214674 forward strand	1,76	up	
CLK1	Homo sapiens CDC-like kinase 1 (CLK1), transcript variant 2, mRNA [NM_001162407]	1,76	up	1195
INSIG2	Homo sapiens insulin induced gene 2 (INSIG2), mRNA [NM_016133]	1,76	up	51141
	lincRNA:chr4:74125061-74132136 forward strand	1,74	down	
HIST1H4D	Homo sapiens histone cluster 1, H4d (HIST1H4D), mRNA [NM_003539]	1,74	down	8360
ALDOA	Homo sapiens aldolase A, fructose-bisphosphate (ALDOA), transcript variant 1, mRNA [NM_000034]	1,73	up	226

CCDC121	Homo sapiens coiled-coil domain containing 121 (CCDC121), transcript variant 3, mRNA [NM_024584]	1,73	down	79635
LOC100188947	Homo sapiens hypothetical LOC100188947 (LOC100188947), non-coding RNA [NR_024467]	1,72	up	1E+08
HIST1H4I	Homo sapiens histone cluster 1, H4i (HIST1H4I), mRNA [NM_003495]	1,72	down	8294
HIST1H4K	Homo sapiens histone cluster 1, H4k (HIST1H4K), mRNA [NM_003541]	1,71	down	8362
PEX12	Homo sapiens peroxisomal biogenesis factor 12 (PEX12), mRNA [NM_000286]	1,71	down	5193
ZNF30	Homo sapiens zinc finger protein 30 (ZNF30), transcript variant 1, mRNA [NM_001099438]	1,70	down	90075
HBP1	Homo sapiens HMG-box transcription factor 1 (HBP1), mRNA [NM_012257]	1,70	up	26959
SFRS7	Homo sapiens splicing factor, arginine/serine-rich 7, 35kDa (SFRS7), mRNA [NM_001031684]	1,69	down	6432
ZNF780B	Homo sapiens zinc finger protein 780B (ZNF780B), mRNA [NM_001005851]	1,69	down	163131
WEE1	Homo sapiens WEE1 homolog (S. pombe) (WEE1), transcript variant 1, mRNA [NM_003390]	1,68	up	7465
ZNF691	Homo sapiens zinc finger protein 691 (ZNF691), mRNA [NM_015911]	1,67	down	51058
YPEL5	Homo sapiens yippee-like 5 (Drosophila) (YPEL5), transcript variant 4, mRNA [NM_016061]	1,67	up	51646
HIST1H4J	Homo sapiens histone cluster 1, H4j (HIST1H4J), mRNA [NM_021968]	1,67	down	8363
ZNF2	Homo sapiens zinc finger protein 2 (ZNF2), transcript variant 1, mRNA [NM_021088]	1,66	down	7549
EFNA4	Homo sapiens ephrin-A4 (EFNA4), transcript variant 3, mRNA [NM_182690]	1,66	up	1945
KLF6	Homo sapiens Kruppel-like factor 6 (KLF6), transcript variant B, mRNA [NM_001160124]	1,66	up	1316
C7orf60	Homo sapiens chromosome 7 open reading frame 60 (C7orf60), mRNA [NM_152556]	1,66	up	154743
SLC39A3	Homo sapiens solute carrier family 39 (zinc transporter), member 3 (SLC39A3), transcript variant 1, mRNA [NM_144564]	1,65	down	29985
CCNT2	Homo sapiens cyclin T2 (CCNT2), transcript variant b, mRNA [NM_058241]	1,64	down	905
MARS	Homo sapiens methionyl-tRNA synthetase (MARS), mRNA [NM_004990]	1,64	down	4141
HIST1H4K	Homo sapiens histone cluster 1, H4k (HIST1H4K), mRNA [NM_003541]	1,64	down	8362
BMS1	Homo sapiens BMS1 homolog, ribosome assembly protein (yeast) (BMS1), mRNA [NM_014753]	1,63	down	9790
	lincRNA:chr10:28812669-28820669 forward strand	1,63	down	
MNT	Homo sapiens MAX binding protein (MNT), mRNA [NM_020310]	1,62	up	4335
ZNF643	Homo sapiens zinc finger protein 643 (ZNF643), mRNA [NM_023070]	1,61	down	65243
	DDRGK domain containing 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:16110] [ENST00000380201]	1,61	up	

C17orf91	Homo sapiens chromosome 17 open reading frame 91 (C17orf91), transcript variant 1, non-coding RNA [NR_028502]	1,60	up	84981
ZNF473	Homo sapiens zinc finger protein 473 (ZNF473), transcript variant 1, mRNA [NM_015428]	1,60	down	25888
KBTBD6	Homo sapiens kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 6 (KBTBD6), mRNA [NM_152903]	1,58	down	89890
WDR60	Homo sapiens WD repeat domain 60 (WDR60), mRNA [NM_018051]	1,57	up	55112
MARS	Homo sapiens methionyl-tRNA synthetase (MARS), mRNA [NM_004990]	1,57	down	4141
KLF11	Homo sapiens Kruppel-like factor 11 (KLF11), mRNA [NM_003597]	1,57	up	8462
ZNF691	Homo sapiens zinc finger protein 691 (ZNF691), mRNA [NM_015911]	1,56	down	51058
NCRNA00115	Homo sapiens non-protein coding RNA 115 (NCRNA00115), non-coding RNA [NR_024321]	1,56	up	79854
GRB7	Homo sapiens growth factor receptor-bound protein 7 (GRB7), transcript variant 1, mRNA [NM_005310]	1,56	up	2886
TTC32	Homo sapiens tetratricopeptide repeat domain 32 (TTC32), mRNA [NM_001008237]	1,56	up	130502
OR7C2	Homo sapiens olfactory receptor, family 7, subfamily C, member 2 (OR7C2), mRNA [NM_012377]	1,55	up	26658
ZFP62	Homo sapiens zinc finger protein 62 homolog (mouse) (ZFP62), transcript variant 1, mRNA [NM_152283]	1,55	down	643836
WDR85	Homo sapiens WD repeat domain 85 (WDR85), mRNA [NM_138778]	1,54	down	92715
	lincRNA:chr3:171506452-171528221 reverse strand	1,53	up	
	lincRNA:chr19:24216258-24240821 reverse strand	1,53	up	
TRNT1	Homo sapiens tRNA nucleotidyl transferase, CCA-adding, 1 (TRNT1), mRNA [NM_182916]	1,53	down	51095
MINA	Homo sapiens MYC induced nuclear antigen (MINA), transcript variant 3, mRNA [NM_032778]	1,53	down	84864
MED26	Homo sapiens mediator complex subunit 26 (MED26), mRNA [NM_004831]	1,53	up	9441
LOC729603	Homo sapiens calcium binding protein P22 pseudogene (LOC729603), non-coding RNA [NR_003288]	1,52	up	729603
SNRNP40	Homo sapiens small nuclear ribonucleoprotein 40kDa (U5) (SNRNP40), mRNA [NM_004814]	1,52	down	9410
GLB1L	Homo sapiens galactosidase, beta 1-like (GLB1L), mRNA [NM_024506]	1,51	down	79411
LOC653113	Homo sapiens family with sequence similarity 86, member A pseudogene (LOC653113), non-coding RNA [NR_024254]	1,51	down	653113
TNIP1	Homo sapiens TNFAIP3 interacting protein 1 (TNIP1), mRNA [NM_006058]	1,51	up	10318
	lincRNA:chrX:56758598-56844002 forward strand	1,51	down	

TOP3B	Homo sapiens topoisomerase (DNA) III beta (TOP3B), mRNA [NM_003935]	1,50	down	8940
OGFOD1	Homo sapiens 2-oxoglutarate and iron-dependent oxygenase domain containing 1 (OGFOD1), mRNA [NM_018233]	1,50	down	55239
NOL6	Homo sapiens nucleolar protein family 6 (RNA-associated) (NOL6), transcript variant alpha, mRNA [NM_022917]	1,49	down	65083
LOC100134235	PREDICTED: Homo sapiens similar to hCG1642820 (LOC100134235), mRNA [XM_001719493]	1,49	up	1E+08
ZNF620	Homo sapiens zinc finger protein 620 (ZNF620), transcript variant 1, mRNA [NM_175888]	1,49	down	253639
	lincRNA:chrX:15693041-15720980 forward strand	1,48	down	
HN1	Homo sapiens hematological and neurological expressed 1 (HN1), transcript variant 2, mRNA [NM_001002032]	1,48	down	51155
LOC100129361	PREDICTED: Homo sapiens similar to mCG115122 (LOC100129361), mRNA [XM_001721915]	1,48	down	1E+08
TTPAL	Homo sapiens tocopherol (alpha) transfer protein-like (TTPAL), transcript variant 1, mRNA [NM_024331]	1,47	down	79183
C17orf59	Homo sapiens chromosome 17 open reading frame 59 (C17orf59), mRNA [NM_017622]	1,47	up	54785
FAM86A	Homo sapiens family with sequence similarity 86, member A (FAM86A), transcript variant 1, mRNA [NM_201400]	1,46	down	196483
ZNF441	Homo sapiens zinc finger protein 441 (ZNF441), mRNA [NM_152355]	1,46	down	126068
MECR	Homo sapiens mitochondrial trans-2-enoyl-CoA reductase (MECR), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 2, mRNA [NM_001024732]	1,46	down	51102
PYCR1	Homo sapiens pyrroline-5-carboxylate reductase 1 (PYCR1), transcript variant 1, mRNA [NM_006907]	1,46	down	5831
RNF103	Homo sapiens ring finger protein 103 (RNF103), mRNA [NM_005667]	1,45	up	7844
ZNF696	Homo sapiens zinc finger protein 696 (ZNF696), mRNA [NM_030895]	1,45	down	79943
PPAN	Homo sapiens peter pan homolog (Drosophila) (PPAN), mRNA [NM_020230]	1,45	down	56342
ENTPD4	Homo sapiens ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4 (ENTPD4), transcript variant 2, mRNA [NM_001128930]	1,45	down	9583
FKBPL	Homo sapiens FK506 binding protein like (FKBPL), mRNA [NM_022110]	1,45	up	63943
ARHGAP5	Homo sapiens Rho GTPase activating protein 5 (ARHGAP5), transcript variant 1, mRNA [NM_001030055]	1,44	up	394
ZC3H10	Homo sapiens zinc finger CCCH-type containing 10 (ZC3H10), mRNA [NM_032786]	1,44	down	84872
CTU2	Homo sapiens cytosolic thiouridylase subunit 2 homolog (S. pombe) (CTU2), transcript variant 2, mRNA [NM_001012762]	1,44	down	348180

RER1	Homo sapiens RER1 retention in endoplasmic reticulum 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (RER1), mRNA [NM_007033]	1,43	down	11079
AKAP8	Homo sapiens A kinase (PRKA) anchor protein 8 (AKAP8), mRNA [NM_005858]	1,43	up	10270
LCMT2	Homo sapiens leucine carboxyl methyltransferase 2 (LCMT2), mRNA [NM_014793]	1,43	down	9836
CD2BP2	Homo sapiens CD2 (cytoplasmic tail) binding protein 2 (CD2BP2), transcript variant 1, mRNA [NM_006110]	1,43	down	10421
FBXO46	Homo sapiens F-box protein 46 (FBXO46), mRNA [NM_001080469]	1,42	up	23403
C17orf101	Homo sapiens chromosome 17 open reading frame 101 (C17orf101), transcript variant 1, mRNA [NM_024648]	1,42	down	79701
RER1	Homo sapiens RER1 retention in endoplasmic reticulum 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (RER1), mRNA [NM_007033]	1,41	down	11079
DHDDS	Homo sapiens dehydrolipoyl diphosphate synthase (DHDDS), transcript variant 2, mRNA [NM_205861]	1,41	down	79947
DND1	Homo sapiens dead end homolog 1 (zebrafish) (DND1), mRNA [NM_194249]	1,40	down	373863
ZNF673	Homo sapiens zinc finger family member 673 (ZNF673), transcript variant 2, mRNA [NM_017776]	1,40	down	55634
IDE	Homo sapiens insulin-degrading enzyme (IDE), transcript variant 1, mRNA [NM_004969]	1,40	down	3416
ZNF142	Homo sapiens zinc finger protein 142 (ZNF142), mRNA [NM_001105537]	1,40	down	7701
	lincRNA:chr6:99968924-99983135 forward strand	1,39	down	
LIG3	Homo sapiens ligase III, DNA, ATP-dependent (LIG3), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant beta, mRNA [NM_002311]	1,39	down	3980
ACTR10	Homo sapiens actin-related protein 10 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (ACTR10), mRNA [NM_018477]	1,38	down	55860
	lincRNA:chrX:15693879-15716591 forward strand	1,38	down	
FAM86A	Homo sapiens family with sequence similarity 86, member A (FAM86A), transcript variant 1, mRNA [NM_201400]	1,38	down	196483
FBXO22	Homo sapiens F-box protein 22 (FBXO22), transcript variant 2, mRNA [NM_012170]	1,38	down	26263
	lincRNA:chr16:54952774-54959098 reverse strand	1,38	down	
NFYB	Homo sapiens nuclear transcription factor Y, beta (NFYB), mRNA [NM_006166]	1,38	down	4801
GNL3LP1	Homo sapiens cDNA FLJ12595 fis, clone NT2RM4001344. [AK022657]	1,37	down	80060
METTL11A	Homo sapiens methyltransferase like 11A (METTL11A), mRNA [NM_014064]	1,37	down	28989
SFXN3	Homo sapiens sideroflexin 3 (SFXN3), mRNA [NM_030971]	1,36	up	81855

PRKCD	Homo sapiens protein kinase C, delta (PRKCD), transcript variant 1, mRNA [NM_006254]	1,36	up	5580
LIPT1	Homo sapiens lipoyltransferase 1 (LIPT1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 3, mRNA [NM_145197]	1,36	down	51601
C1orf163	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 163 (C1orf163), mRNA [NM_023077]	1,36	down	65260
FLJ43681	Homo sapiens ribosomal protein L23a pseudogene (FLJ43681), non-coding RNA [NR_029406]	1,36	up	388574
KIAA2013	Homo sapiens KIAA2013 (KIAA2013), mRNA [NM_138346]	1,36	up	90231
PGAM2	Homo sapiens phosphoglycerate mutase 2 (muscle) (PGAM2), mRNA [NM_000290]	1,36	up	5224
DSCR3	Homo sapiens Down syndrome critical region gene 3 (DSCR3), mRNA [NM_006052]	1,35	down	10311
NDUFAF2	Homo sapiens NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, assembly factor 2 (NDUFAF2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_174889]	1,35	down	91942
KLHDC4	Homo sapiens kelch domain containing 4 (KLHDC4), mRNA [NM_017566]	1,35	down	54758
ZNF720	Homo sapiens zinc finger protein 720 (ZNF720), mRNA [NM_001130913]	1,34	down	124411
		1,34	up	
TRA2B	Homo sapiens transformer 2 beta homolog (Drosophila) (TRA2B), mRNA [NM_004593]	1,33	down	6434
NME6	Homo sapiens non-metastatic cells 6, protein expressed in (nucleoside-diphosphate kinase) (NME6), mRNA [NM_005793]	1,33	down	10201
	Q8IXM3_HUMAN (Q8IXM3) Mitochondrial ribosomal protein L41 (Proliferation-inducing gene 3), partial (67 %) [THC2728923]	1,33	down	
ZBTB5	Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 5 (ZBTB5), mRNA [NM_014872]	1,32	up	9925
SURF2	Homo sapiens surfet 2 (SURF2), mRNA [NM_017503]	1,32	down	6835
TSN	Homo sapiens translin (TSN), mRNA [NM_004622]	1,32	down	7247
	lincRNA:chr17:75084836-75089393 forward strand	1,31	down	
GRPEL2	Homo sapiens GrpE-like 2, mitochondrial (E. coli) (GRPEL2), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_152407]	1,31	down	134266
ZNF766	Homo sapiens zinc finger protein 766 (ZNF766), mRNA [NM_001010851]	1,31	down	90321
KIAA0907	Homo sapiens KIAA0907 (KIAA0907), mRNA [NM_014949]	1,31	up	22889
NVL	Homo sapiens nuclear VCP-like (NVL), transcript variant 1, mRNA [NM_002533]	1,31	down	4931
MAPK7	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 7 (MAPK7), transcript variant 1, mRNA [NM_139033]	1,31	up	5598
TTPAL	Homo sapiens tocopherol (alpha) transfer protein-like (TTPAL), transcript variant 1, mRNA	1,30	down	79183

	[NM_024331]			
SSSCA1	Homo sapiens Sjogren syndrome/scleroderma autoantigen 1 (SSSCA1), mRNA [NM_006396]	1,30	down	10534
C7orf49	Homo sapiens chromosome 7 open reading frame 49 (C7orf49), transcript variant 1, mRNA [NM_024033]	1,30	down	78996
RPP30	Homo sapiens ribonuclease P/MRP 30kDa subunit (RPP30), transcript variant 1, mRNA [NM_001104546]	1,30	down	10556
EXOSC1	Homo sapiens exosome component 1 (EXOSC1), mRNA [NM_016046]	1,29	down	51013
SFRS13A	Homo sapiens splicing factor, arginine/serine-rich 13A (SFRS13A), transcript variant 2, mRNA [NM_054016]	1,27	down	10772
AZI2	Homo sapiens 5-azacytidine induced 2 (AZI2), transcript variant 3, mRNA [NM_001134433]	1,27	down	64343
AARSD1	Homo sapiens alanyl-tRNA synthetase domain containing 1 (AARSD1), transcript variant 2, mRNA [NM_025267]	1,27	down	80755
GPBAR1	Homo sapiens G protein-coupled bile acid receptor 1 (GPBAR1), transcript variant 1, mRNA [NM_001077191]	1,26	up	151306
MRPL41	Homo sapiens mitochondrial ribosomal protein L41 (MRPL41), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA [NM_032477]	1,26	down	64975
C17orf71	Homo sapiens chromosome 17 open reading frame 71 (C17orf71), mRNA [NM_018149]	1,25	down	55181
NCOA5	Homo sapiens nuclear receptor coactivator 5 (NCOA5), mRNA [NM_020967]	1,24	down	57727
C16orf42	Homo sapiens chromosome 16 open reading frame 42 (C16orf42), mRNA [NM_001001410]	1,24	down	115939
PFDN5	Homo sapiens prefoldin subunit 5 (PFDN5), transcript variant 1, mRNA [NM_002624]	1,23	up	5204
MIF	Homo sapiens macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor) (MIF), mRNA [NM_002415]	1,22	up	4282
	lincRNA:chr17:75085302-75089840 forward strand	1,21	down	
RP3-377H14.5	Homo sapiens hypothetical LOC285830 (LOC285830), transcript variant 1, non-coding RNA [NR_026972]	1,19	up	285830

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wofram T. Knoefel für die Aufnahme an die Klinik für Allgemein-, Viseral-, und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. William Martin danke ich vielmals für die Übernahme des Zweitgutachtens und die freundliche, unkomplizierte Betreuung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Nikolas H. Stoecklein für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Bereitstellung dieses spannenden Themas und die ausgezeichnete Betreuung. Sein permanentes Engagement, die vielen Anregungen, die zahlreichen Erklärungen und interessanten Gespräche haben maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Außerdem danke ich für die Möglichkeit an Kongressen und Fortbildungsseminaren teilnehmen zu können. Der entspannte und freundliche Umgang mit seinen Mitarbeitern hat sehr dazu beigetragen, dass ich stets Freude an meiner Arbeit hatte und mich in der Arbeitsgruppe und der Laborgemeinschaft wohl gefühlt habe.

Bei Herrn Prof. Dr. Stefan Baldus und Herrn Priv.-Doz. Dr. Karl Ludwig Schäfer bedanke ich mich für die unkomplizierte und gute Kooperation, sowie Anregungen zu der Arbeit. An dieser Stelle auch vielen Dank an Priv.-Doz. Dr. Wolfgang Huckenbeck für die Durchführung und Auswertung der STR Analysen.

Dr. Dieter Nideracher danke ich vielmals für die hilfreichen Kommentare und Anregungen zur dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt auch meinen Mit-Doktorandinnen Julia M. Pietsch und Christiane Driemel für die gute Zusammenarbeit und die permanente Hilfsbereitschaft. Zusammen sind wir durch Tiefen und Höhen gegangen und haben den Laboralltag gemeistert. Vielen Dank für Eure Unterstützung und den ehrlichen und freundschaftlichen Umgang untereinander. Ich erinnere mich gerne an die schöne Zeit mit Euch!

Frau Swetlana Seidschner, Frau Sarah Schumacher, Frau Anna-Carina Vaerst und Frau Imke Hoffmann gilt besonderer Dank für ihre tolle Unterstützung im Laboralltag. Eure hervorragende Organisation des Labors hat vieles einfacher gemacht.

Allen Kollegen im Labor, Sabrina Mersch, Annika Ströcker, Maria Becker, Vivian Hoya, Petra Panagiotidou, Isabell Baumgard, Dr. Constanze Duhme, Dr. Leila Telan, Bianca Beehrendts, Dr. Birte Möllendick, Thomas Maaz, Georg Flügen und Alexander Smyczek danke ich für die gute Zusammenarbeit und das tolle Arbeitsklima. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei den Kollegen aus der Klinik, Dr. Christian Vay, Levent Dizdar, Dr. Andreas Krieg, Priv.-Doz. Dr. Stefan Topp und ganz besonders bei Norma Schmitz und Dr. Feride Kröpil bedanken.

Dr. René Deenen danke ich vielmals für die gute und unkomplizierte Kooperation, die Durchführung und Auswertung der Agilent Array Analysen und die damit verbundenen lehrreichen Gespräche und Hilfestellungen.

Allen meinen Freunden und besonders meinen Freundinnen Mareike, Sarah, Theresa, Tatjana und Michaela danke ich ganz herzlich für Euren Rückhalt und die liebevolle Unterstützung. Ihr wart immer an „vorderster Front“ dabei, habt mich wunderbar unterstützt und mir viel Kraft geschenkt! Ich konnte immer auch euch zählen!

Besonders herzlicher Dank gebührt meinen Eltern die mir nicht nur das Studium und meine Dr. Arbeit ermöglicht haben, sondern mich auch bedingungslos durch alle Tiefen und Höhen dieser Zeit begleitet haben. Ich konnte immer auf Eure unermüdliche Unterstützung und Euren Rat zählen. Ihr habt mich immer wieder aufs Neue motiviert, umorgt und mit Eurer grenzenlosen Liebe dafür gesorgt, dass ich meine Ziele verfolgen und erreichen konnte. Danke dass ihr immer für mich da wart und stets an mich geglaubt habt! Ich kann gar nicht in Worte fassen wie viel Ihr mir bedeutet und wie sehr ich Euch liebe. Das gleiche gilt auch für meine Brüder Philipp und Tristan. Auch ihr hattet immer ein offenes Ohr für mich und habt mich wunderbar unterstützt. Es ist schön und ich bin glücklich Eure Schwester zu sein! Auch Rebecca danke ich für die vielen Gespräche und die schöne Zeit, die wir im Kreise der Familie miteinander verbringen konnten und hoffentlich noch sehr lange verbringen werden.

Mein herzlichster Dank gilt Dir Stephan! Auf Dich kann ich mich immer verlassen, Du bist mein Fels in der Brandung! Zusammen sind wir durch dick und dünn gegangen und haben uns immer wieder gegenseitig gestärkt und motiviert. Es ist schön dass es Dich gibt! Danke für Deine Liebe! An dieser Stelle geht auch ein Dankeschön an Maria, Hans, Eva und Hans Jr. für Eure Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Anna Clarissa Luca
Geburtsdatum: 13.09.1981
Geburtsort: Duisburg
Nationalität: Deutsch
Familienstand: ledig

Schulische Laufbahn:

1988-1992 Gemeinschafts-Grundschule Am Knappert, Duisburg
1992-1998 Theodor-Fliedner-Gymnasium, Düsseldorf
1998-1999 Angola High School, Angola, Indiana, USA
1999-2001 Theodor-Fliedner-Gymnasium, Düsseldorf

Akademischer Werdegang:

Okt. 2001- Sept. 2007 Diplomstudiengang der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Diplomarbeit am Institut für Pathologie der Universitätsklinik Düsseldorf zum Thema: „Die Rolle von Daxx beim Paclitaxel-induziertem Zelltod in humanen Nierenkarzinom Zelllinien“
Gesamtnote „sehr gut“

Okt. 2007- Juni 2011 Promotion an der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Kinderchirurgie der Universitätsklinik Düsseldorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Nikolas Stoecklein

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner versichere ich, dass ich weder an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf noch an einer anderen Universität versucht habe, diese Dissertation einzureichen.

Ebenso habe ich bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 2011-05-05

Anna Clarissa Luca