

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik

(Prof. Dr. Bernhard Wolf)

Etablierung und Validierung eines prädiktiven metabolischen Chemosensitivitätstests mittels automatisierter chipgestützter Analytik

Regina Kleinhans

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Prof. Dr. D. Schmitt-Landsiedel

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. rer. nat. B. Wolf
2. Prof. Dr. rer. nat. M. Klingenspor

Die Dissertation wurde am 05.10.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik am 13.02.2016 angenommen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Quellen sind im Literaturverzeichnis zitiert.

Zusammenfassung

Individuelle Behandlungserfolge in der Onkologie haben sich trotz des hohen Entwicklungsaufwands für neue Medikamente in den letzten 20 Jahren nicht zufriedenstellend verbessert. Häufig profitiert nur ein geringer Teil der Patienten von einem neuen Chemotherapeutikum, während der Großteil keinen Nutzen davon hat. Deshalb kommt der personalisierten Medizin ein zunehmend wichtigerer Stellenwert in der Behandlung von Krebserkrankungen zu. Ziel hierbei ist es, anhand individueller prädiktiver Parameter des Tumorgewebes schon während der Therapieplanung die individuell wirksamste Behandlungsstrategie zu identifizieren. Neben den vorhandenen molekularbiologischen Analysen rücken in diesem Zusammenhang sensorbasierte metabolische Assays immer mehr in den Vordergrund. Diese bieten den Vorteil, anhand extrazellulärer Parameter die metabolische Aktivität und Morphologie von Zellen und Geweben vor, während und nach einer Wirkstoffzugabe in vitro untersuchen zu können.

In dieser Arbeit wird ein neuentwickeltes sensorbasiertes Testsystem vorgestellt, das in der Lage ist, Analysen mehrerer Zellparameter parallel, dynamisch und vollautomatisiert durchzuführen. Durch Zugabe verschiedener Wirkstoffe und Variationen der extrazellulären Bedingungen konnte an humanen Zelllinien bereits ein breites Spektrum von Anwendungsmöglichkeiten in der pharmazeutischen Forschung nachgewiesen werden.

Mit dem Ziel, das Messsystem für individuelle Chemosensitivitätstests klinisch nutzbar zu machen, wurden im Rahmen dieser Arbeit eine Standard Operation Procedure (SOP) für die Präparation sowie ein Messprotokoll für frisch explantiertes humanes Mammakarzinom-Gewebe entwickelt. Auf dieser Basis ist es erstmals gelungen, sensorbasierte Vitalitätsmessungen an humanem Tumorgewebe multiparametrisch und über einen Zeitraum von bis zu vier Tagen reproduzierbar und statistisch abgesichert durchzuführen. Dazu wurde eine Reihe von Anforderungen an das zu entwickelnde Präparations- und Messprotokoll gestellt und konsequent umgesetzt.

Neben der grundsätzlichen Eignung für allgemeine metabolische Analysen war ein zentrales Ziel dieser Arbeit, das Potenzial des Systems für zukünftige prädiktive Chemosensitivitätstests im klinischen Einsatz zu demonstrieren. Anhand der durchgeführten metabolischen Analysen ließ sich zwischen Sensitivität und Resistenz individueller humaner Mammakarzinom-Gewebeproben gegenüber Chemotherapeutika differenzieren. Nach Validierung im Rahmen einer derzeit in Planung befindlichen klinischen Studie könnten die mit diesem System gewonnenen metabolischen Parameter künftig relevante prädiktive Hinweise auf den Erfolg eines personalisierten Therapieregimes geben.

Abstract

Despite high costs for the development of anticancer drugs in the last decades, the success of chemotherapeutical therapies in oncology has hardly been satisfying with the majority of patients not benefitting at all. Therefore, personalized therapy is becoming increasingly important in cancer treatment. In addition to the currently available molecular analyses, sensor based methods move into focus to a higher extent. They provide the advantage to analyze metabolic activity and morphology of cell or tissue probes based on extracellular parameters before, during and after cytostatic drug treatment.

This study shows a new multiparametric sensor based measurement system for analyzing metabolic cellular parameters simultaneously in a dynamic and fully automated way. By adding model drugs or variations of extracellular microenvironment, a broad spectrum of applications in pharmaceutical research could be demonstrated on cell lines.

Aiming at making the system useful for clinical applications, in this study a Standard Operation Procedure (SOP) for preparation and measurement of fresh explanted human mammary carcinoma tissue was developed. For the first time it was possible to perform reproducible and statistically verified multiparametric sensor based vitality analyses over a period of four days. To achieve this, a number of requirements were defined for the SOP and realized consequently.

Besides verifying the general suitability for metabolic analysis, a central aim of this work was to demonstrate the potential of the system for predictive chemosensitivity assays in future clinical use. To a certain extent it was possible to differentiate between chemosensitivity and resistance of individual human mammary carcinoma tissue to model drugs by metabolic analyses. After further validation by clinical studies, the metabolic parameters could provide relevant predictive indicators for the success of personalized cancer therapy regimens.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Bernhard Wolf für die Vergabe dieses äußerst interessanten und aktuellen Themas und seine exzellente Betreuung. Dr. Martin Brischwein möchte ich meinen großen Dank für seinen stets hilfreichen fachlichen Rat und seine konstruktive Kritik aussprechen. Weiterhin gilt mein Dank Prof. Dr. Axel Niendorf und dem Institut für diagnostische Histopathologie und Zytologie in Hamburg, der die in dieser Arbeit im Rahmen des „AHA“-Projekts („Automatisierte High Content Analyseplattform zur Entwicklung individualisierter Therapiestrategien“, BMBF Projekt 0315114 A) untersuchten Tumorproben zur Verfügung stellte.

Franz Demmel möchte ich danken, er half zu jeder Tag- und Nachtzeit bei der Lösung der technischen Probleme mit dem Messsystem. Ein großes Dankeschön geht weiterhin an Lilia Hafner, Gudrun Teschner, Alfred Michelfelder und ganz besonders Daniel Grundl. Sie ermöglichten ein überaus angenehmes und produktives Arbeitsklima und standen mir stets mit Rat und Tat zur Seite. Katarina Ilicic und Pei Wang bin ich dankbar für ihre tatkräftige Mitarbeit im Labor.

Dank gebührt auch allen meinen Freunden, die mich jederzeit unterstützt haben.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und Geschwistern meinen großen Dank aussprechen. Ihre immerwährende Unterstützung in allen Bereichen hat diese Arbeit erst ermöglicht und zu ihrem Gelingen beigetragen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Ausgangspunkt	3
1.2	Personalisierte Medizin	5
1.3	Zielsetzung	6
1.4	Charakteristika von Tumorzellen- und Geweben	8
1.4.1	Kennzeichen einer Krebszelle	8
1.4.2	Unbeschränktes proliferatives Potenzial	9
1.4.3	Zellmetabolismus	10
1.4.4	Tumormikroumgebung	14
1.4.5	Tumorheterogenität	15
1.5	Extrazelluläre Ansäuerung und Sauerstoffabnahme als Marker für die Zellvitalität	16
1.6	Krebsbehandlung und Therapieresistenz	16
1.6.1	Behandlungsstrategien	16
1.6.2	Mechanismen der Chemoresistenz	18
1.7	Methoden zur Chemosensitivitätstestung	20
1.7.1	In vivo Testmethoden	20
1.7.2	Histologische und bildgebende Verfahren	20
1.7.3	Proliferationstests	25
1.7.4	Metabolische Assays	27
1.7.5	Gen- und Proteinexpressionsanalysen	28
1.7.6	Tumorsphäroide	32
1.8	Sensorbasierte Testsysteme	33
1.8.1	Sensorbasierte Messung einzelner Parameter	33
1.8.2	Multiparametrische Assays	36
1.9	Intelligent Microplate Reader (IMR)-System	40
1.10	Anforderungen an einen aussagekräftigen prädiktiven Chemosensitivitätstest	44
2	Ergebnisse	45
2.1	Entwicklung eines Präparations- und Messprotokolls für humanes Mammakarzinom-Gewebe 45	
2.1.1	Herstellung von Zellsuspensionen	45
2.1.2	Manuelle Herstellung von Gewebeschnitten	46
2.1.3	Herstellung von Gewebeschnitten mit dem Vibratom	48
2.1.4	Einlegen der Gewebeschnitte in die Messplatte	50
2.1.5	Definition von Schnittdicke und Schnittdurchmesser	51
2.1.6	Zusammensetzung des Kulturmediums	52
2.2	Datenqualität und Auswertung	54
2.2.1	Verbesserung der Proben- und Datenqualität	54

2.2.2	Datenauswertung.....	57
2.3	Validierung der Messergebnisse von humanem Mammakarzinom-Gewebe anhand von Zelllinien	59
2.3.1	Typische Verläufe metabolischer Messungen von Zelllinien und Primärgewebe	59
2.4	Chemosensitivitätsanalysen an individuellem humanem Mammakarzinom-Gewebe	62
2.4.1	Dosisabhängigkeit der CAA-Effekte auf die metabolische Aktivität von Mammakarzinom-Gewebe	62
2.4.2	Individuelle metabolische Reaktionen von Mammakarzinom-Proben auf CAA und DOX	64
2.5	Metabolische und morphologische Effekte von Zytostatika auf MCF-7 Zellen.....	71
2.5.1	Dosisabhängigkeit der CAA-Effekte auf Metabolismus und Morphologie.....	72
2.5.2	Dosisabhängigkeit der DOX-Effekte auf Metabolismus und Morphologie	78
2.5.3	Dosisabhängigkeit der 5-FU-Effekte auf Vitalität und Morphologie.....	84
2.6	Einfluss des extrazellulären pH-Wertes auf metabolische Wirkungseffekte.....	90
2.6.1	Effekte der extrazellulären Ansäuerung auf die metabolische Aktivität von MCF-7 Zellen	90
2.6.2	Amilorid-Effekte auf die metabolische Aktivität von MCF-7 Zellen.....	92
2.6.3	Effekte der extrazellulären Ansäuerung auf die metabolischen Effekte von Amilorid	93
3	Diskussion und Ausblick	97
3.1	Einflüsse auf den prädiktiven Wert von Chemosensitivitätstests	97
3.1.1	Tumorheterogenität	97
3.1.2	Dateninterpretation	98
3.2	Möglichkeiten und Limitierungen aktueller Ansätze zur Chemosensitivitäts-Analyse	98
3.2.1	Molekulare Testmethoden	99
3.2.2	Metabolische Testmethoden.....	100
3.3	Potenzial sensorbasierter metabolischer Testmethoden.....	101
3.3.1	Modifikationen der extrazellulären Bedingungen.....	103
3.4	Entwicklung eines sensorbasierten metabolischen Chemo-sensitivitätstests.....	103
3.4.1	Anforderungen an einen klinisch routinemäßig einsetzbaren Chemo-sensitivitätstest mit hohem prädiktiven Wert	103
3.4.2	Analyse von Gewebeschnitten	104
3.4.3	Entwicklung eines Präparations- und Messprotokolls	105
3.5	Validierung der Aussagekraft des IMR-Systems	108
3.5.1	Metabolische Analysen mit herkömmlichen Methoden und mit dem IMR-System	108
3.5.2	Validierung der Messergebnisse von Gewebeproben.....	110
3.6	Mehrtägige Chemosensitivitätstests an humanem Mammakarzinom	112
3.6.1	Nachweis von Chemosensitivität und Chemoresistenz individueller Mammakarzinom-Gewebeproben.....	112
3.6.2	Veränderung des metabolischen Profils durch CAA-Behandlung.....	113
3.6.3	Definition von Chemosensitivität und Chemoresistenz	115

3.7	Einsatzmöglichkeiten des IMR-Systems im Bereich Forschung und Entwicklung	116
3.8	Perspektiven der personalisierten Medizin in der Onkologie.....	117
3.9	Ausblick.....	118
4	Standard Operating Procedure (SOP).....	120
5	Anhang	i
5.1	Material und Methoden	i
5.1.1	Labormaterial, Zelllinien und Gewebe	i
5.1.2	Zellkultur	vii
5.1.3	Präparation von Gewebeprobe.....	viii
5.1.4	Durchführung Lichtmikroskopie, Resazurintest und Zellzahlbestimmung.....	xii
5.1.5	Messungen mit dem IMR-System.....	xv
5.2	Abbildungsverzeichnis	xix
5.3	Tabellenverzeichnis	xxii
5.4	Abkürzungsverzeichnis	xxiii
5.5	Eigene Publikationen	xxv
5.6	Literaturverzeichnis	xxvii

1 Einleitung

1.1 Ausgangspunkt

Jeder dritte Europäer erkrankt im Laufe seines Lebens an Krebs. In Deutschland liegen Tumorleiden nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen auf Platz Zwei der häufigsten Todesursachen. Im Jahr 2006 starben mehr als 112.000 Männer und 98.000 Frauen an bösartigen Tumoren. Neuerkrankt sind 229.000 Männer und 198.000 Frauen. Die bei Männern am häufigsten auftretenden bösartigen Neubildungen mit Todesfolge waren mit 25% Tumoren der Lunge, gefolgt von Karzinomen des Darms und der Prostata. Bei Frauen lag Brustkrebs mit 18% an erster Stelle der Krebs-Mortalität, die zweithäufigsten waren Darm- und Lungenkrebs. Die häufigste maligne Neubildung im Jahr 2006 war bei Frauen mit 29% der Brustkrebs, bei Männern das Prostata-Karzinom mit 26% (Abb. 1-1). Aufgrund des demographischen Wandels werden diese Zahlen in den nächsten Jahren weiter ansteigen¹.

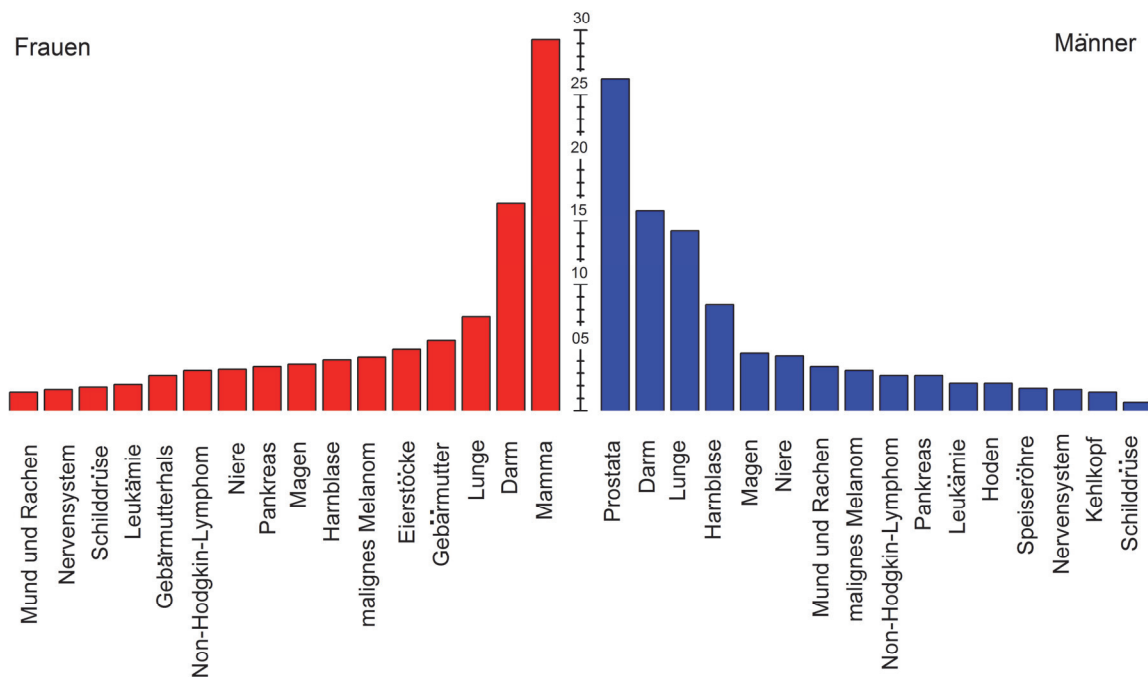


Abb. 1-1: Anteil der einzelnen Tumorarten an den Krebsneuerkrankungen in Deutschland

Dargestellt ist der prozentuale Anteil der häufigsten Malignom-Erstdiagnosen im Jahr 2006¹. Die häufigste maligne Neubildung war bei Frauen der Brustkrebs mit 29% und bei Männern das Prostata-Karzinom mit 26% .

Die standardisierten und am häufigsten eingesetzten Behandlungsstrategien solider Tumoren sind Kombinationen aus operativer Entfernung, Bestrahlung und systemischer Chemotherapie. Die Auswahl der individuellen Behandlungsstrategie wird derzeit in Deutschland überwiegend anhand der Leitlinien der *Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF)*² getroffen, basierend auf den Ansprechraten der einzelnen Tumorentitäten auf Medikamente

in klinischen Studien. Beim Brustkrebs fließen neben der Lokalisation des Tumors, dem Grad der Metastasierung, der Anzahl der befallenen Lymphknoten, dem allgemeinen Zustand der Patientin und der Art der Vorbehandlungen zusätzlich die Expression von Hormon- und Wachstumsfaktor-Rezeptoren sowie von Proliferationsmarkern in die Therapieplanung mit ein.

Obwohl aufgrund umfangreicher Neu- und Weiterentwicklungen in den letzten Jahren mittlerweile viele effektive Medikamente auf dem Markt verfügbar sind, ist das individuelle Ansprechen eines Patienten-Tumors auf die Chemotherapie häufig nicht zufriedenstellend^{3,4}. Trotz umfangreicher Erfahrungswerte mit der Behandlung von Tumoren profitiert nur ein Teil der Patienten von anerkannten Standardtherapien. Das klinische Ansprechen auf eine Chemotherapie ist auch bei gleicher histopathologischer Klassifizierung des Tumors individuell sehr unterschiedlich^{5,6}. Chemotherapien bedeuten für den Patienten wegen evtl. auftretender starker Nebenwirkungen und dadurch verringerter Lebensqualität eine große Belastung, sowohl körperlich als auch psychisch. Nicht selten treten Spätfolgen durch die Chemotherapie auf. Ein großes Problem ist, dass die Wirksamkeit einer Chemotherapie erst im Verlauf der Behandlung deutlich wird. Durch einen späten Wechsel der Behandlungsstrategie verliert der Patient kostbare Zeit, die er für eine erfolgreiche Therapie hätte nutzen können. Spricht ein Medikament in der ersten Therapie nicht an, zeigen Folgetherapien oft hohe Versagensraten. Dies liegt einerseits an der Entwicklung von Kreuz-Resistenzen des Tumors gegenüber Zytostatika, andererseits auch an der vorausgegangenen körperlichen Belastung, die zu einer Reduktion der applizierten Dosis zwingt.

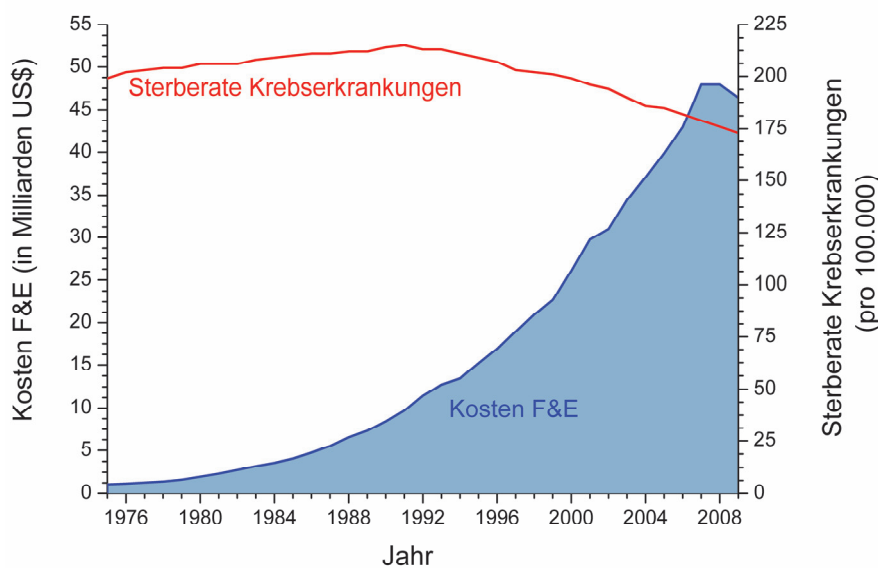


Abb. 1-2: Kosten der pharmazeutischen Forschung im Vergleich zur Sterberate von Krebspatienten

Dargestellt sind Ausgaben für Forschung und Entwicklung (F&E) der pharmazeutischen Industrie in den USA⁷ im Vergleich zur Sterberate von Krebspatienten in den Jahren 1976 bis 2008. Die seit den 1990er Jahren stark ansteigenden Entwicklungskosten stehen im Kontrast zu einer nur moderaten Abnahme der Mortalität⁸.

Ein weiterer zu berücksichtigender Aspekt erfolgloser Chemotherapien ist ein erheblicher Kostenaufwand für das Gesundheitssystem. Eine 1-Jahres-Therapie mit dem monoklonalen Antikörper

Trastuzumab kostet bspw. ca. 40.000 €. Desweiteren erzielte der in den letzten Jahren stetig steigende Aufwand zur Wirkstoffentwicklung keinen Durchbruch in der Verbesserung der Behandlungserfolge. Deutlich wird dies an den extremen Kosten der pharmazeutischen Forschung und Entwicklung (F&E)⁷ neuer Medikamente, die mit einer nicht zufriedenstellenden Verbesserung der Sterberate von Krebspatienten einher geht⁸ (Abb. 1-2).

1.2 Personalisierte Medizin

Aus den oben genannten Gründen sind essenzielle Umbrüche in der Wirkstoffentwicklung und den Behandlungsstrategien dringend erforderlich. Da derzeit keine erfolgreichen Behandlungsmöglichkeiten als Alternativen zur Chemotherapie verfügbar sind, wurde in den letzten Jahren nicht mehr nur der Ansatz verfolgt, immer neue Präparate auf den Markt zu bringen, sondern die vorhandenen Therapie-Regimes durch gezielte Individualisierung zu verbessern. Ziel der personalisierten Medizin ist es, schon im Vorfeld den Nutzen einer bestimmten Behandlungsstrategie möglichst genau zu prognostizieren^{9,10}.

Im Zuge des rasanten Fortschritts der Genomanalyse spielen molekularbiologische Methoden eine zunehmend wichtige Rolle. Gen- und Protein- Expressionsanalysen wird derzeit ein großes Potenzial zugeschrieben, auf der Basis der Expression bestimmter Markerproteine Prognosen über den Krankheitsverlauf, das individuelle Rezidiv-Risiko¹¹⁻¹³ und den Erfolg zielgerichteter molekularer Therapie-Regimes zu treffen^{14,15}. Im Fokus für individualisierte Behandlungsstrategien stehen besonders Antikörper- oder Hormontherapien, die die Aktivität fehlregulierter intra- und extrazellulärer Targets hemmen sollen. Schlüsselrollen spielen hierbei überaktive Wachstumsfaktor-Rezeptoren oder Tyrosinkinase, die an Signalwegen beteiligt sind, an deren Ende das Induzieren der Zellproliferation steht¹⁶⁻²⁰. Obwohl die rasanten Fortschritte im Bereich der DNA- und Protein-Microarray-Technik zwar ein zukünftiges Potenzial für gezielte onkologische Diagnostik und personalisierte Therapie versprechen, unterliegt der prädiktive Wert dieser Assays nicht zu vernachlässigenden Limitierungen. Dies liegt vor allem in der Komplexität der intrazellulären Signalweiterleitung begründet. Signalwege verlaufen nicht linear und parallel zueinander, sondern zeigen komplexe, dynamische und redundante Interaktionen einzelner Regulatorproteine in zum Teil noch nicht bekannter Weise (Abb. 1-3, Abb. 1-5). Auf diese Weise kann auch bei einem wirkstoffinduzierten Aktivitätsverlust eines spezifischen Regulatorproteins die Signalweiterleitung zur Induktion der Zellproliferation aufrechterhalten werden. Zwischen der Überexpression eines bestimmten Proteins und der tatsächlichen phänotypischen Reaktion einer Zelle besteht daher kein linearer Zusammenhang. Gen- und Protein-Expressionsanalysen erlauben somit keine eindeutigen Rückschlüsse auf den Erfolg einer auf ein spezifisches Enzym abzielenden Therapie^{21,22}.

Parallel zur Entwicklung molekularbiologischer Assays wurde in den letzten Jahren der Ansatz verfolgt, mit sensorbasierten Systemen anhand extrazellulärer Parameter die metabolische Aktivität und Morphologie individueller Tumorgewebeproben *in vitro* zu untersuchen. Auf der Basis von Vitalitätsveränderungen individueller *in vitro* kultivierter Tumorproben, die als Folge einer Wirkstoffbehandlung auftreten, werden Rückschlüsse auf Chemosensitivität und Resistenz gezogen. Hierbei werden nicht einzelne intrazelluläre Proliferations- oder Metabolismus-Marker bestimmt, sondern die aus den komplexen intrazellulär ablaufenden Mechanismen resultierende Gesamtheit der phänotypischen Reaktio-

nen analysiert. Als Marker für die Vitalität werden durch den Zellmetabolismus induzierte Veränderungen des extrazellulären pH-Werts des Kulturmediums und des Sauerstoffpartialdrucks (pO₂), bei einigen Systemen auch des Kohlenstoffdioxids (CO₂) verwendet²³⁻²⁷. Die Untersuchung unterschiedlicher, nicht invasiver Parameter für die Bestimmung der zellulären Reaktion bietet die Möglichkeit, die individuelle metabolische Aktivität einer Probe über den gesamten Verlauf eines Chemosensitivitätstests zu messen und diese somit vor, während und nach einer Wirkstoffbehandlung zu analysieren. Auf diese Weise sind präzisere prädiktive Aussagen über Chemosensitivität und Resistenz möglich.

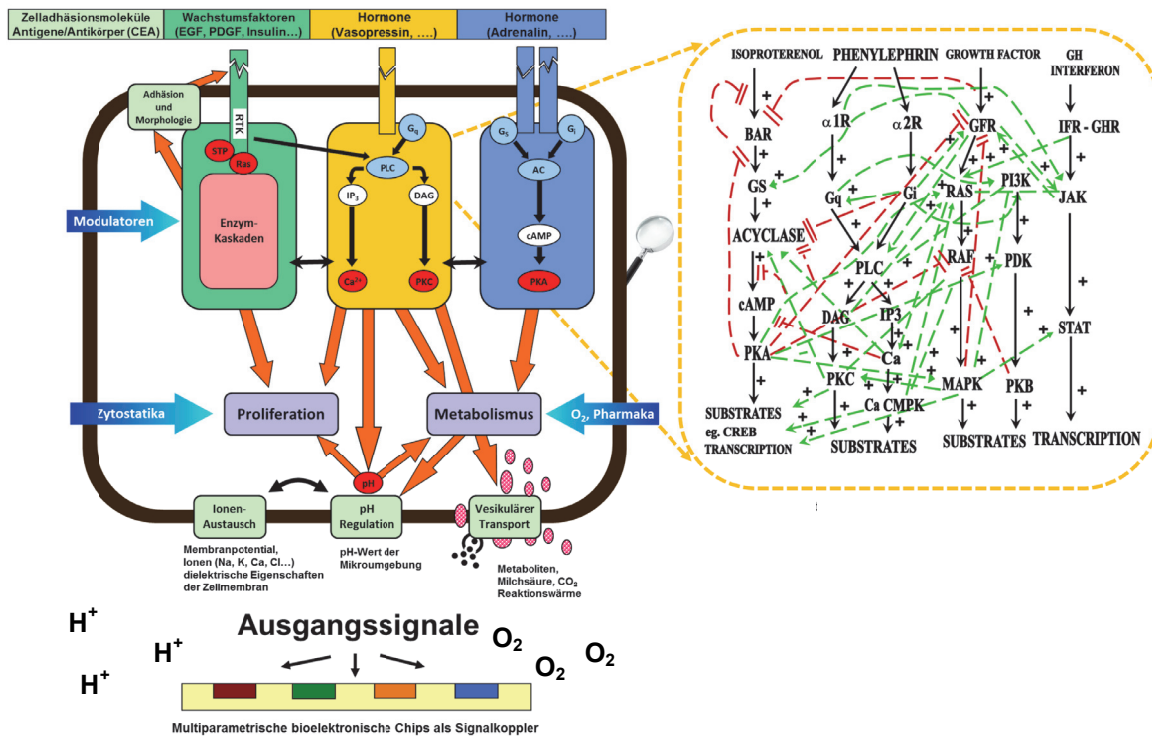
1.3 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das neuentwickelte, sensorbasierte „*Intelligent Microplate Reader*“ (IMR)-System²⁸⁻³⁰ im Hinblick auf sein Potenzial und seine Tauglichkeit für zukünftige Chemosensitivitätstests an individuellen humanen Tumorproben analysiert werden. Dieses Testsystem wurde unter der Leitung von Prof. B. Wolf am *Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik* der TU München³¹ in Kooperation mit den Firmen *HP Medizintechnik*³² und *Erwin Quarder Systemtechnik GmbH*³³ mit maßgeblicher Unterstützung des *Bundesministerium für Bildung und Forschung* (BMBF Projekt 0315114)³⁴ entwickelt. Das System ermöglicht multiparametrische, metabolische Messungen mithilfe optochemischer Sensoren, Impedanzstrukturen und Lichtmikroskopie. Der Einsatz eines automatisierten Pipettierroboters erlaubt Langzeittests über mehrere Tage und Wochen. Dynamische Wirkstoffanalysen über einen Zeitraum von mehreren Tagen wurden bereits an Zelllinien demonstriert, jedoch noch nicht für Gewebeproben etabliert^{23,25,29,30,35}.

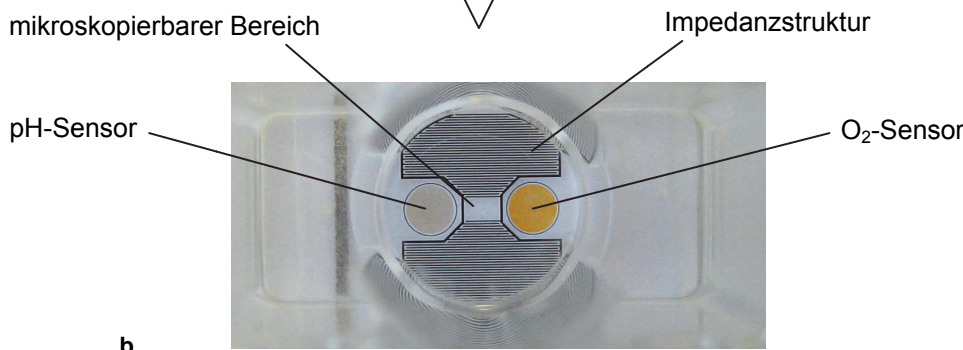
Mit dem Ziel, die Probleme der bereits verfügbaren Assays für Chemosensitivitätsmessungen zu lösen und dadurch eine höhere Genauigkeit und Zuverlässigkeit eines prädiktiven Tests zu erreichen, wurde eine Reihe von Anforderungen an die Durchführung der metabolischen Messungen an Tumorgewebeproben und an das Testsystem gestellt. Oberste Priorität hatte hierbei die Erhaltung der Vitalität und Qualität des Primärgewebes über einen Zeitraum von mindestens drei bis vier Tagen. Das im Rahmen dieser Arbeit zu entwickelnde, gezielt auf die Messungen mit dem IMR-System abgestimmte Präparations- und Messprotokoll, sollte zugleich schonend für die Proben, praktikabel für eine routinemäßige Durchführung und standardisierbar sein.

Neben der Eignung des IMR-Systems für metabolische Analysen war ein zentrales Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob auf der Basis dieser metabolischen Messungen eine Differenzierung zwischen Sensitivität und Resistenz individueller humaner Mammakarzinom-Gewebeproben gegenüber zytostatischen Wirkstoffen möglich ist. Neben dem Potenzial des Systems für einen zukünftigen klinischen Einsatz sollten auch seine Anwendungsmöglichkeiten in der pharmazeutischen Forschung demonstriert werden.

Eingangssignale



a



b

Abb. 1-3: Sensorbasierte Messungen des extrazellulären pH-Werts und der Gelöstsauerstoff-Konzentration

(a) Schematische Darstellung der komplexen und redundanten, z.T. noch unbekanntem intrazellulären Signalwege. Aufgrund der Redundanz und Komplexität resultieren definierte Stimuli (Eingangssignale) nicht zwangsläufig in definierten phänotypischen Reaktionen einer Zelle (Ausgangssignale). (b) Mithilfe sensorbasierter Messungen des extrazellulären Gelöstsauerstoff-Gehalts und des pH-Wertes können Veränderungen der metabolischen Aktivität von Zellen oder Geweben in ihrer Gesamtheit erfasst werden. Abbildungen: modifiziert nach Abbildungen des Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik und Dumont et al.^{21,31}

1.4 Charakteristika von Tumorzellen- und Geweben

1.4.1 Kennzeichen einer Krebszelle

In Nicht-Tumorzellen erfolgt eine äußerst genaue Kontrolle über den Eintritt in und über das Fortschreiten des Zellwachstums- und Teilungszyklus sowie der Einleitung der Apoptose. Durch das kontrollierte Gleichgewicht zwischen Teilung und Absterben von Zellen werden die Gewebemöostase und Organfunktionen aufrecht erhalten³⁶⁻³⁸. Eine Transformation von einer gesunden Zelle zu einer Tumorzelle findet dann statt, wenn diese Regulationsmechanismen zur Hemmung der Zellproliferation und Einleitung von Apoptose eingeschränkt oder nicht funktionsfähig sind. Mutationen der verantwortlichen Gene können spontan, durch äußere Einflüsse bewirkt, oder erblich bedingt auftreten³⁹⁻⁴².

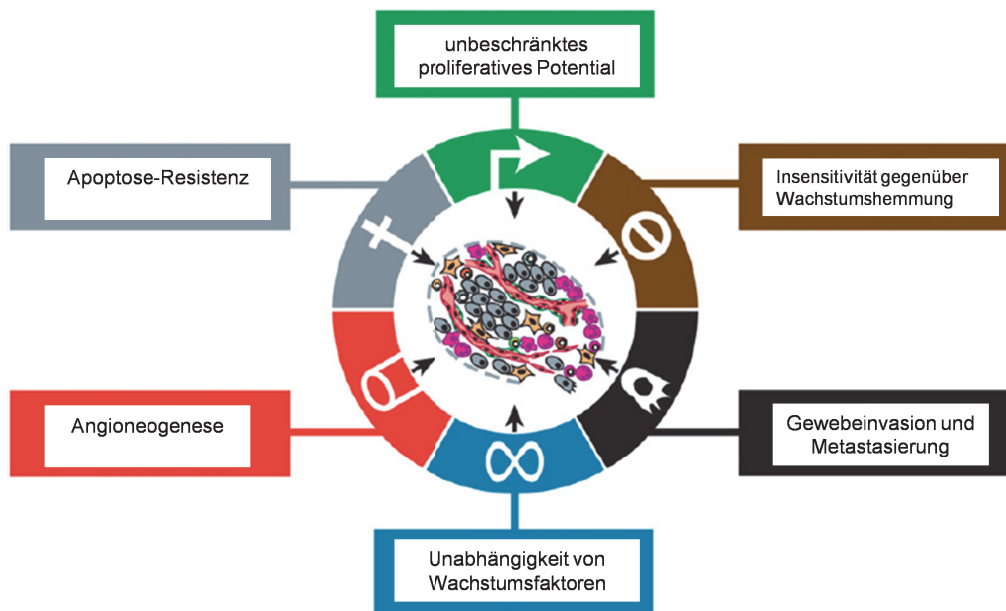


Abb. 1-4: Kennzeichen einer Tumorzelle

Dargestellt sind die sechs essenziellen Charakteristika einer maligne entarteten Zelle (postuliert von Hanahan und Weinberg⁴³). Diese sind unbeschränktes proliferatives Potenzial, Unabhängigkeit von Wachstums-faktoren, Insensitivität gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Apoptose-Resistenz, Gewebeinvasion, Metastasierung und Induktion der Angiogenese. Abbildung modifiziert nach Hanahan et al.⁴³

Als die klassischen Kennzeichen von Tumorzellen werden im Allgemeinen deren Fähigkeit zur ständigen, unkontrollierten Proliferation und zur Metastasierung angesehen. Hinzu kommen weitere, von Hanahan und Weinberg⁴³ postulierte spezifische Charakteristika (Abb. 1-4), die häufig bei der Transformation zu bösartigen Krebszellen auftreten:

- unbeschränktes proliferatives Potenzial^{42,44,45}
- Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren^{42,44,45}
- Insensitivität gegenüber wachstumshemmenden Signalen^{38,41}
- Apoptose-Resistenz^{38,41,46}
- Gewebeanvasion und Metastasierung^{12,47}
- Induktion der Angiogenese⁴⁸

1.4.2 Unbeschränktes proliferatives Potenzial

Eine verstärkte metabolische und proliferative Aktivität von Tumorzellen wird einerseits durch die übermäßige Expression von Wachstums- und Hormonrezeptoren auf der Zelloberfläche^{17,49}, andererseits durch die Fehlregulation intrazellulärer proliferationsfördernder Enzyme induziert. Eine zentrale Rolle spielen hierbei die an der Regulation der Signalweiterleitung und Signalverstärkung beteiligten Proteinprodukte aktivierter Onkogene (v.a. Abl^I, Src^{II}, Ras^{III}, Ki67, Myc^{IV}). Deren Überexpression oder konstitutive Aktivierung resultiert in einer ständigen und verstärkten Weiterleitung von Wachstumssignalen in den Zellkern^{10,16,41,49-54}. Weiterhin verhindert die Inaktivierung von Apoptose-induzierenden Faktoren (v.a. Rb^V, P53^{VI}, P21^{VII}, Bax^{VIII}, BRCA1^{IX}, Bcl2^X) den kontrollierten Zelltod^{13,38,46,55,56}. In Abb. 1-5 sind die intrazellulären Signalwege zur Stimulation von Zellteilung und Apoptose, sowie die zur Krebsentstehung und Progression beitragenden Schlüsselmoleküle, dargestellt.

In gleicher Weise führt die Überexpression und konstitutive Aktivierung des Onkogens Myc zu überschießendem Zellwachstum und Proliferation. Ausserdem spielt Myc eine Rolle bei Veränderungen des Metabolismus von Tumorzellen.

Neben der Aktivierung der konstitutiven Proliferation inaktivieren Krebszellen die Hemmmechanismen für das Zellwachstum und die Zellproliferation. Dies geschieht durch Mutationen, die Verlust und Inaktivierung der Tumorsuppressoren Rb, P21 und P53 zur Folge haben. Diese Proteine sind zentrale Kontrollpunkte, die über das Fortschreiten des Zellzyklus bestimmen und diesen blockieren können,

^I Abl: Abelson Murine Leukemia Virus

^{II} Src: Akronym aus *cellular* und *sarcoma*

^{III} Ras: Rat Sarcoma Virus

^{IV} Myc: abgeleitet von der Krankheit Myelocytomatose

^V Rb: Retinoblastoma protein

^{VI} P53: Protein 53

^{VII} P21: Protein 21

^{VIII} Bax: Bcl-2-associated X protein

^{IX} BRCA1: Breast Cancer 1 protein

^X Bcl2: B-cell lymphoma-2 protein

wenn bspw. Defekte an der DNA vorliegen. Das Tumorsuppressorgen Rb ist in 60 % aller Tumoren durch Mutationen inaktiviert⁴¹.

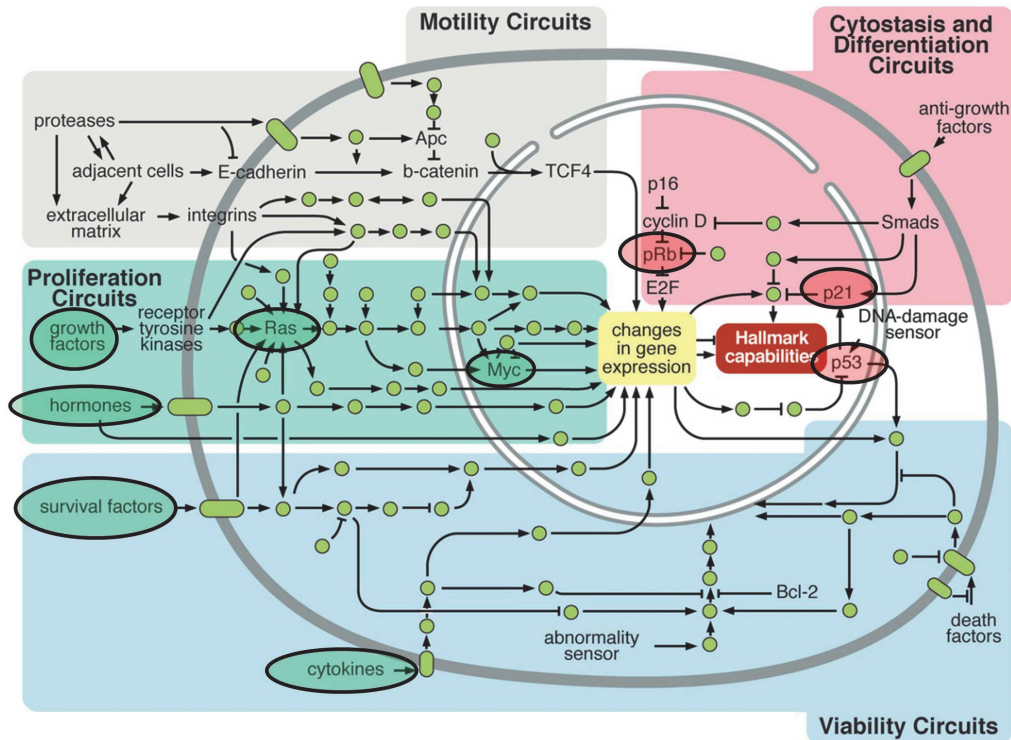


Abb. 1-5: Intrazelluläre Signalweiterleitung bei Zellteilung und Apoptose

Dargestellt sind vereinfacht die wichtigsten intrazellulären Signalwege zum Einleiten von Zellproliferation und Apoptose. Die in Tumoren häufig mutierten Onkogene und Tumorsuppressorgene sind umrandet. *grün*: Häufig überexprimierte proliferationsfördernde Faktoren; *rot*: häufig inaktivierte proliferationshemmende oder Apoptose-induzierende Faktoren. Deutlich werden die Redundanz und Interaktionen zwischen intrazellulären Signalübertragungswegen. Abbildung modifiziert nach Hanahan et al.⁴³

1.4.3 Zellmetabolismus

Die zelluläre Energiegewinnung erfolgt in Nicht-Tumorzellen typischerweise über die anaerob ablaufende Glykolyse^{41,57} unter Bildung von Pyruvat, gefolgt von der sauerstoffverbrauchenden mitochondrialen Atmung^{41,57} unter Bildung von Kohlendioxid (CO₂), und Wasser (H₂O).

Im Verlauf der Glykolyse^{41,57} werden Glukosemoleküle über mehrere, im Zytosol verlaufenden enzymkatalysierten Reaktionen zu Pyruvat metabolisiert. Da die Reaktionen der Glykolyse ohne Beteiligung von molekularem Sauerstoff erfolgen, kann somit die Energiegewinnung auch unter anaeroben Bedingungen sichergestellt werden. Hierbei wird das gebildete Pyruvat unter Regeneration von NAD⁺ zu Laktat reduziert und aus der Zelle ausgeschieden (Abb. 1-6a).

Unter aeroben Bedingungen wird Pyruvat in der mitochondrialen Matrix zu dem Stoffwechselzwischenprodukt Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) umgesetzt, welches in den Citratzyklus^{41,57} eintritt. In mehrere Oxidationsschritte werden Acetyl-Gruppen, Protonen und Elektronen auf NAD⁺ und FAD

übertragen. Die hochenergetischen Moleküle $\text{NADH}+\text{H}^+$ und FADH_2 übertragen Elektronen auf die Mitochondrien-Innenmembran, wo diese die Elektronentransportkette^{41,57} passieren. Die hierbei freiwerdende Energie wird zum Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten über die innere Mitochondrien-Membran verwendet. Die beim Rückstrom der Protonen freiwerdende Energie wird durch die ATP-Synthase zur schrittweisen Bildung von ATP aus ADP genutzt. Für diesen Prozess wird molekularer Sauerstoff (O_2) benötigt, dieser fungiert als terminaler Elektronen-Akzeptor und wird zu Wasser reduziert. Diese Kopplung von Redox-Reaktionen der Elektronentransportkette mit der durch einen elektrochemischen Gradienten vermittelten ATP-Produktion wird als oxidative Phosphorylierung^{41,57} bezeichnet (Abb. 1-6b).

Durch die Phosphorylierungsschritte während der Glykolyse werden pro Mol Glukose zwei ATP gebildet, jedoch wird der Hauptanteil von ATP des Glukose-Metabolismus mithilfe der oxidativen Phosphorylierung erzeugt, bei der pro Mol Glukose 36 Mol ATP entstehen.

Da das Zellwachstum und die Zellteilung große Mengen an Aminosäuren, Lipiden und Nukleinsäuren erfordern, wird die Aktivität der Glykolyse und der Mitochondrien während der Proliferation gesteigert. Zur Bereitstellung von Ribose-Zucker für die Synthese von Nukleinsäuren wird ein Teil des während der Glykolyse gebildeten Glukose-6-Phosphats in den Pentosephosphat-Weg eingeschleust⁵⁸. Bei Zellen mit einem sehr hohen Energieverbrauch, wie bspw. Tumorzellen, kommt es häufig zu einem veränderten Citratzyklus. Die Metabolite werden nicht nur für die oxidative Phosphorylierung, sondern verstärkt zur Synthese von Biomolekülen verwendet. Das während des Citratzyklus gebildete Citrat wird zur Synthese von Lipiden, Aminosäuren und Nukleotid-Synthese genutzt. Durch die verstärkte Biosynthese im Zuge der Teilungsaktivität von Zellen kommt es zu einem gesteigerten Verbrauch der Zelle an Nährstoffen und O_2 und somit zu einer verstärkten Ausschleusung von CO_2 und Laktat aus der Zelle, und somit zu einer verstärkten Ansäuerung der extrazellulären Umgebung^{41,57,59}.

Neben dem Energiemetabolismus und der Bereitstellung von Molekülen zur Biosynthese spielen Mitochondrien eine wichtige Rolle bei der Einleitung der Apoptose⁶⁰.

Warburg-Effekt

Die wichtigsten Merkmale, durch die sich nahezu alle Tumorzellen von Nicht-Tumorzellen unterscheiden, sind gravierende Veränderungen des Zellmetabolismus und ein Anstieg des intrazellulären pH-Werts^{61,62}. Kennzeichnend hierfür ist eine stark erhöhte glykolytische Aktivität mit entsprechend gesteigerter Bildung von Laktat⁶³. Gleichzeitig ist eine verminderte Aktivität der mitochondrialen Atmung - auch unter Anwesenheit von ausreichend Sauerstoff - zu beobachten. Dieses Phänomen wurde im Jahr 1924 von dem Nobelpreisträger Otto Warburg (1883–1970) erstmals beschrieben und anhand von Tumorgewebeschnitten nachgewiesen⁶⁴. Der Shift zur verstärkten aeroben Glykolyse von Tumorzellen wird dementsprechend als „Warburg-Effekt“ bezeichnet. In normalen Zellen tritt eine verstärkte Glykolyse ebenfalls auf, jedoch ausschließlich unter hypoxischen Bedingungen, wenn die mitochondrielle Atmung durch Sauerstoffmangel verhindert wird. Auf den ersten Blick scheint die Kombination aus erhöhter glykolytischer Aktivität und verminderter mitochondrialer Atmung nicht sinnvoll zu sein, um den hohen Energiebedarf schnell proliferierender Tumorzellen decken zu können. Die Energieausbeute der Glykolyse ist um das 18-fache geringer als bei der mitochondrialen Atmung. Dennoch bietet der metabolische Shift gravierende Vorteile für Krebszellen gegenüber Nicht-Tumorzellen. Die Energiegewinnung über die Glykolyse ermöglicht es, innerhalb kurzer Zeit große Mengen an ATP für Zellwachstum und Zellteilung bereitzustellen. Dies geschieht mit einer ca. 100-

fach höheren Geschwindigkeit, als dies durch oxidative Phosphorylierung möglich ist. Neben der Energiegewinnung läuft somit auch die Synthese von für das Zellwachstum benötigten Makromolekülen schneller ab⁶⁵⁻⁶⁷.

Hypoxie induzierter Faktor (HIF)

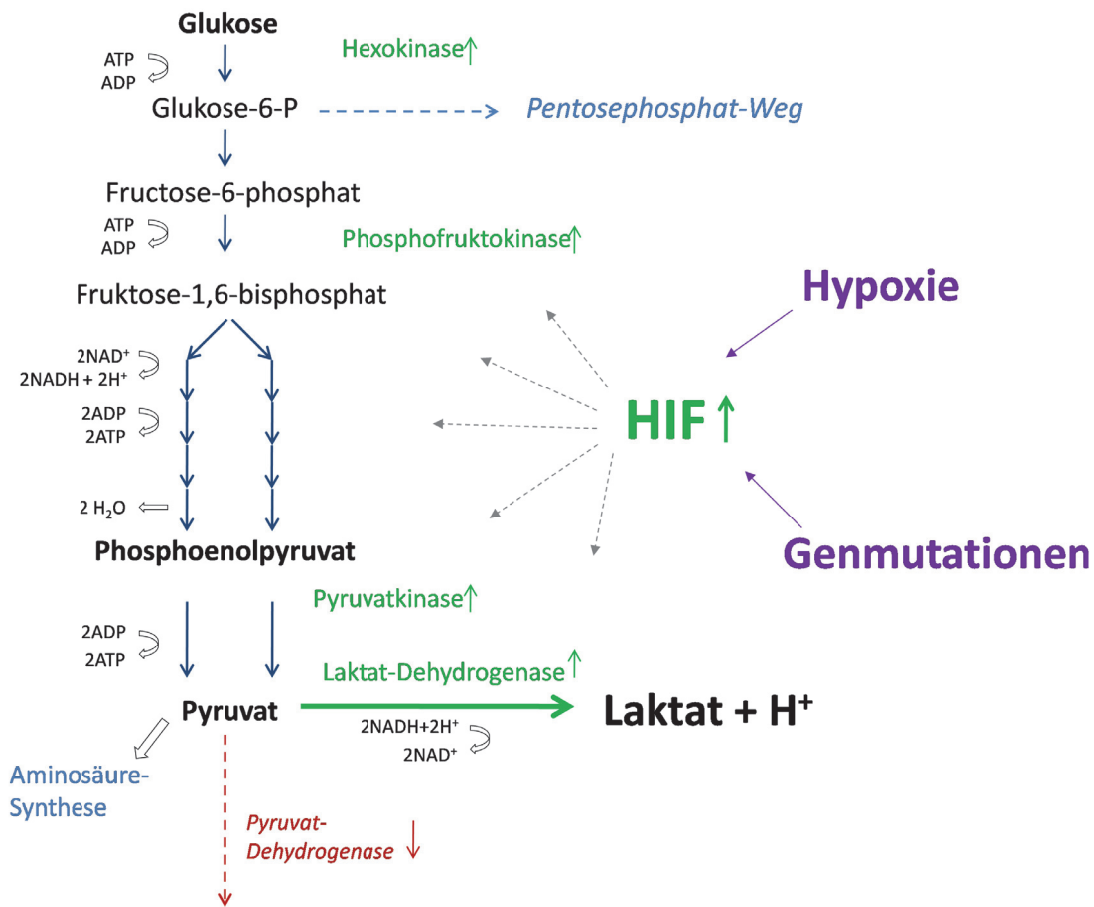
Aufgrund der unregelmäßigen Durchblutung eines schnell wachsenden Tumors kommt es zu starken Schwankungen in der Sauerstoffversorgung einzelner Tumorbereiche⁶⁸⁻⁷⁰. Das Schlüsselmolekül für das Überleben unter hypoxischen Bedingungen ist der *Hypoxie Induzierter Faktor* (HIF). Durch verschiedene Mechanismen treibt die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors den Warburg-Effekt in Tumorzellen voran und verstärkt somit die Malignität des Tumors und Progression der Krebserkrankung^{71,72}.

HIF besteht aus einer sauerstoffsensitiven HIF-1 α und einer HIF-1 β Untereinheit. Unter normalen Sauerstoffbedingungen wird die HIF-1 α Untereinheit direkt über Proteasomen abgebaut. Die HIF-1 β Untereinheit wird nicht durch Sauerstoff reguliert und ist konstitutiv in der Zelle vorhanden. Hypoxische Bedingungen führen dazu, dass HIF-1 α stabilisiert wird, und es zu einer Dimerisierung beider Untereinheiten kommt⁷³⁻⁷⁵. Dieser Protein-Komplex aktiviert und verstärkt die Transkription von Genen, die die Adaption von Zellen an die Sauerstoffmangelbedingungen ermöglichen⁷⁶. So wird durch die Neubildung von roten Blutkörperchen ein verstärkter Sauerstofftransport induziert, sowie über die Sekretion des *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) die Angiogenese stimuliert.

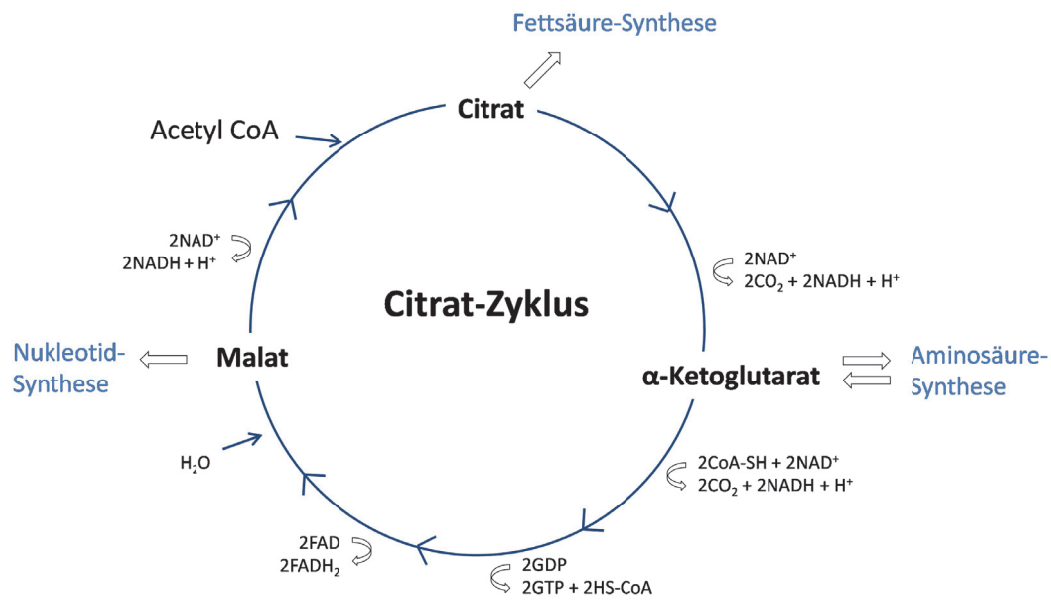
Besonders wichtig für Tumorzellen ist jedoch die HIF- induzierte, verstärkte Expression von Genen, die zur Stimulation des anaeroben Zellmetabolismus, sowie Zellwachstum und -Überleben führen, u.a. Myc, Ras und Akt^{53,54} (Abb. 1-5). GluT-Transporter zur Glukoseaufnahme in die Zelle und Enzyme der Glykolyse, wie Hexokinase, Phosphofruktokinase, Pyruvat-Kinase und Laktat-Dehydrogenase werden verstärkt exprimiert und auf diese Weise die glykolytische Aktivität stark gesteigert. Gleichzeitig hemmt HIF die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA (Abb. 1-6). Die verringerte Verfügbarkeit von Acetyl-CoA führt wiederum zu einer Abnahme der mitochondrialen Aktivität⁷⁷. Durch die Laktat-Dehydrogenase wird das sich ansammelnde Pyruvat zu Laktat abgebaut, welches aus der Zelle ausgeschieden wird. Aufgrund der meist schlechten Durchblutung solider Tumore kann es nicht abtransportiert werden, wodurch die Ansäuerung der extrazellulären Umgebung verstärkt wird^{66,77,78}.

Abb. 1-6: Glykolytische und mitochondriale Aktivität und der Einfluss des Hypoxie Induzierten Faktor (HIF)

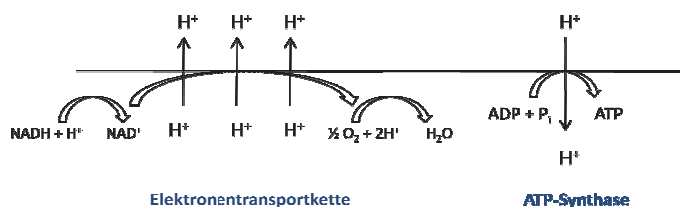
(a) Im Verlauf der Glykolyse entsteht in mehreren Schritten pro Mol Glukose über die Bildung von Glukose-6-Phosphat, Fructose-6-phosphat, Fructose-1,6-bisphosphat und Phosphoenolpyruvat, zwei Mol ATP, zwei Pyruvat, zwei NADH, ein Mol Laktat und Acetyl-CoA. (b) Während des Citratzyklus werden die hochenergetischen Moleküle NADH+H⁺ und FADH₂ gebildet, die (c) zur Energiegewinnung über die oxidative Phosphorylierung genutzt werden. Unter Verbrauch von O₂ entstehen pro Mol Glukose 36 ATP, H₂O und CO₂. Für die Synthese von Aminosäuren, Fettsäuren und Nukleinsäuren können einige der während der Glykolyse und des Citratzyklus gebildeten Metaboliten verwendet werden. Durch Sauerstoffmangel und Genmutationen aktiviertes HIF induziert den Warburg-Effekt, in dessen Folge die glykolytische Aktivität gesteigert und die mitochondriale Atmung gehemmt wird. Dargestellt sind die wichtigsten Metabolite (*schwarz*), durch HIF hochregulierte (*Pfeile, grün*) und runterregulierte Enzyme (*Pfeil, rot*) sowie Biosynthesewege (*blau*).



a



b



c

1.4.4 Tumormikroumgebung

Neben den Eigenschaften der Tumorzellen haben die Einflüsse des umgebenden Gewebes gravierende Auswirkungen auf Tumorwachstum, Invasion und Therapie-Sensibilität⁷⁹. Hierbei spielen die Nährstoffverfügbarkeit, die Gelöstsauerstoff-Konzentration, die pH-Bedingungen und die Eigenschaften der vorhandenen Nicht-Tumorzellen eine Rolle^{42,69,70,79-87}. Wie bereits bekannt ist, besitzen Nicht-Tumorzellen, wie tumorassoziierte Fibroblasten^{42,83} und Immunzellen^{84,85} einen ebenso großen Einfluss auf die Progression und Chemosensitivität eines Tumors wie die einzelne Karzinomzelle selbst und können somit den Erfolg einer Tumor-Therapie wesentlich mitbestimmen^{42,83,84,86,88}.

Karzinomzellen interagieren in engen Maß mit ihrer Mikroumgebung, die aus Stromakomponenten (Fibroblasten, Immunzellen, Gefäßsystem) und der extrazellulären Matrix zusammengesetzt ist. Dies führt zu gravieren Veränderungen der Eigenschaften sowohl von Tumor- als auch von Nicht-Tumorzellen. Durch die Expression von Wachstumsfaktoren (PDGF^{XI}, VEGF^{XII}, bFGF^{XIII}, TGF^{XIV}) und Interleukinen aktivieren Tumorzellen Fibroblasten dazu, zu tumorassoziierten Fibroblasten zu differenzieren. Diese sezernieren wiederum Wachstumsfaktoren, die die Tumorzellen zur Proliferation stimulieren^{42,81}.

Die Entstehung von Fern-Metastasen setzt die Wanderung von Tumorzellen durch das Gewebe voraus. Bei der Migration durch das Gewebe spielen neben den Tumorzellen selbst besonders Fibroblasten und Immunzellen eine besondere Rolle, indem sie den Plasminogen-Aktivator vom Urokinasetyp (uPA) verstärkt exprimieren. Dieser induziert den Abbau der extrazellulären Matrix durch die Protease Plasmin und Matrix-Metalloproteasen (MMP). Antagonisten der Aktivität von uPA sind die Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren Typ-1 und Typ-2 (PAI-1, PAI-2). Das Vorhandensein dieser für eine metastasierende Aktivität charakteristischen Faktoren, wird immer mehr als Prognosemarker für die Aggressivität des Tumors, den Verlauf der Erkrankung und des individuellen Rezidiv-Risikos angesehen^{12,47,89} (Abschnitt 1.7.5). Weiterhin hat der Abbau der extrazellulären Matrix eine weitere Aktivierung von Tumor-assoziierten Fibroblasten, wie auch eine Infiltration von Makrophagen in das Gewebe und eine unkontrollierten Neubildung von Blutgefäßen zur Folge⁴⁸. Dies führt zu variierenden der Glukose- und Nährstofflevel, zu Hypoxie und Azidose des Gewebes⁷⁰. Der maximale Abstand von einem Blutgefäß, bei dem eine Zelle per Diffusion noch ausreichend mit Nährstoffen und O₂ versorgt und der Abtransport von Stoffwechsel-Abbauprodukten (z.B. Laktat) gewährleistet wird, liegt bei ca. 150 µm^{80,90}. Wie in Abschnitt 1.4.3 beschrieben, induzieren hypoxische Bedingungen eine durch HIF vermittelte verstärkte Aktivität glykolytischer Enzyme, wodurch die extrazelluläre Ansäuerung weiter verstärkt wird⁷⁶. Da der extrazelluläre pH-Wert (pHe) eng mit dem intrazellulären korreliert, führt eine extrazelluläre Azidose normalerweise zu einer Abnahme des zytosolischen pH-Werts. Ein Absinken des intrazellulären pH-Werts (pHi) bedeutet eine Abnahme der metabolischen Aktivität und letztendlich den programmierten Zelltod⁹¹. Kennzeichnend für Tumorzellen ist ein gestörtes intra- und extrazelluläres Säure-Base-Gleichgewicht. Im Vergleich zu normalen Gewebzellen besitzen Tumorzellen einen deutlich basischeren intrazellulären pH-Wert (Tumorzelle: pHi 7.12 bis 7.65, Nicht-Tumorzelle: pHi 6.99 bis 7.20). Der extrazelluläre pH-Wert liegt im Vergleich zu Nicht-Tumorgewebe in einem

^{XI} PDGF: Platelet-derived growth factor

^{XII} VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

^{XIII} bFGF: Basic fibroblast growth factor

^{XIV} TGF: Transforming growth factor

deutlich saureren Bereich (Tumorgewebe: pHe 6.2 bis 6.9; Nicht-Tumorgewebe: pHe 7.3 bis 7.4)⁹²⁻⁹⁴. Tumorzellen besitzen die Fähigkeit, sich gezielt an die häufig wechselnden extrazellulären pH-Wert-Bedingungen anzupassen. Durch Überexpression und konstitutive Aktivität von in der Zellmembran lokalisierten Ionenkanälen können Überschüssige H^+ -Ionen aus der Zelle hinaus transportiert werden und der intrazelluläre pH Wert auf einem stabilen, leicht basischen Level (pH 7.12 bis 7.65) gehalten werden⁶⁷. Die wichtigsten Ionenkanäle sind hierbei der Na^+/H^+ -Austauscher (NHE-1)^{95,96} und der Na^+ -abhängige HCO_3^-/Cl^- Austauscher⁹⁷. Ein leicht basischer intrazellulärer pH-Wert bietet nicht nur den Vorteil, dass pH-induzierte Apoptose verhindert wird, sondern führt auch zu einer konstitutive Aktivierung der Proliferationsaktivität^{94,98,99}. Weiterhin ist ein saurer pHe ein stark immunsuppressiver Faktor in soliden Tumoren. Niedrige pH-Werte hemmen die Proliferation sowie die zytotoxische Aktivität von Lymphozyten und natürliche Killerzellen gegenüber Tumorzellen^{84,100}.

1.4.5 Tumorheterogenität

Nicht nur unterschiedliche Tumore weisen individuelle Charakteristika auf, auch innerhalb verschiedener Bereiche desselben Tumors zeigen sich unterschiedliche phänotypische Eigenschaften der Karzinomzellen und der Tumor-Mikroumgebung. Durch Mutationen der Karzinomzellen (klonale Diversifizierung), die spontan, aber auch durch Veränderungen der extrazellulären Umgebung ausgelöst werden, resultiert eine Heterogenität der Chemosensitivitäts- und Resistenzeigenschaften einzelner Tumorbereiche. Auch Fernmetastasen weisen in der Regel starke Unterschiede zu den Charakteristika des ursprünglichen Tumors auf (Abb. 1-7)^{39,67,101,102}.

Da eine Biopsieprobe nur aus einem kleinen Bereich eines Tumors entnommen wird, sind histologische Befunde, die auf dieser Basis erhoben werden, folglich nicht repräsentativ für den gesamten Tumor. Dies birgt die Gefahr von Fehlentscheidungen in der Therapieplanung.

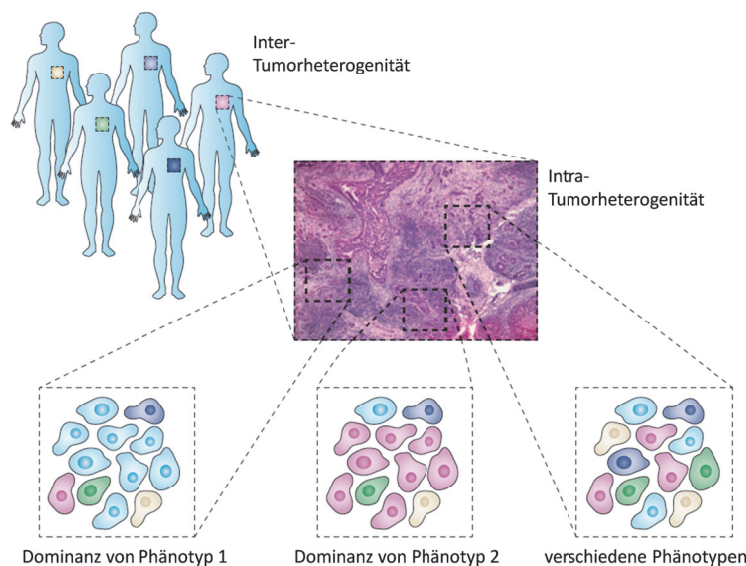


Abb. 1-7: Heterogenität der phänotypischen Eigenschaften innerhalb des selben und unterschiedlicher Tumore

Nicht nur zwischen individuellen Tumoren, sondern auch innerhalb desselben Tumors treten gravierende geno- und phänotypischen Unterschiede der Tumorzellen auf. Abbildung modifiziert nach Marusyk et al.⁷⁰

1.5 Extrazelluläre Ansäuerung und Sauerstoffabnahme als Marker für die Zellvitalität

Im Allgemeinen induzieren extrazelluläre oder intrazelluläre Stimuli wie bspw. Wachstumsfaktoren, Hormone, Zell-Zell-Interaktionen oder Chemotherapeutika eine Reihe intrazellulärer Signalkaskaden, die diese Signale amplifizieren und zu einer spezifischen Genexpression führen. Dies ermöglicht ein schnelles phänotypisches Anpassen der Zellen an sich verändernde Umgebungsbedingungen, bspw. einer Verstärkung von Proliferations- und metabolischer Aktivität bei großer Nährstoffverfügbarkeit sowie Veränderungen der Morphologie oder das Induzieren von Apoptose^{21,22,41}. Abb. 1-3 und Abb. 1-5 verdeutlichen, dass intrazelluläre Signalkaskaden nicht parallel und linear ablaufen, sondern eine große Komplexität und Redundanz aufweisen. Regulatorproteine innerhalb dieses Netzwerks interagieren miteinander in dynamischer und teilweise noch unbekannter Weise. Hierdurch kann die Signalweiterleitung in den Zellkern auch bei (Funktions-)Verlust einzelner Signalproteine aufrecht erhalten werden. Die Redundanz verschiedener intrazellulärer Signalübertragungswegen lässt somit keine eindeutige Korrelation zwischen Eingangssignalen und spezifischen Veränderungen der Genexpression und phänotypischen Reaktionen einer Zelle zu^{21,22}. Dies verringert den prädiktiven Wert auf Gen- oder Proteinexpression basierenden prädiktiven Analysen und spielt eine große Rolle bei der Entwicklung von Resistenzen gegenüber zielgerichteter Tumorthérapien.

Die sensorbasierte Messung von extrazellulären Parametern hingegen ermöglicht es, alle in einer Zelle ablaufenden Mechanismen und deren Einfluss auf die phänotypische Reaktion von Zellen in ihrer Gesamtheit zu erfassen und in eine Vitalitätsanalyse von Zellen oder Geweben mit einzubeziehen. Ein Großteil des von einer Zelle verbrauchten Sauerstoffs wird bei der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien umgesetzt, ein weiterer Teil von teilweise noch unbekanntem intrazellulären Mechanismen. Weiterhin trägt das während der Glykolyse gebildete Laktat zu einem großen Teil zur extrazellulären Ansäuerung bei^{41,103,104}. Nicht-invasive, sensorbasierte Messung der Veränderungen des O₂-Gehalts und des pH-Werts des extrazellulären Mediums können somit Hinweise auf die Stärke der metabolischen Aktivität von Zellen geben. Dies kann genutzt werden um zelluläre Vitalitätsverluste, bspw. als Folge von Wirkstoffzugaben, zu analysieren^{30,105-107} (Abb. 1-3).

1.6 Krebsbehandlung und Therapieresistenz

1.6.1 Behandlungsstrategien

Ziel einer Krebsbehandlung ist zunächst die kurative Behandlung mit dem Ziel der Heilung. Die drei Säulen der Krebstherapie sind die operative Entfernung des Tumors, die Bestrahlung und die systemische Therapie mit zytostatischen Wirkstoffen. Weitere Ansätze in der systemischen Behandlung basieren auf zielgerichteten Antikörper- und Hormontherapien. Die im Einzelfall ausgewählten Behandlungsstrategie oder Kombinationen verschiedener Therapien variiert in Abhängigkeit vom Tumortyp, dem Stadium der Erkrankung, den histologischen Eigenschaften des Tumorgewebes und dem Alter des Patienten². Es gibt verschiedene Ansätze der Chemotherapie, die sich im zeitlichen Ablauf und Behandlungsziel unterscheiden. Erfolgt zunächst eine Verkleinerung des Tumors durch die

Chemotherapie mit einer anschließenden Operation, spricht man von einer neoadjuvanten Chemotherapie. Diese wird angewendet, wenn aufgrund der Größe oder der Position des Tumors im Körper eine Operation nicht, oder nur schwierig, möglich ist. Zusätzlich können vorhandene Metastasen schneller bekämpft werden. Durch eine nach einer Operation folgende adjuvante Chemotherapie sollen am Resektionsrand verbliebene Tumorzellen und möglicherweise vorhandene Mikrometastasen abgetötet werden, um das Rezidivrisiko zu verringern. Wenn keine Heilung mehr zu erwarten ist erfolgt eine palliative Therapie. Hierbei soll die Lebensqualität und der Überlebenszeitraum verbessert werden.

Zytostatika-Therapie

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Chemosensitivitätstests wurden die klassischen Zytostatika Chloroacetaldehyd (CAA), Doxorubicin (DOX) und 5-Fluoruracil (5-FU) eingesetzt, die bei der Behandlung des Mammakarzinoms häufig Verwendung finden. Die Vielzahl an verschiedenen Wirkmechanismen der Substanzen ist im Detail größtenteils noch nicht eindeutig geklärt. Ob überhaupt ein Effekt eines Zytostatikums eintritt und wie stark dieser ausfällt, ist in hohem Maße von der in der Zelle erreichbaren Wirkstoffkonzentration abhängig¹⁰⁸⁻¹¹¹.

Ifosfamid. Durch Metabolisierung durch Cytochrom P450 in der Leber wird der Wirkstoff unter anderem zu der aktiven Komponente *Chloroacetaldehyd* (CAA) umgesetzt. Aus Alkylierung der DNA und Quervernetzungen von DNA-Strängen resultieren Einzelstrangbrüche und somit die Inhibition der DNA-Synthese, welche den Zelltod zur Folge haben. Desweiteren kommt es innerhalb kurzer Zeit nach der Applikation zur Verringerung der mitochondrialen Atmung und Fettsäureoxidation¹¹²⁻¹¹⁴.

Doxorubicin (DOX). Das Anthracyclin ist eines der effektivsten Medikamente zur Behandlung von Krebserkrankungen und wird seit über 30 Jahren eingesetzt. Der wichtigste Wirkmechanismus ist das Interkalieren in die DNA, wodurch die Aktivität der Topoisomerase II blockiert wird. Nach dem Schneidvorgang während der Replikation der DNA können die DNA-Stränge nicht wieder miteinander verbunden werden, hierdurch entstehen zum Zelltod führende Doppelstrangbrüche. Desweiteren verringert DOX die mitochondriale Aktivität, indem es u.a. die Hemmung des mitochondrialen Elektronentransfers, der oxidativen Phosphorylierung und der Lipidperoxidation induziert^{111,115-117}.

5-Fluoruracil (5-FU). Das Fluorpyrimidin gehört zur Gruppe der Antimetaboliten. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit den Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin sowie Uracil wird es statt dieser in die DNA und RNA eingebaut und blockiert die DNA-Synthese^{118,119}.

Zielgerichtete Medikamente

Ein derzeit vielversprechender Therapie-Ansatz ist die spezifische Hemmung überaktiver Proteine innerhalb proliferationsinduzierender intrazellulärer Signalwege und überexprimierter Zelloberflächen-Rezeptoren durch gezielte Antikörpertherapien¹⁶⁻¹⁸. In Abhängigkeit von der Expressionsrate von Hormon- oder Wachstumsfaktor-Rezeptoren auf der Oberfläche von Tumorzellen sind endokrine oder Antikörpertherapien erfolgsversprechend (z.B. Trastuzumab, Cetuximab)^{19,49,120}. Intrazellulär spezifisch wirkende Medikamente sind Tyrosinkinase-Inhibitoren (bspw. Imatinib, Gefitinib)^{17,18}. In diesem Bereich sind eine Reihe weiterer Wirkstoffe in der Entwicklung.

Beeinflussung des Tumor- pH-Werts

Im Zuge der Entwicklung neuer Behandlungsstrategien gerät die Mikroumgebung eines Tumors immer mehr in den Fokus des Interesses. In engem Zusammenhang mit der Teilungsaktivität und Apoptose-Induktion stehen die pH-Bedingungen im Tumor. Ein Schlüssel zur gezielten Manipulation von pH_i und pH_e sind die in die Membran integrierten Na^+/H^+ -Austauscher (NHE1)¹²¹. Derivate des Wirkstoffs Amilorid blockieren die Aktivität des NHE1. Intrazelluläre Protonen können nicht mehr gegen Na^+ -Ionen ausgetauscht werden, so dass es zu einer intrazellulären Ansäuerung kommt, während der extrazelluläre pH-Wert angehoben wird¹²². Durch das Absenken des intrazellulären pH-Werts wird die metabolische Aktivität von Zellen verringert und letztendlich Apoptose ausgelöst. Dieser Therapie-Ansatz wird derzeit noch nicht für die Therapie von Krebserkrankungen eingesetzt^{16,97,121,123,124}.

1.6.2 Mechanismen der Chemoresistenz

Das Ansprechen eines Patienten auf eine Chemotherapie wird durch metabolische Vorgänge im Körper sowie durch individuelle Zell- und Gewebeeigenschaften des Tumors gravierend beeinflusst^{79,125-127}. Entscheidend für einen Therapieerfolg ist die effektiv am spezifischen Wirkort in der Tumorzelle ankommende Medikamentenkonzentration.

Ein allgemeiner Mechanismus um die intrazelluläre Wirkstoffkonzentration zu verringern, ist die Überexpression von Multi Drug Resistance (MDR) Proteinen und P-glycoprotein (P-gp). Diese in die Zellmembran integrierten Transportproteine vermitteln einen beschleunigten Efflux von Wirkstoffen aus der Zelle hinaus. Da der Transport nicht nur auf ein spezifisches Zytostatikum beschränkt ist, sind MDR-Proteine häufig für Kreuzresistenzen verschiedener Wirkstoffe verantwortlich^{125,128,129}. Mutationen intrazellulärer Signalproteine ermöglichen es Tumorzellen, dem durch Zytostatika induzierten apoptotischen Zelltod zu entgehen. Sind P53 oder Bax in einer Zelle nicht funktionstüchtig oder nicht vorhanden, kann nach DNA-Schäden die Apoptose nicht mehr ausgelöst werden. Mehr als die Hälfte aller humanen Tumoren weisen Mutationen des P53-Gens auf. Aus diesem Grund sprechen diese Tumoren nur schlecht auf Chemo- oder Radiotherapie an, was eine schlechtere Prognose für den Patienten bedeutet. Das in vielen Tumoren hochregulierte Bcl-2 hemmt die Freisetzung von Cytochrom c aus der Mitochondrienmembran und vermindert auf diese Weise ebenfalls das Induzieren von Apoptose (Abb. 1-5). Die Effektivität von zielgerichteten Antikörpertherapien wird beeinflusst sowohl durch die Komplexität der intrazellulären Signalweiterleitung, als auch qualitative und quantitative Mutationen der Zielproteine^{38,46,55}.

Da viele chemotherapeutische Wirkstoffe zellzyklusspezifisch agieren, sprechen Tumorzellen mit einer geringen mitotischen Aktivität nur schlecht auf diese Art von Zytostatika an¹³⁰. In diesem Zusammenhang sind die immer wieder diskutierten hochresistenten Tumorstammzellen zu nennen. Die Existenz solcher Zellen konnte noch nicht eindeutig nachgewiesen werden¹³¹. Laut der Theorie unterscheiden sich die Stammzellen von anderen Tumorzellen durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung, ihre Fähigkeit zu allen im Tumor vorkommenden Zellen zu differenzieren, die Expression spezifischer Oberflächenmarker (bspw. CD 44, CD24, Adhäsionsmoleküle) und eine Signalgebung, die auch in adulten

und embryonalen Stammzellen zu finden ist (bspw. Wnt^{XV}-, Shh^{XVI}-, Notch^{XVII}-, PTEN^{XVIII}-Signalwege). Kennzeichnend ist weiterhin besonders ihre sehr geringe Proliferationsaktivität. Aus diesem Grund verhalten sich Tumorstammzellen resistent gegenüber konventionellen Chemo- und Strahlentherapie. Sie stehen im Verdacht, nach einer Behandlung für eine Rezidiv-Entstehung verantwortlich zu sein^{131,132}.

Auch in den Eigenschaften der Tumormikroumgebungen liegen Resistenzen gegenüber Zytostatika begründet. Die häufig auftretende schlechte Durchblutung limitiert die allgemeine Verfügbarkeit von Zytostatika im Gewebe. Weiterhin kann die Diffusion von Wirkstoffen durch die Zusammensetzung des Gewebes und die Bindung an Nicht-Tumorzellen beeinträchtigt sein^{48,127}. Wie bereits in Studien nachgewiesen werden konnte, beeinflussen Nicht-Tumorzellen des Gewebes wie tumorassoziierte Fibroblasten^{42,83,86} und Immunzellen^{84,85,88}, die Chemosensitivitäts- und Resistenzeigenschaften ebenso stark wie die Tumorzelle selbst. In hypoxischen Arealen sind therapeutische Effekte von Zytostatika und Strahlentherapie häufig herabgesetzt, da Sauerstoff Radikale für zytotoxische Effekte benötigt werden¹³³. Desweiteren kann der Wirkeffekt von Zytostatika durch variierende extrazelluläre pH-Werte beeinflusst werden^{82,102,108}.

Aufgrund der genetischen Instabilität von Krebszellen agieren zytotoxische Chemotherapeutika als Selektionskräfte für die Ausbildung von Resistenzen. Basierend auf der hohen Proliferationsrate entwickeln sich neue Zell-Phänotypen, die sich durch Resistenz-Strategien an die Bedingungen der Chemotherapie anpassen. Obwohl diese resistenten Klone nur in einer geringen Anzahl im ursprünglichen Tumor auftreten, ermöglichen sie durch ihre Proliferation ein erneutes Auswachsen des Tumors während oder nach der Zytostatika-Therapie (Abb. 1-7)^{5,6,70}. Unterschiede in den Sensitivitäts- und Resistenzeigenschaften treten somit nicht nur zwischen verschiedenen Tumoren, sondern auch innerhalb desselben Tumors auf.

^{XV} Wnt: Signalweg benannt nach dem Liganden Wingless und Int-1

^{XVI} Shh: Signalweg benannt nach dem Liganden Hedgehog

^{XVII} Notch: Signalweg benannt nach dem Rezeptor Notch

^{XVIII} PTEN: Signalweg benannt nach dem Enzym Phosphatase and Tensin homolog

1.7 Methoden zur Chemosensitivitätstestung

Um eine effizientere Tumorbehandlung zu ermöglichen und Resistenzen gegenüber Chemotherapien bestmöglich zu umgehen, ist eine Personalisierung der Behandlungsstrategien dringend erforderlich. Bereits in den 1950er Jahren wurde versucht, mithilfe von in vitro Labortests das Ansprechen individueller Tumore auf eine bestimmte zytostatische Krebsbehandlung zu prognostizieren¹³⁴⁻¹³⁶. In den folgenden Jahrzehnten wurden diverse Assays mit unterschiedlichen Messprinzipien zur Untersuchung der Chemosensitivität oder Chemoresistenz von Tumoren entwickelt. Unterschiede zwischen den Testverfahren gibt es hinsichtlich ihrer Präparationsmethoden des frischen Tumorgewebes, der Kultivierung, der Testdauer sowie eingesetzter Wirkstoff-Konzentrationen und vor allem der untersuchten prädiktiven Marker für Sensitivität und Resistenz^{136,137}.

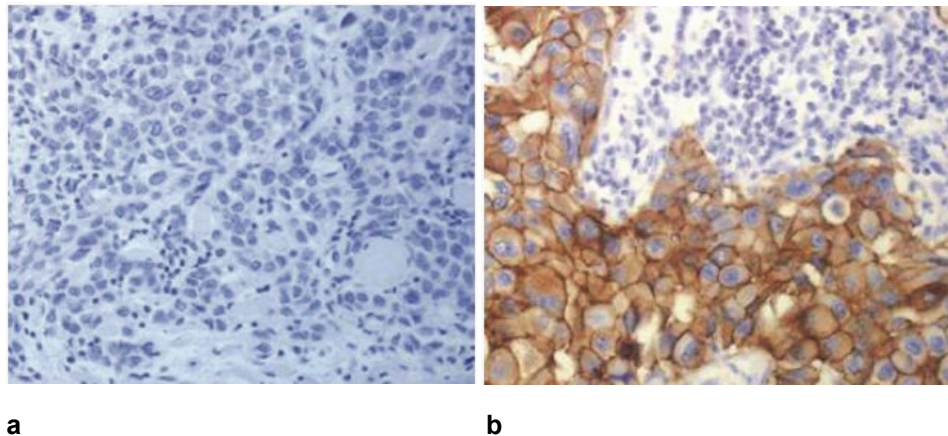
1.7.1 In vivo Testmethoden

Für Chemosensitivitätstests an Tiermodellen werden immundefizienten Mäusen Teile des zu untersuchenden Tumors implantiert und dessen Wachstum nach Zytostatika-Behandlungen gemessen¹³⁸. Vorteil dieser Methode ist, dass die Umgebungsbedingungen des Tumors große Ähnlichkeit mit den physiologischen Bedingungen im menschlichen Körper aufweisen. Die im Körper stattfindenden Transport- und Katabolismus-Vorgänge bevor der Wirkstoff die Zielzellen erreicht, können simuliert werden. Dennoch stellt sich die Frage, in wie weit die Eigenschaften der transplantierten Tumoren nach einem langen Zeitraum des Wachstums im Wirtsorganismus, einschließlich möglicher Mutationen, noch repräsentativ für den ursprünglichen Tumor sind^{139,140}. In vivo Methoden erzielen zwar vergleichsweise gute prädiktive Ergebnisse für eine geplante Chemotherapie, jedoch werden sie in der Praxis aufgrund des hohen Aufwands und des langen Zeitraums bis zum Vorliegen eines Testergebnisses kaum angewendet^{137,141}.

1.7.2 Histologische und bildgebende Verfahren

Immunhistochemie

Bei der Diagnose eines Mammakarzinoms werden standardmäßig klinisch relevante Prognosefaktoren für den individuellen Verlauf der Erkrankung und das Rezidiv-Risiko untersucht. Dies sind die Tumorgroße, Lymphknoten-Befall und Metastasierung (TNM-Schema), sowie das Grading, der histologische Tumortyp und das Alter der Patientin. Speziell beim Mammakarzinom werden standardmäßig immunhistochemische Untersuchungen der Expression von Östrogen-, Progesteron- und HER2-Rezeptoren (Abb. 1-8) auf der Oberfläche von Tumorzellen durchgeführt. Auf diese Weise können prädiktive Aussagen über den Nutzen einer endokrinen Therapie oder Antikörpertherapie getroffen werden^{2,49,142,143}. Über den Therapieerfolg weiterer zytostatischer Wirkstoffe lassen sich anhand dieser immunhistochemischen Untersuchungen jedoch keine ausreichend sicheren prädiktiven Aussagen treffen.

**Abb. 1-8: Immunhistochemische Untersuchung der HER2-Expression**

Nachweis der Expression des Humanen Epidermalen Wachstumsfaktors (HER2) mittels Antikörperfärbung (braun) und Gegenfärbung mit Hämatoxylin (blau). (a) Invasives duktales Mammakarzinom ohne HER2-Expression (HER2-Score 0), (b) Invasives duktales Mammakarzinom mit überexprimiertem HER2-Rezeptor (HER2-Score 3+). Die Expressionsstärke von HER2 weist auf eine erfolgsversprechende Antikörpertherapie hin. Vergrößerung 20x. Abbildungen modifiziert nach Badowska-Kozakiewicz et al.⁴⁹

Differential Staining Cytotoxicity-Assay (DiSC-Assay)

Ein klassisches Beispiel für einen mikroskopischen Chemosensitivitätstest ist der Differential Staining Cytotoxicity-Assay (DiSC-Assay)¹⁴⁴. Hierbei wird der Zelltod als Reaktion auf Wirkstoffbehandlungen untersucht. Nach der Wirkstoffinkubation wird ein Farbstoff zu den untersuchten Proben gegeben, wobei dieser nur von toten, nicht mehr über eine intakte Zellmembran verfügenden Zellen aufgenommen wird. Durch die zusätzliche Färbung mit Hämatoxylin und Eosin werden Tumorzellen von normalen Zellen unterschieden. Die Chemosensitivität wird anhand des Verhältnisses von lebenden wirkstoffbehandelten Zellen zur Anzahl an lebenden unbehandelten Zellen bestimmt¹⁴⁵.

Weitere mikroskopische Methoden bedienen sich der Anfärbung mit markiertem Calcein-AM, welches von lebenden Zellen zu einem fluoreszierenden Molekül umgesetzt wird. Abgestorbene Zellen können durch die parallele Färbung mit Ethidiumbromid unterschieden werden, da dieses aufgrund des Verlustes der Plasmamembran-Integrität nur in toten Zellen anreicht¹⁴⁶ (Abb. 1-9). Diese Lebend-tot-Färbungen sind als fertige Kits diverser Firmen im Handel erhältlich.

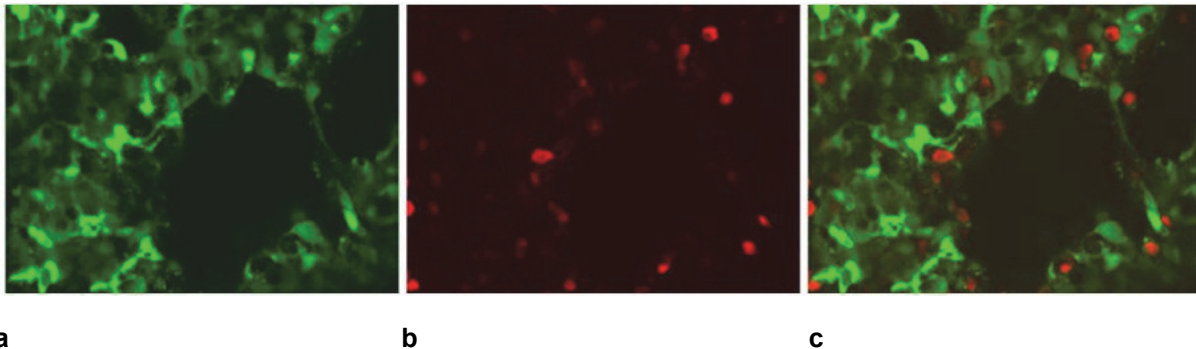


Abb. 1-9: Differential Staining Cytotoxicity-Assay (DiSC-Assay)

Bei dem DiSC-Assay wird der Zelltod als Reaktion auf Wirkstoffbehandlungen untersucht. Dargestellt sind konfokale Aufnahmen von Schnitten einer Ratten-Lunge nach einer Lebend-tot-Färbung. (a) Mit Calcein grün angefärbtes Zytoplasma lebender Zellen. (b) Mit Ethidiumbromid rot angefärbte Zellkerne toter Zellen. (c) Überlagerung der Färbungen. Abbildungen modifiziert nach Bourke et al.¹⁴⁶

Elektronenmikroskopische Verfahren

Im Bereich der bildanalytischen Verfahren können elektronenmikroskopische Verfahren Tumorzellen im Detail charakterisieren und prognostische Aussagen über den Verlauf der Erkrankung liefern. Es sind genauere Diagnosen von Biopsien möglich als durch lichtmikroskopische Untersuchungen (Abb. 1-10). Morphologische Eigenschaften, wie beispielsweise das Verhältnis der Größe des Zellkerns zum Zellvolumen, Volumen der Mitochondrien, Anzahl an Zellkernen, Granulierung von Zellen und Mitose-Raten ermöglichen die Bestimmung des Differenzierungsgrades und die Klassifizierung von Tumoren. Außerdem können intrazelluläre Wirkstoffanreicherungen analysiert und durch die Behandlung auftretende Veränderungen, wie der Funktionsverlust der Mitochondrien, bestimmt werden¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Probleme des Verfahrens sind, dass nur Effekte deutlich werden, die sich in der Zellstruktur manifestieren. Derzeit ist der Kostenaufwand zu hoch für den routinemäßigen Einsatz und die Auswertung zu zeitaufwändig. Im Allgemeinen sind mikroskopische Tests subjektiv in der Dateninterpretation. Diese Probleme sollen in Zukunft durch Automatisierung und Standardisierung der Bildauswertung behoben werden.

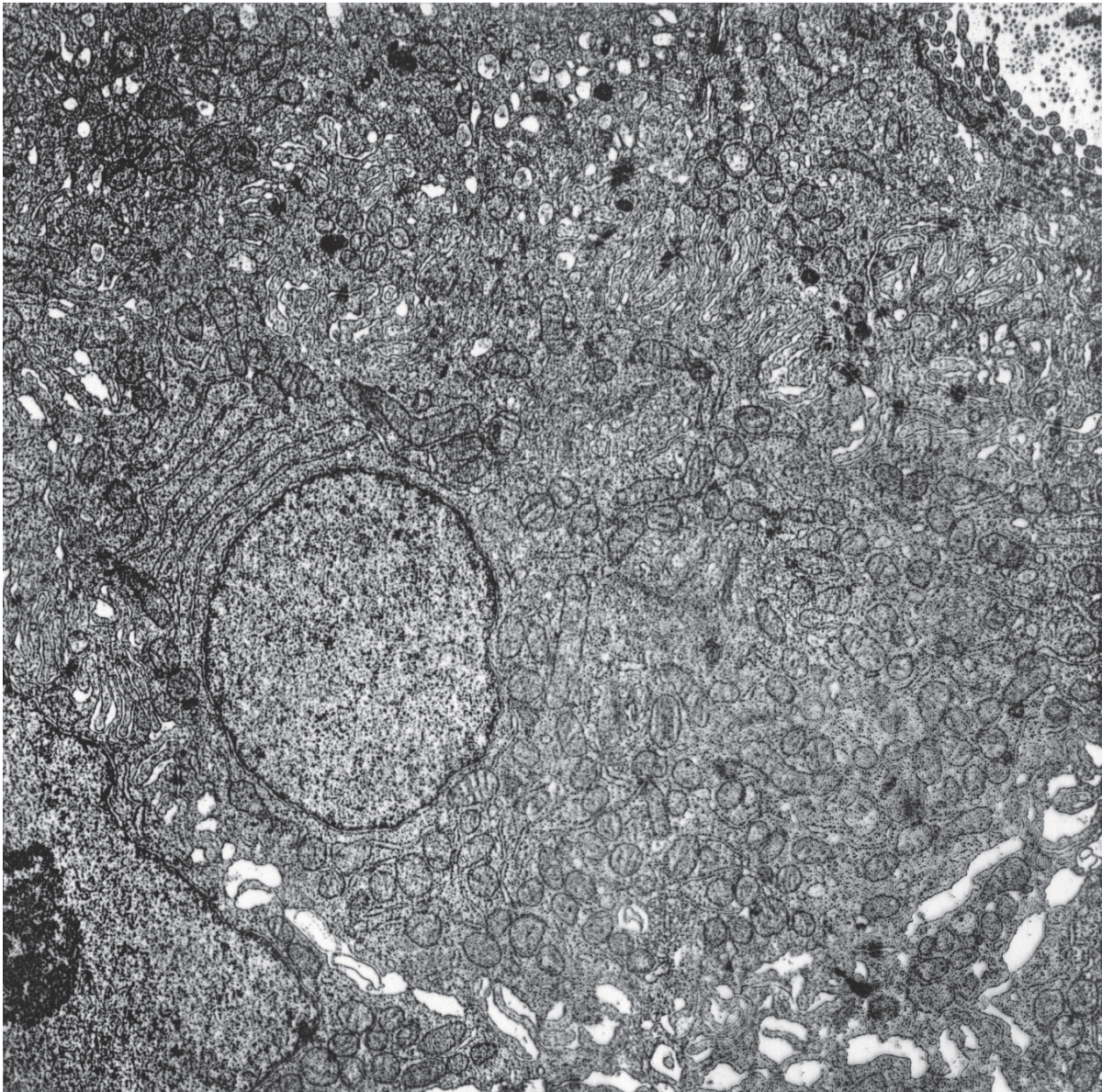


Abb. 1-10: Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Kolon-Epithelzelle

Die elektronenmikroskopische Aufnahme einer Kolon-Epithelzelle stellt intrazelluläre Strukturen im Detail dar. Deutlich sichtbar sind die einzelnen Zellorganellen wie Zellkern, endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien und Lysosomen. Vergrößerung 11.250x. Abbildung: Prof. B. Wolf¹⁰⁵.

Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

Neben den klassischen klinischen, in vivo angewendeten bildgebenden Verfahren wie Röntgen, Computertomographie und Sonographie, welche die Gewebemorphologie abbilden, soll im Zusammenhang mit Chemosensitivitätstests die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) als funktionsabbildendes Verfahren erwähnt werden. In Schnittbildtechnik erfolgt eine Ganzkörper-Darstellung der räumlichen Verteilung des Glukoseverbrauchs im Körper des Patienten. Da Tumoren, je nach Tumorart, vor allem aufgrund der hohen Proliferationsrate einen bis zu 20-fach erhöhten Glukosestoffwechsel aufweisen, heben sie sich deutlich vom umgebenden Gewebe ab und erlauben damit die Identifikation als Primärtumor bzw. Metastasen¹⁵⁰. Die dem Patienten intravenös injizierte, radioaktiv markierte ¹⁸F-Fluorodeoxyglucose (FDG) kann nach ihrer Aufnahme in die Zelle nicht weiter metabolisiert werden und reichert sich in der Zelle an. PET-Geräte detektieren die beim radioaktiven Zerfall eines ¹⁸F-Atoms entstehenden Photonen, wodurch Rückschlüsse auf den Entstehungsort des Zerfallsereignisses auf ca. 5 mm genau gezogen werden können. Auf diese Weise lässt sich die räumliche Verteilung des Glukose-Verbrauchs im Körper darstellen. Neuere Geräte sind mit einem Computertomographen kombiniert (PET-CT), die eine exakte Überlagerung von funktioneller und morphologischer Bildgebung erlauben (Abb. 1-11). Die PET-CT kann zwar keine direkten prädiktiven Aussagen über die tumorspezifische Chemosensitivität liefern, ist aber ein wertvolles Hilfsmittel bei der Verlaufskontrolle einer Tumor-Erkrankung, weil Änderungen der Größe des Primärtumors und der Anzahl und Größe evtl. Metastasen genau und zuverlässig dokumentiert werden können. Nachteilig sind die hohen Kosten (ca. 1000 € pro Untersuchung) und die logistischen Probleme. ¹⁸F kann nur in größeren Zyklotron-Anlagen hergestellt werden und zerfällt aufgrund der relativ kurzen Halbwertszeit von zwei Stunden in nicht unerheblichem Maße bereits auf dem Transport zum Patienten.

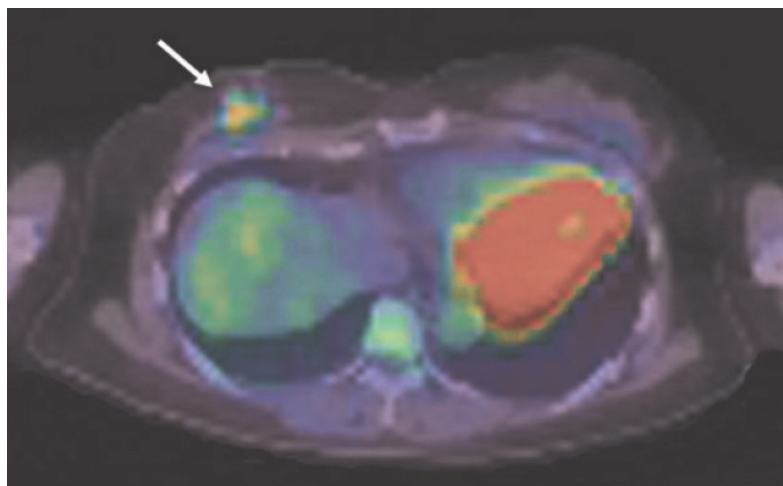


Abb. 1-11: PET-CT eines Brustkrebs-Rezidivs

PET-CT-Aufnahme im Transversalschnitt. Durch die Bestimmung radioaktiver Zerfallsereignisse von zuvor injizierter 18-Fluorodeoxyglucose (FDG) können metabolisch hoch aktive Tumorzellen lokalisiert werden. In der Abbildung ist ein Tumor-Rezidiv in der rechten Brust erkennbar (*Pfeil*). Abbildung aus Murakami et al.¹⁵¹

Magnetresonanztomographie (MRT)

Die Magnetresonanztomographie (MRT) spielt in der Erstdiagnostik und Verlaufsbeurteilung von Tumor-Erkrankungen als rein morphologische Bildgebung trotz der relativ hohen Kosten eine wichtige Rolle. Diese erlaubt, die Verteilung von ^1H oder ^{32}P im Gewebe darzustellen. Abhängig vom Molekül, in das das Atom eingebaut ist, ändert sich sein Resonanzverhalten (chemical Shift) im Magnetfeld, so dass die Konzentration bestimmter Metabolite und somit Gewebestrukturen dargestellt werden können (Abb. 1-12). Im Gegensatz zu anderen Verfahren wird keine belastende Röntgenstrahlung oder ionisierende Strahlung für die Untersuchung benutzt.

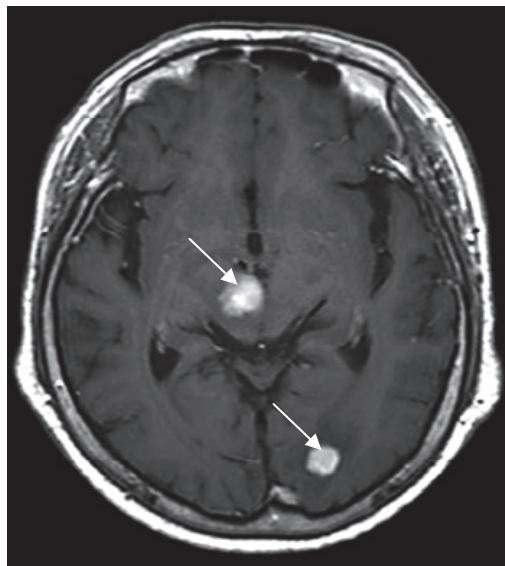


Abb. 1-12: Magnetresonanztomographie (MRT) von Gehirn-Tumoren

Axialschnitt eines Gehirns. In Abhängigkeit vom Resonanzverhalten von Molekülen in verschiedenen Geweben können unterschiedliche Strukturen bildlich dargestellt werden. Die MRT-Aufnahme zeigt zwei Tumorherde (Pfeile). Abbildung modifiziert nach Naoe et al.¹⁵²

1.7.3 Proliferationstests

Colony Forming-Assay

Colony Forming-Assays, die bereits in den 1970er Jahren entwickelt wurden, basieren auf der Änderung der Proliferationsaktivität von auf Agarose kultivierten Tumorzellkolonien unter dem Einfluss von Zytostatika. Ist die Zellproliferation durch die Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Proben gehemmt, wird die Probe als chemosensitiv gegenüber dem Wirkstoff angesehen. Ein Beispiel für einen Proliferationsassay ist der Human Tumor Clonogenic-Assay (HTCA-Assay). Isolierte Tumorzellen werden nach einer kurzen Wirkstoffbehandlung in Softagar kultiviert und die Chemosensitivität anhand der Anzahl der überlebenden Zellklone nach zwei bis drei Wochen abgeschätzt^{134,153}. Das Testprinzip der Colony Forming-Assays wurde zunächst mit großen Erwartungen verknüpft, aber die Studienergebnisse waren wenig befriedigend. Resistenzen können mit einer Genauigkeit von 85%, Sensitivität

jedoch nur mit 60% Genauigkeit vorausgesagt werden. Aufgrund des langen Testzeitraums und der aufwändigen technischen Durchführung liegt die Auswertbarkeit nur bei ca. 60%, wodurch er für den klinischen Einsatz wenig brauchbar ist¹⁵⁴.

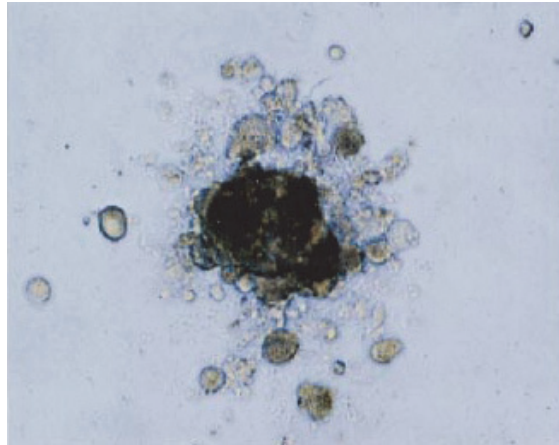


Abb. 1-13: Colony forming-Assay

Tumorzellkolonie nach einer Wachstumsdauer von 20 Tagen. Abbildung aus Spyridonidis et al.¹⁵⁵

Extreme Drug Resistance-Assay

Ebenfalls zu den auf der Messung von Zellproliferation basierenden Methoden zählt das Prinzip der Extreme Drug Resistance-Assays (EDR-Assay). Diese untersuchen die Zellproliferation von Zell-Aggregaten auf der Basis der DNA-Synthese. Die Zellen werden in einer dreidimensionalen Agarose-Matrix kultiviert, die die in vivo Wachstumsbedingungen widerspiegeln soll. Zellcluster zeigen ein besseres Wachstum als Einzelzellen, was die Erfolgsrate des Assays erhöht und die Zeit bis zum Erhalt der Ergebnisse verkürzt. Nach Behandlung der Proben mit sehr hohen Wirkstoffkonzentrationen, 10- bis 20-fach höher als standardmäßig in der Therapie eingesetzt, wird die Teilungsrate der Tumorzellen untersucht. Die Proliferationsrate wird durch die Zugabe von radioaktiv mit Tritium markierten Nucleotiden, z.B. 3H-Thymidin für die letzten zwei Testtage, und anschließender Szintillations-Messung quantifiziert^{134,156}. Der leicht durchzuführende Test liefert nach nur drei Tagen Ergebnisse. Die erfolgreiche Durchführung des Tests liegt bei ca. 85%. Basierend auf klinischen Studien wird eine hohe Validität dieses Testprinzips mit einer Vorhersagegenauigkeit für Resistenzen mit mehr als 97% angegeben. Die Genauigkeit für die Vorhersage der Chemosensitivität liegt jedoch lediglich bei 58%^{134,157}. Bei der Therapieplanung können somit zwar unwirksame Medikamente mithilfe dieser Assays ausgeschlossen werden, jedoch bleibt die Frage bestehen, welches Zytostatikum aus der Reihe der möglicherweise wirksamen Medikamente den größten Therapieerfolg verspricht.

Diese Chemosensitivitätstests werden kommerziell angeboten und sind für den klinischen Einsatz zugelassen. EDR-Assays werden von der Firma Therapy Select GmbH (Deutschland) als Chemo-Therapie-Resistenztest (CTR-Assay)¹⁵⁶ oder von der Firma EXIQON Diagnostics (USA) als Extreme-Drug-Resistance Assay (EDR-Assay)¹⁵⁸ vertrieben. Die Kosten liegen bei ca. 1800 €. Diese werden bisher nicht von den Krankenkassen übernommen, können aber im Einzelfall auf Antrag als Heilver-such erstattet werden.

Als allgemeiner Nachteil von Proliferationstests erweist sich, dass Tumorzellen, die sich in der G₀-Phase des Zellzyklus befinden oder sehr langsam teilen, nicht im Ergebnis berücksichtigt werden können¹¹⁶. Es besteht somit das Risiko von Fehlinterpretationen, da im Testzeitraum nicht teilungsaktive Proben fälschlicherweise als sensitiv gegenüber dem Wirkstoff angesehen werden könnten, obwohl eine Resistenz vorliegt. Dies erklärt die relativ niedrige Genauigkeit bei der Vorhersage der Chemosensitivität.

1.7.4 Metabolische Assays

Untersuchungen der metabolischen Aktivität und somit der Vitalität als Marker für Chemosensitivität oder Resistenz gehören zwar ebenfalls zu den Proliferationstests, bieten jedoch diesen gegenüber den Vorteil, dass sowohl proliferierende als auch in der G₀-Phase ruhende Zellen auf Veränderungen ihrer Vitalität als Reaktion auf Wirkstoffbehandlung hin untersucht werden.

Fluorescent Cytoprint-Assay

Der Fluorescent Cytoprint-Assay (FCPA-Assay) detektiert die Enzymaktivität von membrangebundenen Esterasen, deren Aktivität proportional zur Zellvitalität ist. Analysiert wird die Hydrolyse von Fluorescein-Monoacetat zu Fluorescein. Vor der Zugabe eines Wirkstoffes werden die Proben für 24 Stunden vorkultiviert. Nach Beendigung der 48-stündigen Wirkstoffzugabe werden die Zellen für weitere 48 Stunden kultiviert. Durch digitale Fotografie und Auswertung durch einen Computer können die Unterschiede in der Fluoreszenz-Intensität für die Zeitpunkte vor und nach der Wirkstoffbehandlung für jede Probe verglichen werden. Der angegebene negative prädiktive Wert liegt bei 97%, der positive bei 85%^{134,154}. Nachteile dieses Testprinzips sind, dass nicht zwischen Tumor- und Nicht-Tumorzellen unterschieden werden kann und die Auswertung sehr subjektiv ist.

MTT- und Resazurin-Test

Der MTT-Test misst photometrisch die Umsetzung des namensgebenden gelben, wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT) zu einem blau-lila, wasserunlöslichen Formazanprodukt. Es wird davon ausgegangen, dass die Farbumsetzung durch die mitochondriellen Dehydrogenasen erfolgt und die Menge des entstehenden Formazans somit proportional zur Vitalität und Anzahl der Zellen ist, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere, unbekannte Vorgänge in der Zelle an der Farbstoffumsetzung beteiligt sind. Weitere Assays, die auf der Umsetzung von Tetrazoliumsalzen basieren, sind bspw. der XTT- und WST-Test^{159,160}.

Der in dieser Arbeit angewandte Resazurin- (7-hydroxy-10-oxido-phenoxazin-10-ium-3-one) Test funktioniert nach dem gleichen Prinzip. Resazurin wird von lebende Zellen vermutlich durch die Aktivität mitochondrialer Enzyme in seine reduzierte Form (Resorufin und Dihydroresorufin) umgewandelt, da es Elektronen von NADPH, FADH, FMNH, NADH und von Cytochromen aufnimmt. Daraus resultiert die Farbänderung von der blauen oxidierten Form des Farbstoffs in eine fluoreszierende rote Form, die durch Fluoreszenzmessungen quantifiziert wird. Die zellulären Schritte der Reduktion von Resazurin sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt^{104,161,162}. Somit kann auf der Basis der Umset-

zungsaktivität nicht proportional auf die mitochondriale Aktivität geschlossen werden. Weiterhin problematisch ist bei diesen Methoden die Zugabe von organischen oder reduzierenden Agentien zum Kulturmedium. Möglicherweise sind diese innerhalb eines nicht bestimmbareren Zeitraums toxisch für Zellen. Zur Vermeidung von Zellveränderungen, die durch die Messmethode selbst ausgelöst werden, sind Assays erforderlich, die markerfrei durchgeführt werden können.

Die nach dem Prinzip des MTT- und Resazurin-Tests funktionierenden Assays sind im Gegensatz zu HTCA-Assays¹⁶³ schnell und einfach in der Durchführung, besitzen eine hohe Reproduzierbarkeit und erfordern nur einen geringen Kostenaufwand im Vergleich bspw. zum ATP-Test¹³⁴ (s. folgender Abschnitt), der eine ähnliche Funktionsweise besitzt.

ATP-Test

Der ATP-Tumor-Chemosensitivitäts-Assay (ATP-TCA-Assay) bestimmt die metabolische Aktivität von Tumorproben und liefert damit Aussagen über die Vitalität oder den Tod von Proben nach einer Wirkstoffbehandlung. Auch bei diesem Test werden sowohl proliferierende als auch nicht proliferierende Zellen erfasst. Der intrazelluläre ATP-Gehalt wird über Biolumineszenz quantifiziert, die durch die Umsetzung von Luciferase zu Luciferinen steht und proportional zur vorliegenden ATP-Menge ist. Durch eine einfache photometrische Messung lässt sich somit feststellen, ob und in welchem Ausmaß die Tumorzellen durch die zugegebenen Zytostatika in ihrer Vitalität beeinträchtigt oder abgestorben sind. Es können Proben aus OP-Material, Feinnadelbiopsien sowie aus einem Pleuraerguss untersucht werden, da nur eine relativ geringe Zellzahl erforderlich ist. Der Test ist sowohl einfach in der Durchführbarkeit, als auch in der objektiven Auswertung standardisierbar. Das Testergebnis liegt nach ca. einer Woche vor^{134,164}.

Aufgrund seiner Vorzüge ist der ATP-TCA-Test als Routinetest geeignet und als eines der wenigen Verfahren in der klinischen Praxis für die Chemosensitivitätsbestimmung von individuellen Tumorgewebeproben anerkannt. Insbesondere beim Mamma- und Ovarialkarzinom zeigt er gute Ergebnisse. Eine retrospektive Studie beschreibt einen positiven prädiktiven Wert von 80% und einen negativen prädiktiven Wert von 100%¹⁶⁵. Der Chemosensitivitätstest ist kommerziell als Dienstleistungsangebot verfügbar. ATP-TCA-Tests werden in Deutschland beispielsweise unter den Namen Proliferations-Assay¹⁶⁶, CellSearch-Test¹⁶⁷ oder SartoriTest¹⁶⁸ angeboten. Die Kosten belaufen sich pro Untersuchung in Deutschland auf ca. 1500 € bis 2200 € und müssen von den Patienten in der Regel selber getragen werden.

1.7.5 Gen- und Proteinexpressionsanalysen

Derzeit stehen im Fokus des Interesses vielversprechende genetische Methoden wie bspw. der Oncotype DX-Assay (GenomicHealth, USA)¹⁶⁹, der Mammaprint-Assay (Agendia, Niederlande)^{10,170} oder FEMTELLE-Assay (American Diagnostica GmbH, USA)¹⁷¹ in Bezug auf das Mammakarzinom. Diesen wird ein hohes Potenzial zugeschrieben, auf der Basis bestimmter Markerproteine prädiktive Aussagen über den Erfolg einer Antikörper- oder Hormontherapie zu treffen und Prognosen über das individuelle Rezidiv-Risiko zu geben^{10,13,14,16,40,49,51,52,89}.

Ein Rezidiv-Risiko einer Brustkrebserkrankung lässt sich anhand der Expressionsstärke der proteolytischen Enzyme uPA und PAI-1 abschätzen^{12,47,89,171}. Diese sind verantwortlich für die Metastasierungsfähigkeit und Invasivität eines Tumors. Prognosen auf der Basis dieser Marker besitzen eine hohe Vorhersagegenauigkeit und wurden bereits in die „Deutschen Leitlinien zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms“ aufgenommen².

Das individuelle Rezidiv-Risiko spielt besonders eine Rolle für Patientinnen im frühen Stadium der Erkrankung mit einem mittleren Differenzierungsgrad und ohne Lymphknotenbefall sowie ohne Fernmetastasen. Dies ist bei etwa 50% der Erstdiagnosen der Fall. Die meisten dieser Patientinnen (ca. 80%) ohne befallene Lymphknoten können mit einem lokalen chirurgischen Eingriff geheilt werden und benötigen keine systemische Chemotherapie. Bei ca. 20% der Patientinnen ohne Lymphknotenbefall tritt jedoch ein Rezidiv auf^{12,14,50,89}. Diese Patientinnen würden von einer Chemotherapie profitieren und sollen zukünftig routinemäßig mit Hilfe genetischer Analysen identifiziert werden.

Eine verstärkte metabolische und proliferative Aktivität von Tumorzellen wird sowohl durch eine übermäßige Expression von Wachstums- und Hormonrezeptoren (wie HER2, Östrogen, Progesteron) auf der Zelloberfläche induziert^{19,49}, als auch durch die Fehlregulation intrazellulärer Signalwege, die die Wachstumssignalweiterleitung und -Verstärkung in den Zellkern vermitteln. Schlüsselrollen spielen hierbei Tyrosinkinase und Oncogene (z.B. Abl, Src, Ras, Ki67, Rb, Myc, Akt, Bcl2; s. Abb. 1-5) deren Überexpression oder konstitutive Aktivierung die Proliferations-induzierenden Signale verstärken oder konstitutiv aufrecht erhalten^{13,16,38,41,53,54}. Durch die Identifizierung der individuell überexprimierten Faktoren wird nicht nur für das Mammakarzinom eine personalisierte, zielgerichtete Behandlung zur Hemmung der Proliferationsaktivität von Tumorzellen möglich¹⁶⁻¹⁹.

Langfristig sollen mithilfe von Hochdurchsatz-Screenings noch detailliertere Genexpressions-Muster bestimmbar sein, die eine präzisere Differenzierung von Tumorklassen und damit noch gezieltere und nebenwirkungsärmere Behandlungsstrategien erlauben^{10,14}.

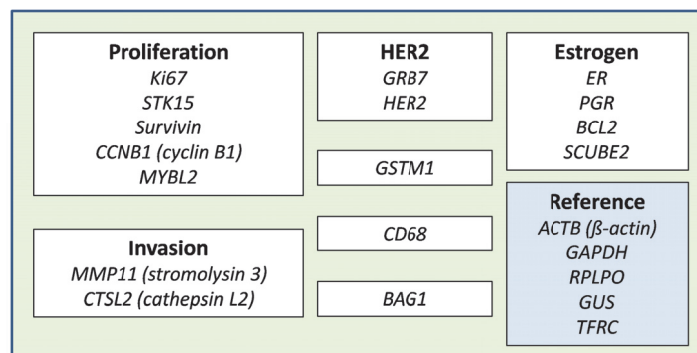


Abb. 1-14: Oncotype DX

Oncotype DX-Test der Firma GenomicHealth¹⁶⁹. Die quantitative Expression von 21 festgelegten Markergenen für ein erhöhtes Rezidivrisiko sowie Referenzgenen wird durch real-time RT-PCR bestimmt. Abbildung aus Paik et al.^{52,169}

PCR-Methoden

Der kommerziell angebotene Oncotype DX-Test⁵² der Firma GenomicHealth (USA)¹⁶⁹ ist ein standardisiertes Verfahren, das anhand einer real-time RT-PCR quantitativ die Expression von 21 Markergenen des Mammakarzinoms untersucht. Hierzu zählen Faktoren der Zellproliferation (u.a. Ki67), der Invasion (u.a. MMP11) sowie Wachstums- und Hormonrezeptoren (HER2, ER, PR). Verglichen werden die Ergebnisse mit Referenzgenen wie β -Aktin und GAPDH. Aus der Expressionsstärke wird der sog. Recurrence Score gebildet, der die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Rezidivs innerhalb von 10 Jahren angibt. Die Expressionsstärke der Zelloberflächenrezeptoren HER2 und des Östrogenrezeptors geben prädiktive Hinweise auf den Erfolg einer Antikörper- oder Anti-Hormontherapie (Abb. 1-14). Der Oncotype DX-Test wurde intensiv in dreizehn klinischen Studien evaluiert, in denen mehr als 4.000 Brustkrebspatientinnen weltweit eingeschlossen wurden⁵². Bis heute wurde der *Oncotype DX*-Test in mehr als 175.000 Fällen in über 55 Ländern eingesetzt. Der Test ist von internationalen Leitlinien der internationalen St. Gallen Konsensuskonferenz sowie der European Society for Medical Oncology (ESMO) anerkannt. In die Leitlinien² der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. aus dem Jahr 2012, wurde der Test jedoch nicht aufgenommen.

DNA-Microarrays

Microarrays liefern wie die PCR-Methode sehr genaue quantitative und qualitative Aussagen über die Gen- oder Proteineexpression von Tumorzellen. Aus den zu untersuchenden Zellen extrahierte mRNA wird in cDNA transkribiert und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Auf dem Microarray ist die einsträngige DNA aller zellulären Gene an definierten Positionen aufgebracht. Die Bindung der cDNA an ihre komplementären DNA Stücke, die durch Fluoreszenzaktivität nachgewiesen werden kann, lässt Rückschlüsse auf die von der Zelle exprimierte Gene zu. Dieser Chemosensitivitätstest wird bspw. unter dem Handelsnamen MammaPrint von der Firma Agendia (Niederlande)¹⁷⁰ angeboten. Anhand der RNA-Expression wird auf die Stärke der Expression von 70 spezifischen Genen einer Tumorseite geschlossen und mit der Expressionsstärke von gesunden Zellen verglichen. Hieraus ergibt sich die Prognose über das Risiko eines Rezidivs und Metastasenbildung für den Patienten. Ein „geringes Risiko“ ist definiert durch eine nur 10-prozentige Wahrscheinlichkeit, dass der Krebs ohne Zusatzbehandlung wie zum Beispiel Hormontherapie oder Chemotherapie innerhalb von 5 Jahren erneut auftritt (Abb. 1-15)^{10,51}. Auf der Basis dieser Testergebnisse wird eine Entscheidung über die Behandlungsstrategie getroffen. In vielen Fällen kann auf eine Chemotherapie verzichtet und bspw. nur eine Hormontherapie durchgeführt werden. Das Ergebnis liegt in einem Zeitraum von 7 bis 10 Tagen vor. Insgesamt ergibt sich eine prognostische Genauigkeit von 70 – 90%. Die Kosten dieses wenig aufwändigen Tests belaufen sich auf ca. 2500 €. Der MammaPrint Test wurde 2009 in die „Internationalen onkologischen Richtlinien zur Primärtherapie von Brustkrebs“ des St. Gallen Expertenpanels aufgenommen sowie durch die Arzneimittelzulassungsbehörde der Vereinigten Staaten (FDA) zugelassen. Jedoch ist auch dieser Test nicht in die Leitlinien der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. aus dem Jahr 2012 aufgenommen worden.

Nachteilig beim MammaPrint-Assay oder Oncotype DX-Test ist, dass sie nur in frühen Stadien der Erkrankung bei Patienten ohne Lymphknotenbefall sinnvoll sind. Sie geben zwar Prognosen über ein mögliches Rezidiv, können aber keine prädiktiven Aussagen über den Behandlungserfolg mit einem bestimmten Chemotherapeutikum treffen.

Enzyme-Linked Immunosorbent-Assay (ELISA-Assay)

Als zuverlässige Prognosefaktoren für ein Rezidiv-Risiko gelten die Proteine uPA und PAI-1. Deren Expressionsstärke korreliert mit der Metastasierungswahrscheinlichkeit eines Tumors⁴⁷. Aufgrund ihrer nachweislich hohen Vorhersagekraft wurden sie als prognostische Marker in die „Deutschen Leitlinien zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms“ der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. vom Juli 2012 aufgenommen².

Der FEMTELLE uPA/PAI-1-Test der Firma American Diagnostica GmbH (USA)¹⁷¹ ermöglicht die Analyse dieser Markerproteine. Als Beispiel eines ELISA-Assays bietet er eine sehr empfindliche Methode zur quantitativen Bestimmung der von einer Zelle exprimierten Proteine. Antikörper, die gegen die nachzuweisenden Proteine gerichtet sind, werden auf einem Array aufgebracht und mit isolierten Proteinen von Tumorzellen hybridisiert. Gleichzeitig wird ein synthetisch hergestelltes und fluoreszenzmarkiertes Protein zugegeben, das mit dem zu testenden Protein identisch ist. Dieses konkurriert mit dem nachzuweisenden Protein um die Antikörper-Bindungsstellen. Die im Anschluss gemessene Fluoreszenzstärke ist somit umgekehrt proportional zur Menge des zu untersuchenden Proteins. Der FEMTELLE uPA/PAI-1-Test wird in Deutschland in ca. 25 Einsendelabors durchgeführt. Bisher werden die Kosten des Tests in Höhe von ca. 500 Euro nicht von allen Krankenkassen erstattet.

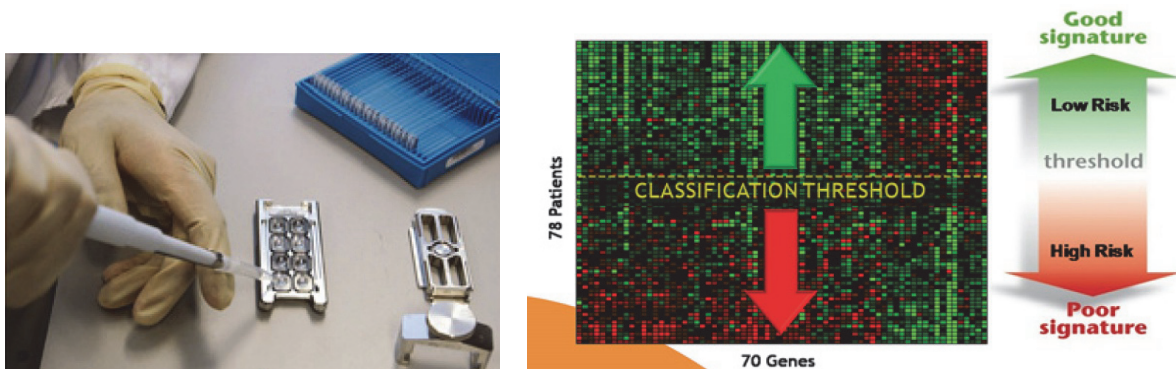


Abb. 1-15: MammaPrint

MammaPrint-Assay der Firma Agendia¹⁷⁰. Anhand der RNA-Expression wird auf die Stärke der Expression von 70 spezifischen Genen einer Tumorprobe geschlossen und mit der Expressionsstärke von gesunden Zellen verglichen. Hieraus ergibt sich die Prognose über das Risiko eines Rezidivs und das Risiko von Metastasenbildung für den Patienten. Abbildung aus Cavallaro et al.¹⁰

1.7.6 Tumorsphäroide

Dreidimensionale Tumorsphäroide, auch bezeichnet als Tumorhistoide, werden aus Einzelzellsuspensionen eines Explantats hergestellt. Durch ihre dreidimensionale Struktur sind die im Gegensatz zu Monolayerkulturen der in vivo Situation eines Tumors deutlich ähnlicher. Tumorsphäroide besitzen ihre physiologischen Zell-Zell-Kontakte, bilden eine extrazelluläre Matrix und besitzen die tumortypischen Nährstoff-, Wirkstoff-, pH- und Sauerstoffgradienten zwischen den inneren und äußeren Zellschichten^{172,173}. Sphäroide werden aus Tumor-Explantaten gewonnen, indem das Gewebe zunächst enzymatisch und mechanisch in eine Einzelzellsuspension disaggregiert wird. In speziell beschichteten Kulturplatten, die keine Adhäsion von Zellen erlauben, bilden sich Sphäroide durch langsame Rotation oder Zentrifugation nach einigen Stunden spontan (Abb. 1-16). Sphäroide werden über einen Zeitraum von mehreren Tagen vorinkubiert, bevor der Chemosensitivitätstest durchgeführt wird^{173,174}. Im Anschluss an die Behandlung werden die Wirkungseffekte mit verschiedenen Standard-Endpunktmethoden bestimmt. Chemosensitivitätstests basierend auf der Sphäroid-Technik werden kommerziell bspw. von der Firma Spherotec GmbH (Deutschland)¹⁷⁵ als SpheroTest angeboten. Der SpheroTest wird derzeit in klinischen Studien validiert.

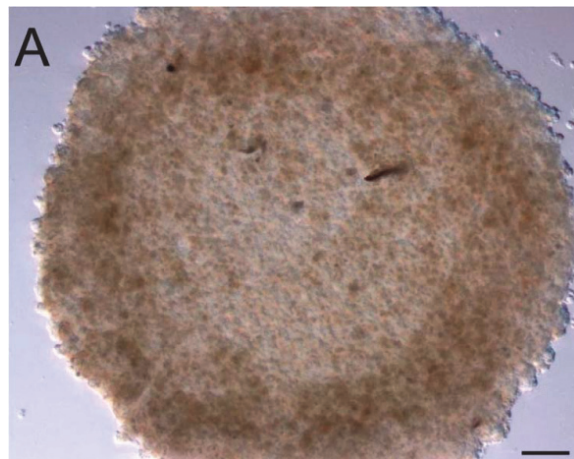


Abb. 1-16: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Tumorzell-Sphäroids

Sphäroid gebildet aus MCF-7 Zellen (Vergrößerung 40x, Scale bar: 100 μm). Durch seine dreidimensionale Struktur ist es der in vivo Situation eines Tumors sehr ähnlich. Tumorsphäroide besitzen Zell-Zell-Kontakte, bilden eine extrazelluläre Matrix und besitzen die tumortypischen Nährstoff-, Wirkstoff-, pH- und Sauerstoffgradienten zwischen den inneren und äußeren Zellschichten^{172,173}. Abbildung aus Ho et al.¹⁷⁴

1.8 Sensorbasierte Testsysteme

Ein weiteres, zunehmend eingesetztes und vielversprechendes Messprinzip für die Charakterisierung von Zelleigenschaften ist die sensorbasierte Analyse extrazellulärer Parameter, die sich durch die metabolische Aktivität oder Änderungen der Zell-Morphologie verändern. Auf diese Weise werden nicht nur einzelne intrazelluläre Metabolismus-Marker bestimmt, sondern phänotypische Reaktionen, die aus den komplexen intrazellulär ablaufenden Mechanismen resultieren. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Methoden sind sensorbasierte Systeme nicht auf Endpunktmessungen beschränkt. Die Datenerfassung erfolgt dynamisch über den gesamten Testzeitraum, was eine zeitaufgelöste Analyse der Messdaten und aufgrund der größeren aufgezeichneten Datenmenge detailliertere Aussagen ermöglicht^{27,176-179}. Sensorbasierte metabolische und morphologische Messungen sind bisher noch nicht für den klinischen Einsatz zugelassen.

Die Morphologie von Zellen kann anhand des Anheftungsverhaltens am Substrat durch Messung der Zellimpedanz untersucht werden. Die auf und zwischen der in den Plattenboden integrierten Interdigitale Elektroden-Struktur (IDES) angewachsenen Zellen bestimmen den Wechselstromwiderstand. Die Impedanz wird durch charakteristische Eigenschaften der Zellen verändert, was Interpretationen über Zelldichte und Anheftungsverhalten, Zell-Zell-Kontakte, Proteinexpression an der Zelloberfläche, Morphologie sowie Membranfunktionen erlaubt¹⁸⁰. Durch Modifikationen im Versuchsaufbau ist es zudem möglich, zusätzliche Informationen über das Migrationsverhalten und somit Invasivität von Tumorzellen zu erhalten. Ein großer Nachteil der Impedanz-Messung ist jedoch, dass sich durch verschiedene Stimuli ausgelöste zelluläre Reaktionen häufig nicht, oder erst nach einem längeren Zeitraum in der Morphologie oder dem Anheftverhalten von Zellen manifestieren.

Gewöhnlich werden Wirkstoff-Effekte zunächst im Zellmetabolismus deutlich. Als Marker für die Aktivität des Zellmetabolismus werden Veränderungen des pH-Werts des Kulturmediums und des Sauerstoffpartialdrucks (pO_2), bei einigen Systemen auch des Kohlenstoffdioxids (CO_2) verwendet. Wie in Abschnitt 1.5 beschrieben, korreliert die Ansäuerung des Kulturmediums, hervorgerufen durch die Abgabe von Laktat und H^+ durch Zellen, mit der Stärke von deren glykolytischer Aktivität. Der Sauerstoffverbrauch aus dem Kulturmedium gibt Aufschluss über die mitochondriale Aktivität¹⁰⁷. Für die Messung werden pH- oder O_2 -sensitive, elektrochemische oder optochemische Sensoren verwendet.

1.8.1 Sensorbasierte Messung einzelner Parameter

Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)

Die Firma Applied BioPhysics (USA)¹⁸¹ bietet ein System an, das Veränderungen von Zell-Monolayern durch Messung der Zellimpedanz untersucht. Das ElectricCell-Substrate ImpedanceSensing- (ECIS)-System ist in 8-Well, 16-Well oder 96-Well Ausführungen erhältlich. Es werden keine IDES-Strukturen, sondern acht unabhängige, mit Gegenelektroden umgebene Punktelektroden eingesetzt. Ein Fluidiksystem ermöglicht einen Austausch des Kulturmediums in den Wells und somit Messungen auch über einen längeren Zeitraum (Abb. 1-17). Verschiedene Anwendungsmöglichkeiten des Sys-

tems, u.a. Untersuchungen zur Wundheilung und Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen, wurden bereits publiziert^{182,183}.

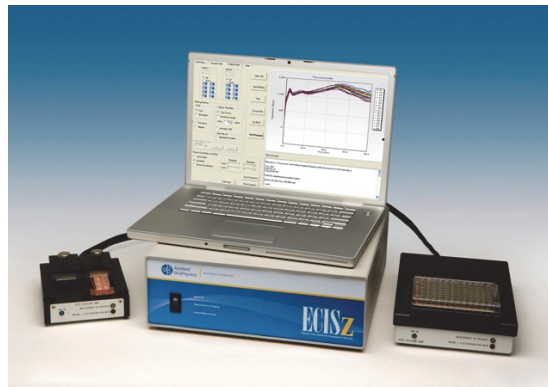


Abb. 1-17: Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)

ECIS-System der Firma Applied BioPhysics. Anhand der Messung von Zellimpedanz werden Aussagen u.a. über Zelladhäsion, Migration oder Proliferation getroffen. Abbildung: Applied Biophysics¹⁸¹

CellKey-System

Das CellKey-System, dessen Funktionsweise ebenfalls auf der Analyse der Zellimpedanz basiert, ist vor allem konzipiert für die funktionale Analyse von veränderter Protein-Expression nach Wirkstoffzugabe (Abb. 1-18). Die Herstellerfirma Molecular Devices (USA)¹⁸⁴ gibt an, dass eine große Anzahl von Messungen an verschiedenen Zielproteinen, wie die Liganden-vermittelte Aktivierung von G-Proteingekoppelten Rezeptoren, Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, Adhäsionsmolekülen und die indirekte Messung der Ionenkanal-Aktivierung möglich sind. Das im 96 und 384 Well-Format erhältliche System ermöglicht Hochdurchsatz-Messungen. Ein Pipettierroboter erlaubt die gleichzeitigen Zugaben von Wirkstoffen in alle Wells, wodurch Veränderungen in den verschiedenen Wells parallel untersucht und verglichen werden können.



Abb. 1-18: CellKey-System

CellKey-System der Firma Molecular Devices¹⁸⁴. Anhand der Messung von Zellimpedanz werden funktionale Analysen von veränderter Protein-Expression nach Wirkstoffzugabe durchgeführt. Ein Pipettierroboter versorgt die Proben mit Medium und Wirkstoffen. Dargestellt ist das vollautomatisierte System für Hochdurchsatz-Messungen (96 und 384 Well-Formate). Abbildung: Molecular Devices¹⁸⁴

xCELLigence

Das von der Firma ACEA Biosciences¹⁸⁵ entwickelte und mittlerweile durch Roche Applied Science (Schweiz) vermarktete xCELLigence-System¹⁸⁶ ermöglicht auf der Basis von Messungen der Zellimpedanz Aussagen über verschiedene Zellparameter. Die relativen Änderungen der Impedanz werden von dem Gerät direkt in die dimensionslose Einheit „Cell Index“ (CI) umgerechnet und ausgegeben. Die Verwendung von 96 Well Platten erlaubt Messungen im High-Throughput-Verfahren. Laut Herstellerangaben sind die hohe Sensitivität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse weitere Vorteile des Systems (Abb. 1-19). Der Medien austausch erfolgt in der Regel manuell, wodurch Versuche über einen längeren Zeitraum zwar möglich, aber nur mit großem Aufwand umsetzbar sind. In der Literatur wird der Einsatz des Systems unter anderem zur Bestimmung der Zelladhäsion¹⁸⁷, der Zellmigration¹⁸⁸, der Proliferation¹⁸⁹ und Zytotoxizitätstests¹⁹⁰ beschrieben.



Abb. 1-19: xCELLigence

xCELLigence-System der Firma Roche Applied Science¹⁸⁶. Anhand der Messung von Zellimpedanz werden Aussagen u.a. über Zelladhäsion, Migration oder Proliferation getroffen. Dargestellt ist das System für 96-Well-Platten. Abbildung: Roche Applied Science¹⁸⁶

Cytosensor Microphysiometer

Das ChemoSelect-System²⁷ war von 1990 bis 2000 im Handel erhältlich (Abb. 1-20). Es basiert auf dem Prinzip des Cytosensor Microphysiometers, das von der US-amerikanischen Firma Molecular Devices¹⁸⁴ als Pionier der „Cell-on-a-chip“-Systeme schon in den späten 1980er Jahren entwickelt wurde. Vertrieben wurde das ChemoSelect-System von der Firma CellControl (Deutschland). Beide Systeme sind jedoch nicht mehr im Handel erhältlich. Anhand Veränderungen der H⁺-Ionenkonzentration im Kulturmedium wird die Ansäuerungsaktivität von Zellen bestimmt und als Maß für deren Vitalität verwendet¹⁰⁷. Das Messprinzip basiert auf Silizium-Sensorchips. Eine Peristaltik-Pumpe ermöglicht einen kontinuierlichen Medien austausch, welcher zur Messung des pH-Werts für einige Sekunden unterbrochen wird. Das Gerät erlaubt die parallele Messung von vier oder acht Proben¹⁹¹. Als großes Problem erweist sich die Störanfälligkeit des Fluidik-Systems gegen Luftblasen.



Abb. 1-20: Cytosensor Microphysiometer

Cytosensor Microphysiometer entwickelt von der Firma Molecular Devices¹⁸⁴. Die Messung des extrazellulären pH-Werts ermöglicht Rückschlüsse auf die Vitalität von Zellen. Es können vier bzw. acht Proben parallel gemessen werden. Das Gerät besitzt ein Fluidiksystem zum Medien austausch. Abbildung: Molecular Devices¹⁹²

1.8.2 Multiparametrische Assays

In den letzten Jahren wurde immer mehr dazu übergegangen, multiparametrische zellbasierte Messsysteme zu entwickeln. Die Verwendung unterschiedlicher Parameter für die Bestimmung der zellulären Reaktionen bietet die Möglichkeit, unterschiedliche Aspekte von Wirkstoffeffekten auf dieselbe Probe miteinander zu vergleichen. Im Vordergrund stehen hierbei die Analyse des Zellmetabolismus, der Morphologie und des Anheftverhaltens. Durch den Einsatz verschiedener Marker können die Ergebnisse verschiedener Parameter innerhalb derselben Messung untereinander validiert werden. Bspw. ist es möglich, mit Hilfe der parallel durchgeführten metabolischen Messungen und der Mikroskopie gemessene Veränderungen der Zell-Impedanz besser zu interpretieren^{25,105}.

Es sind verschiedene multiparametrische Testsysteme auf dem Markt erhältlich, die jedoch derzeit ausschließlich für Forschungszwecke verwendet werden. Die wichtigsten Systeme werden im Folgenden kurz vorgestellt.

XFAnalyzer

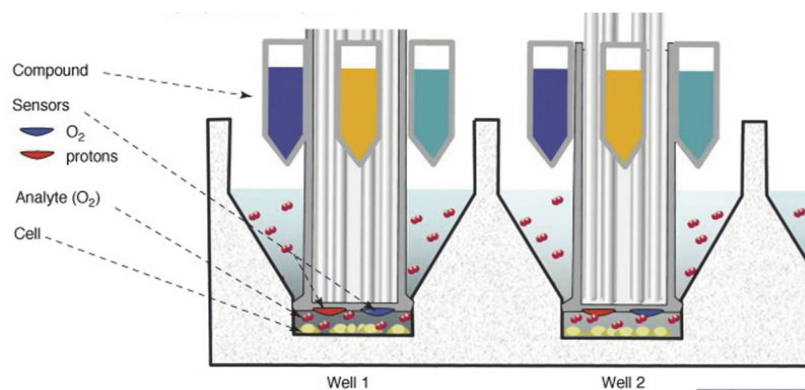
Die Firma Seahorse Bioscience (USA)¹⁹³ bietet mit dem XFAnalyzer ein System zur simultanen und markerfreien Analyse von Sauerstoffverbrauch und Ansäuerungsaktivität adhärenter Zellen an. Die Messungen werden anhand optischer Sensoren durchgeführt. Zusätzlich kann Kohlendioxid (CO₂), als Produkt der oxidativen Decarboxylierung und des Citratzyklus, im Kulturmedium bestimmt werden. Während der Messung werden in die 24 Wells der Sensorplatte Stempel eingedrückt, um ein definier-

tes Mikrovolumen ($<7,5 \mu\text{l}$) zu erzeugen (Abb. 1-21). Diese Stempel dienen zugleich als Vorratsbehälter für maximal vier Wirkstoffe, die während der Messung zugegeben werden können.

Durch Anheben des Stempels wird das Kulturmedium des Mikrovolumens der Kulturkammer mit dem Restvolumen ($300 \mu\text{l}$) vermischt, um auf diese Weise den ursprünglichen pH- und Sauerstoffwert des Kulturmediums annähernd wieder herzustellen¹⁷⁹. Auf diese Weise können zwar Messungen über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden, jedoch verändert sich das Medium im Verlauf der Messung, da es nicht komplett ausgetauscht werden kann. Dies beeinflusst möglicherweise die metabolische Aktivität von Zellen und erschwert die Dateninterpretation. Der XFA Analyzer ist in verschiedenen Ausführungen mit 24 oder 96 Well-Platten erhältlich.



a



b

Abb. 1-21: XFA Analyzer

XFA Analyzer-Systeme der Firma Seahorse Bioscience¹⁹³. (a) Systeme für die Analyse von 24 oder 96 Proben. (b) Schematischer Längsschnitt zweier Wells mit eingedrücktem Stempel zur Erzeugung eines definierten Medienvolumens. Am Stempel angebracht sind vier Wirkstoffvorratsbehälter. Die Messung des Sauerstoff- und Kohlendioxid-Gehalts und des pH-Werts des Kulturmediums erfolgt durch optische Sensoren. Abbildungen: Seahorse Bioscience^{193,194}

Bionas 2500 Discovery-System

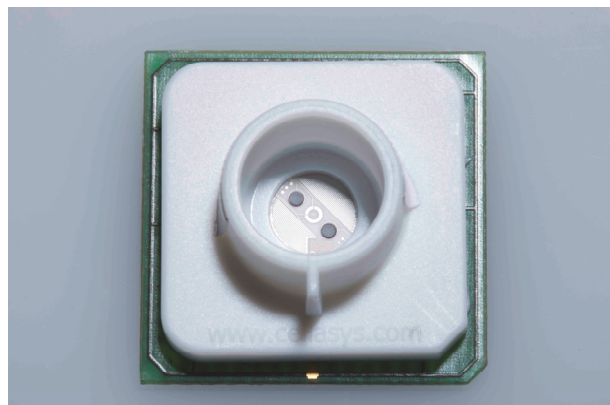
Die aus der Arbeitsgruppe von Prof. Wolf während seiner Tätigkeit in Rostock ausgegründete Firma Bionas GmbH (Deutschland)¹⁹⁵ arbeitet seit 2001 an einem Testsystem zur Messung des zellulären Metabolismus und der Morphologie. Das Bionas 2500 Discovery-System bietet die Möglichkeit, auf der Basis von Siliziumchips die Parameter pO_2 und pH im extrazellulären Kulturmedium sowie die Zellimpedanz parallel zu bestimmen. Sechs Proben können gleichzeitig gemessen werden. Ein integriertes Pump-Fluidiksystem ermöglicht den regelmäßigen Austausch des Kulturmediums. Während der pumpfreien Intervalle werden die Vitalparameter und Morphologie der Zellen aufgezeichnet und die Raten der metabolischen Aktivität berechnet. Es wurden bereits mit dem System durchgeführte Studien publiziert, u.a. Messungen an humanen Tumorgewebeproben²⁴.

Intelligent Mobile Lab (IMOLA)

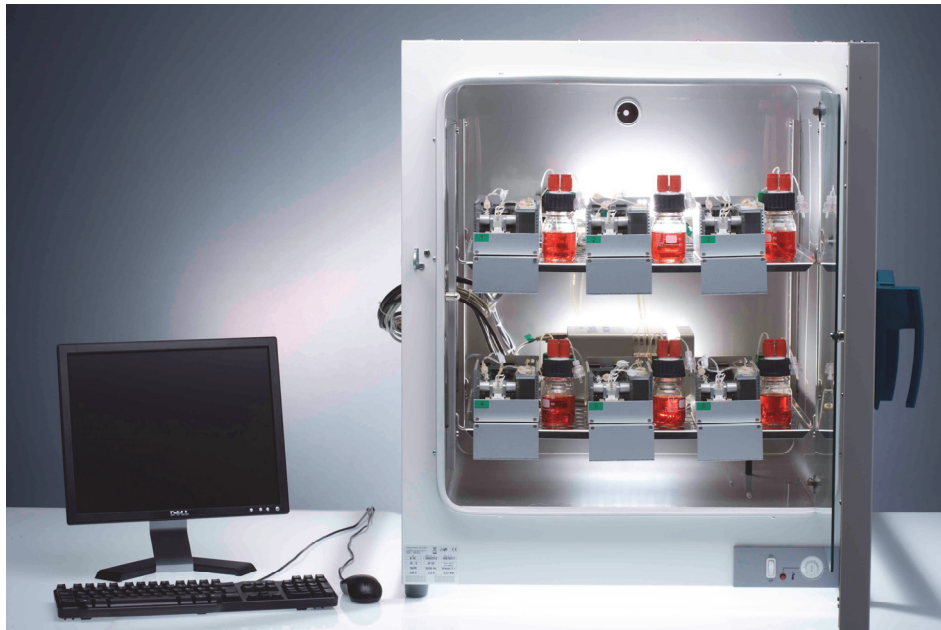
Das Intelligent Mobile Lab (IMOLA) wurde nach der Ausgründung der Firma cellasys (Deutschland)¹⁹⁶ aus dem Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik (TU München)³¹ ständig weiter entwickelt. Als mutliparametrisches System ermöglicht das IMOLA anhand elektrochemischer Sensoren die markerfreie Messung von Sauerstoffverbrauch und Ansäuerungsaktivität von Zellen oder Gewebeproben. Messungen der Zellimpedanz lassen Rückschlüsse auf Morphologie, Anzahl und Anheftung der Zellen am Substrat zu. Durch ein Pumpsystem werden die Proben mit frischem Kulturmedium oder Wirkstoffen versorgt. Während der pumpfreien Intervalle misst das Gerät Änderungen des Sauerstoffgehalts und des pH-Werts im Kulturmedium (Abb. 1-22). Mikroskopie ist mit diesem Gerät nicht möglich. Das auf dem Markt erhältliche IMOLA-System ist aufgrund des modularen Aufbaus und der geringen Größe sowohl für den mobilen Einsatz außerhalb eines Labors, als auch den Einsatz für Labortests im größeren Umfang konzipiert, da es auf bis zu 256 Elemente erweiterbar ist. Standardmäßig finden Messungen mit sechs parallelen Elementen statt, die in einem Inkubator untergebracht sind³⁵.



a



b

**c****Abb. 1-22: Intelligent Mobile Lab (IMOLA)**

IMOLA-System der Firma cellasys¹⁹⁶. (a) Einzelnes, transportables IMOLA mit Mediovorrats- und Abfallgefäß und Fluidiksystem, (b) BioChip-C mit elektrochemischen Sensoren zur Messung von pH-Wert und O₂-Gehalt des Mediums sowie der Zellimpedanz. (c) 6-fach IMOLA in einem Inkubator. Abbildungen: cellasys¹⁹⁶

1.9 Intelligent Microplate Reader (IMR)-System

Aufgrund der nicht invasiven, dynamischen Messungen bieten sensorbasierte Messmethoden die Möglichkeit, eine direkte Reaktion der Vitalität von Proben auf Wirkstoffbehandlungen in zeitaufgelöster Weise zu untersuchen und zu vergleichen. Dies steigert nicht nur den Informationsgehalt einer Messung, sondern vor allem die Genauigkeit der prädiktiven Aussage.

Mit dem Ziel, die Limitationen der derzeit verfügbaren Chemosensitivitätsassays zu beheben und die Vorteile sensorbasierter Systeme in einem Gerät zu vereinen, wurde in den letzten Jahren am Heinz Nixdorf Lehrstuhl für Medizinische Elektronik (TU München)³¹, in Kooperation mit der Firma HP Medizintechnik GmbH (Deutschland)³² und Erwin Quader Systemtechnik GmbH³³, sowie maßgeblicher Unterstützung des Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF Projekt 0315114)³⁴, das Intelligent Microplate Reader (IMR)-System entwickelt^{28,29}. Resultierend aus Grundlagenforschung von Arbeitsgruppen um Prof. Wolf entstanden im Vorfeld eine Reihe von Patentanmeldungen im Bereich der sensorgestützten Mikrotiterplatten und Mikrofluidik für die zelluläre Analytik¹⁹⁷⁻²⁰⁰. In dem neuentwickelten IMR-Testsystem wurde die Möglichkeit für multiparametrische, sensorbasierte high-content Langzeitanalysen anhand aussagekräftiger Parameter über metabolische Aktivität von Zellen und Geweben, realisiert (Abb. 1-23).

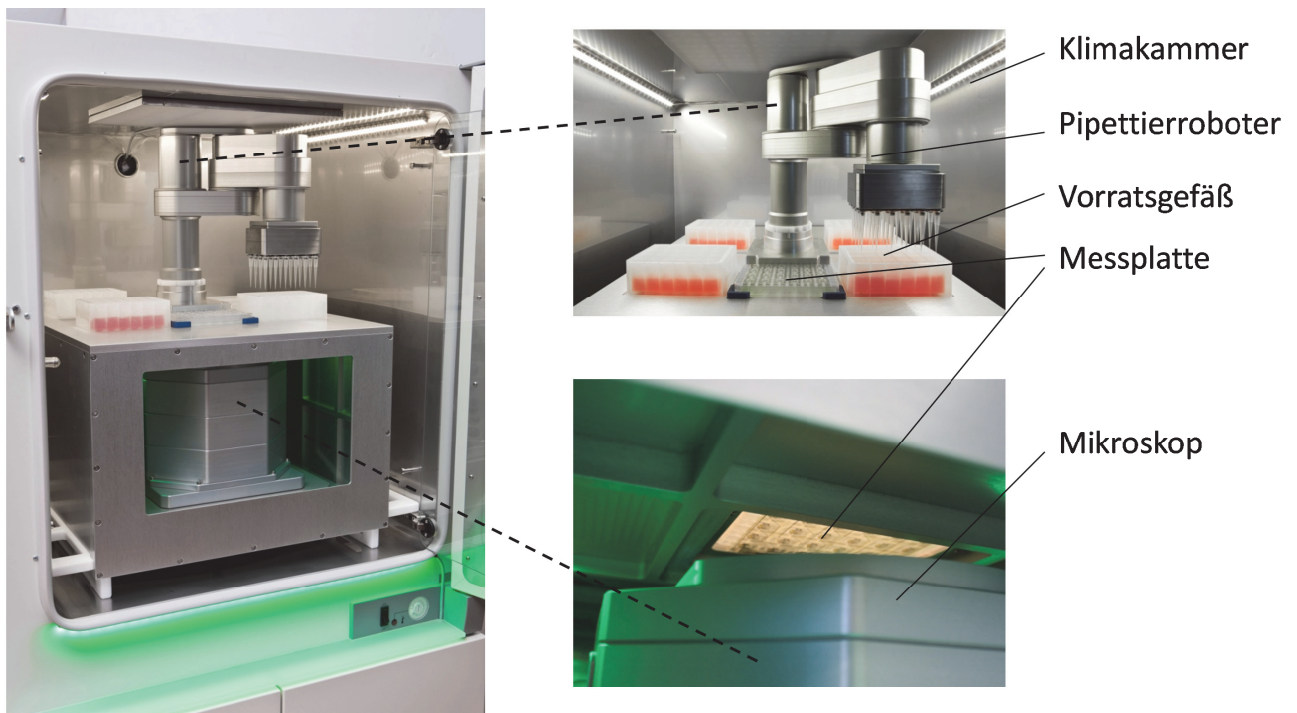


Abb. 1-23: Intelligent Microplate Reader (IMR)

Intelligent Microplate Reader (IMR)-System entwickelt vom Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik (TU München)³¹ und der Firma HP Medizintechnik GmbH³². (links) Dargestellt ist das modular aufgebaute IMR-Gesamtsystem, bestehend aus einem Pipettierroboter zur Versorgung der Zellen, einer Klimakammer zur Konstanthaltung der Umgebungsbedingungen und einem automatisierten Mikroskop zur Erfassung von Vitalitätsparametern. (rechts oben) Pipettierroboter, Messplatte und Vorratsgefäße. (rechts unten) Mikroskop zum Auslesen der Daten und Unterseite der Messplatte. Abbildungen (modifiziert): Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik und HP Medizintechnik GmbH^{31,32}

Das IMR-System^{28,29} besteht aus einem automatisierten Mikroskop zur parallelen Erfassung von metabolischen und morphologischen Parametern, einem Pipettierroboter zur Versorgung der Zellen mit Kulturmedium und Wirkstofflösungen, einer Klimakammer zur Konstanthaltung der Umgebungsbedingungen (Temperatur und Sterilität), sowie einem PC zur Speicherung und Analyse der Messdaten (Abb. 1-24a). Aufgrund der Echtzeitauswertung können Messdaten während eines laufenden Experiments eingesehen und analysiert werden. Falls erforderlich kann in den Verlauf der Messung eingegriffen werden. Da das Auslesen der optochemischen Sensoren die Proben und das Kulturmedium nicht beeinflusst, können markerfreie und multiparametrische Messungen durchgeführt werden.

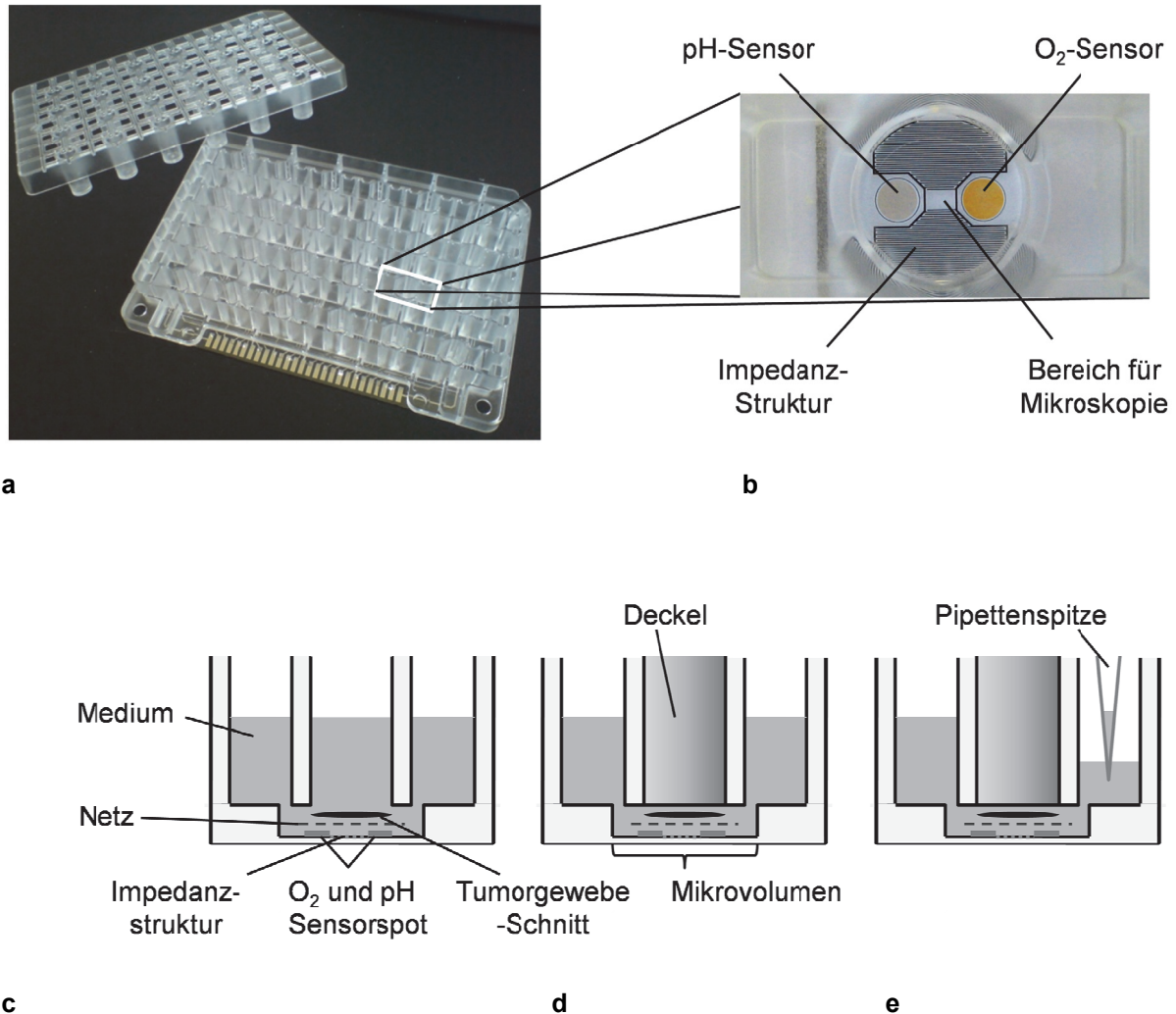


Abb. 1-24: 24-Well Sensorplatte und Fluidiksystem des IMR-Systems

(a) 24-Well Sensorplatte mit Deckel. (b) Aufsicht auf ein einzelnes Well mit integrierten optochemischen Sensoren zur Bestimmung des O_2 - Gehalts und pH-Werts des Kulturmediums und Impedanzstrukturen zur Bestimmung des Anheftungsverhaltens und der Morphologie von Zellen. Abbildungen (modifiziert): Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik^{31,32}. (c-e) Schematisierter Längsschnitt durch ein Well. (c) Tumorgewebeschnitt in der Kulturkammer aufliegend auf einem Nylonnetz um den Kontakt mit den auf dem Plattenboden aufgebracht optochemischen Sensoren zu verhindern. (d) Durch Aufsetzen eines speziellen Deckels wird das Mediumvolumen in der zentralen Kulturkammer auf 23 μ l verringert, um sensitive Messungen der metabolischen Signale zu ermöglichen. (e) Basierend auf dem Prinzip des hydrostatischen Druckausgleichs zwischen den drei miteinander verbundenen Kammern wird das Medium in der Kulturkammer während des Pipettiervorgangs ausgetauscht.

Zentraler Bestandteil des Systems ist eine modifizierte Multiwellplatte (Intelligente Multiwellplatte, Erwin Quarder Systemtechnik GmbH), die mit 24 voneinander unabhängigen Wells ausgestattet ist (Abb. 1-24a). Die Sensor-Platte ist im System fest positioniert, während sich das Mikroskop für die Datenerfassung computergesteuert unterhalb der Platte von Well zu Well bewegt (Abb. 1-24b, c). Jedes Well (Durchmesser 7,7 mm) besitzt optische Sensorspots (PreSens GmbH, Regensburg) mit einem Durchmesser von ~2 mm) zur Bestimmung von Gelöstsauerstoffgehalt und pH-Wert des extrazellulären Mediums (Abb. 1-24b). Diese Parameter ermöglichen Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität von Zellen und Gewebeproben¹⁰⁷. Änderungen der Morphologie oder des Zustands einer Probe können über interdigitale Impedanz-Elektroden (Abstand 50 μm)²⁰¹ (Abb. 1-24b) und durch ein inverses Lichtmikroskop (iMIC, TILL Photonics GmbH) (Abb. 1-23a, c) aufgezeichnet werden.

Jedes der 24 Wells einer Multiwell-Platte besitzt ein eigenes, aus drei, über Kanäle miteinander verbundenen Kammern bestehendes Fluidiksystem (Abb. 1-24c). Durch Aufsetzen eines speziellen Deckels wird das Mediumvolumen in der zentralen Kulturkammer auf 23 μl verringert, um sensitive Messungen der metabolischen Raten zu ermöglichen (Abb. 1-24d). Der Pipettierroboter tauscht in regelmäßigen, einstellbaren Abständen parallel in jedem Well 100 μl des verbrauchten Kulturmediums gegen frisches oder wirkstoffhaltiges Medium aus. Hierfür wird aus der rechten Kammer verbrauchtes Medium entnommen und der linken Kammer frisches Medium hinzu gegeben. Basierend auf dem Prinzip des hydrostatischen Druckausgleichs wird das Medium in der mittig liegenden Zellkulturkammer ausgetauscht (Abb. 1-24e). Dies ermöglicht die optochemische Messung von durch Zellen hervorgerufenen Änderungen des pH-Wertes und Gelöstsauerstoffgehalts des extrazellulären Mediums.

Die optische Bestimmung von Gelöstsauerstoffgehalt und pH-Wert des Mediums erfolgt zu sieben Messzeitpunkten eines 20-minütigen Zyklus. In der Regel findet der Medien austausch ebenso wie die Bildaufnahmen in regelmäßigen Abständen von 20 Minuten statt. Resultierend aus der metabolischen Aktivität der Zellproben sinken Sauerstoffgehalt sowie pH-Wert des Mediums in diesem Zeitraum ab, bis ein erneuter Pipettiervorgang durchgeführt wird. Die Raten des Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerung werden aus der Steigung der Graphen errechnet, die sich aus den aufgezeichneten Messwerten von extrazellulärem Gelöst-Sauerstoff und pH-Wert des Mediums ergeben ($\delta\text{O}_2/\delta t$ und $\delta\text{pH}/\delta t$). Der Sauerstoffverbrauch wird in %/min und die Ansäuerungsrate in -pH/min angegeben (

Abb. 1-25). Aufgrund der fehlenden Kalibrierung der Sensoren der Testplatte ist es derzeit noch nicht möglich, absolute Werte des Gelöstsauerstoffs und pH-Wertes des Kulturmediums darzustellen.

Durch den Einsatz des Pipettierroboters werden Medien austausch und die Wirkstoffzugabe automatisiert. Hierdurch sind nicht nur Langzeitmessungen über mehrere Tage und Wochen möglich, sondern es kann auch zusätzlich der Probendurchsatz durch die Parallelisierung deutlich erhöht werden. Weiterhin werden durch die Automatisierung manuelle Pipettierfehler, Wirkstoffverschleppung sowie das Kontaminationsrisiko minimiert.

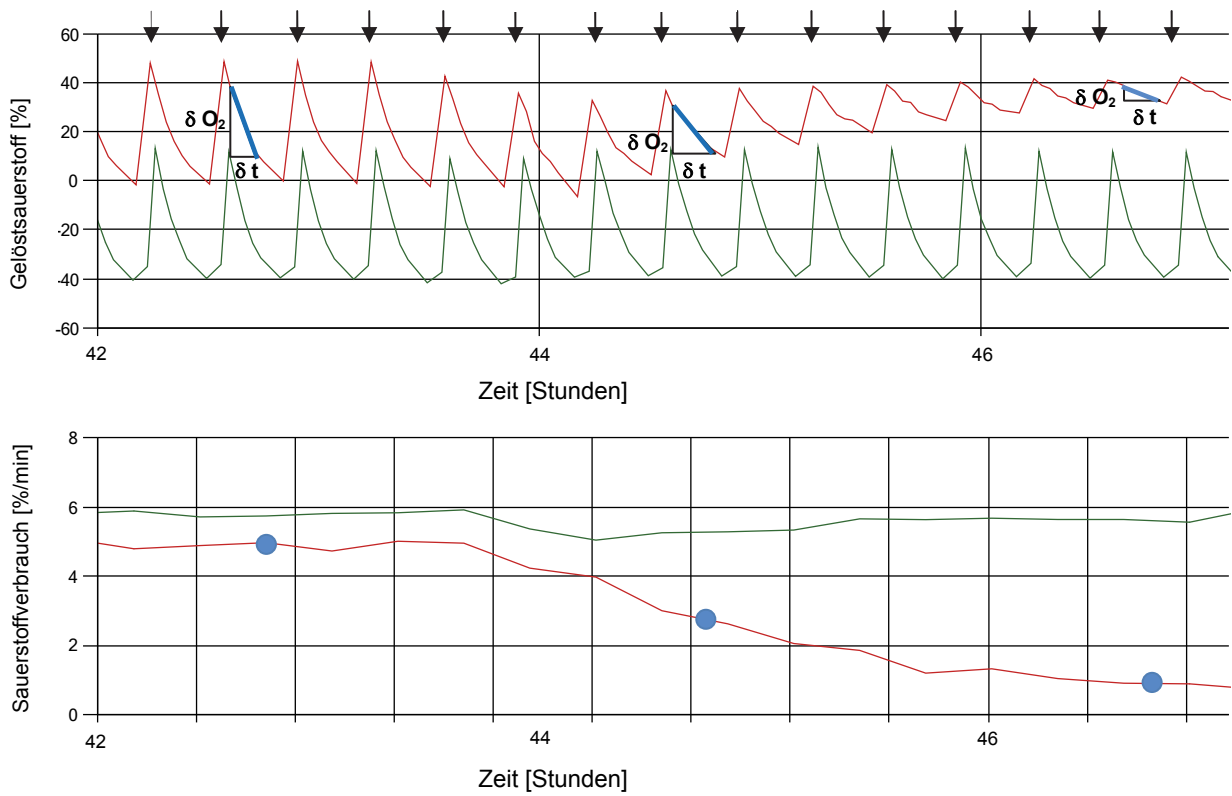


Abb. 1-25: Berechnung der metabolischen Raten aus den Messdaten des IMR-Systems

Resultierend aus der metabolischen Aktivität der Zellproben sinken Sauerstoffgehalt sowie pH-Wert des Mediums ab, bis ein Medien austausch durchgeführt wird. Dieser erfolgt in regelmäßigen Abständen von 20 Minuten (Pfeile). Dargestellt sind Graphen einer Probe mit gleichbleibend hoher Vitalität (*grüne Linie*) und eine Probe mit abnehmender metabolischer Aktivität ab ca. Stunde 44 (*rote Linie*). Die Raten von Sauerstoffverbrauch [%/min] und Ansäuerungsaktivität [-pH/min] werden aus der Steigung (blau) der Graphen der aufgezeichneten Messwerte von extrazellulärem Gelöst-Sauerstoff ($\delta O_2/\delta t$) und pH-Wert ($\delta pH/\delta t$) errechnet (*oben*). Aus jedem 20 minütigen Zyklus ergibt sich somit ein Wert für die Verbrauchsrate (*blaue Punkte*), dargestellt sind drei Beispiel-Messpunkte (*unten*). Aufgrund der fehlenden Kalibrierung der Sensoren können keine absoluten Werte des Gelöst-sauerstoffgehalts dargestellt werden.

1.10 Anforderungen an einen aussagekräftigen prädiktiven Chemosensitivitätstest

Beim Einsatz eines Chemosensitivitätstests in der klinischen Routine-Diagnostik muss sein Nutzen die Kosten, den technischen Aufwand und die evtl. Belastung für den Patienten überwiegen. Um standardisierbare und zuverlässige Testergebnisse zu erhalten, müssen eindeutige Kriterien für Testablauf, Daten-Analyse und Interpretation erfüllt sein. Hierzu zählen standardisierte Probenentnahme und Transport, klar definierte Präparations- und Messprotokolle, ein definierter Endpunkt und eine hohe Evaluierbarkeit des Tests. Eine unkomplizierte technische Durchführbarkeit, die Benutzerfehler weitestgehend ausschließt, ist ebenfalls ausschlaggebend für eine genaue Dateninterpretation. Des Weiteren müssen die Kriterien zur Analyse und Interpretation der erhaltenen Daten eindeutig und objektiv sein. Zur Vergleichbarkeit einzelner Messungen ist eine Reproduzierbarkeit der Testergebnisse auch in unterschiedlichen Testlabors nötig.

Zusätzlich kann nur durch eine ausreichend große Anzahl an Replikaten pro Testansatz und pro getestetem Chemotherapeutikum eine statistische Auswertung ein zuverlässiges und aussagekräftiges Ergebnis gewährleisten. Optimal sind High-Throughput-Screenings, da neben einer ausreichenden Anzahl an Replikaten auch eine große Anzahl an Chemotherapeutika und deren Kombinationen untersucht werden kann. Eine Standardisierbarkeit der Testabläufe kann nur durch eine gleichbleibend hohe Vitalität der Proben über den Messzeitraum sowie einer vergleichbaren Qualität der unterschiedlichen Proben erzielt werden. Um die Messergebnisse auf die in vivo Situation übertragen zu können, sollten die Testbedingungen bestmöglich der physiologischen Situation im Körper entsprechen. Zusätzlich sollte eine geringe Probenmenge, wie aus einer Nadel-Biopsie oder Reste der Histopathologie, für die Untersuchung ausreichen. Der Test sollte auf möglichst alle Tumortypen und Patienten anwendbar sein.

Mit dem Ziel, möglichst viele Anforderungen an einen erfolgreichen prädiktiven und klinisch einsetzbaren Chemosensitivitätstest zu erfüllen, wurden im Rahmen dieser Arbeit ein Präparations- und Messprotokoll für humane Mammakarzinom-Gewebeproben für Messungen mit dem neuen IMR-Testsystem entwickelt. Desweiteren wurde das System auf seine Tauglichkeit für personalisierte Chemosensitivitätstests von humanem Tumorgewebe untersucht.

2 Ergebnisse

2.1 Entwicklung eines Präparations- und Messprotokolls für humanes Mammakarzinom-Gewebe

Eine besondere Anforderung an die metabolischen Messungen war es, die ursprünglichen in vivo Umgebungsbedingungen eines Tumors möglichst genau nachstellen zu können. Hierfür spielt u.a. die Erhaltung der dreidimensionalen Gewebestruktur der zu analysierenden Tumorprobe eine besondere Rolle. Es ist bekannt, dass die Zell-Zell-Interaktionen eines Gewebeverbandes nicht nur einen Einfluss auf die Vitalität einer Gewebeprobe haben, sondern nachweislich auch auf deren Sensitivitäts- und Resistenzeigenschaften gegenüber zytostatischen Behandlungen^{23,42,83,85,86} (s. Abschnitt 1.4.5, 1.6.2). Aus diesem Grund stand bei der Entwicklung des Präparationsprotokolls die Herstellung von Tumorgewebeschnitten im Fokus.

Es wurden verschiedene Präparationsmöglichkeiten von OP-Gewebeproben für die metabolischen Messungen im Hinblick auf ihre Praktikabilität und den Erhalt der Probenvitalität hin getestet. Metabolische Messungen können sowohl an Zellsuspensionen als auch an Gewebeschnitten durchgeführt werden. Zellsuspensionen wurden enzymatisch und mechanisch, Gewebeschnitte per Hand, mit einer Gewebestanze, einem Handmikrotom oder Vibratom präpariert. In Abb. 2-1 ist eine Übersicht über die getesteten Präparationsmethoden dargestellt.

Für Messungen an humanem Mammakarzinom-Gewebe erwies sich die Präparation mit einem Vibratom als am geeignetsten. Für Chemosensitivitätstests von humanen Mammakarzinom-Gewebeproben mit dem IMR-System wurde die in Kapitel 4 beschriebene Standardarbeitsanweisung (Standard Operating Procedure, SOP) definiert.

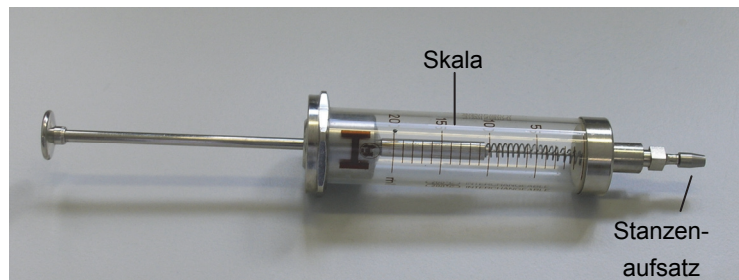
Als Grundlage für auswertbare metabolische Messungen müssen alle unbehandelten Gewebeproben eine vergleichbare und hohe Qualität über den gesamten Testzeitraum aufweisen, bzw. dürfen ihre Vitalität nur in einem geringen, tolerierbaren Maß verringern. Um die ursprünglichen Eigenschaften des Primärgewebes über einen möglichst langen Zeitraum zu erhalten, ist es von Bedeutung, die Probenpräparation einerseits so schonend wie möglich, andererseits die Messbedingungen den physiologischen Bedingungen möglichst ähnlich zu gestalten.

Frisch explantierte, anonymisierte humane Mammakarzinom-Gewebeproben wurden im Rahmen des „AHA“-Projekts („Automatisierte High Content Analyseplattform zur Entwicklung individualisierter Therapiestrategien“, BMBF Projekt 0315114 A, 03/2009-08/2011)³⁴ vom Institut für diagnostische Histopathologie und Zytologie (Prof. Dr. med. A. Niendorf, Hamburg)²⁰² zur Verfügung gestellt.

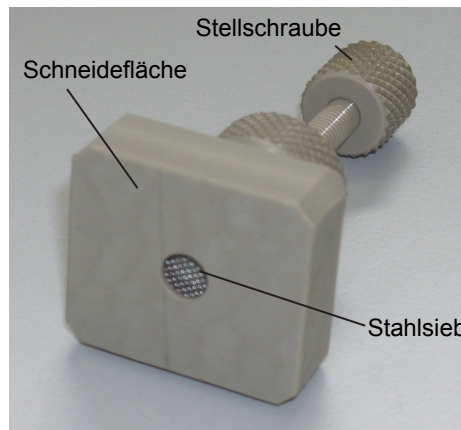
2.1.1 Herstellung von Zellsuspensionen

Zur Herstellung von Zellsuspensionen wurde das Gewebe in Stücke zerkleinert und in mehreren Schritten enzymatisch disaggregiert. Mithilfe einer anschließenden Trypanblaufärbung konnten jedoch nur sehr wenige vitale Zellen in der Suspension nachgewiesen werden. Mit dem Ziel Zellschäden zu

Zur Lösung dieses Problems wurde ein Handmikrotom konstruiert (Abb. 2-2b). Mit Hilfe einer Stellschraube sollte das Herausdrücken in 100 μm Schritten reguliert werden. Die große Auflagefläche für die Klinge sollte es ermöglichen, die Proben im gleichen Winkel abzuschneiden. Jedoch war es auch mit diesem Gerät schwierig gleichmäßig dicke Gewebeschnitte herzustellen, da das Herausdrücken des Gewebes ebenfalls nicht präzise genug gelungen ist.



a



b

Abb. 2-2: Gewebestanze und Handmikrotom zur Herstellung von Gewebeschnitten

(a) Gewebestanze. Durch den Stanzenaufsatz können Proben mit definiertem Durchmesser aus dem Gewebe ausgestanzt werden. Die Skala soll es ermöglichen, die Probe in definierter Weise aus der Spritze heraus zu drücken und gleichmäßige Schnittdicken zu erzeugen. (b) Handmikrotom mit Stahlsieb vor der Öffnung zur Zerkleinerung von Gewebestücken zur Herstellung von Zellsuspensionen. Zur manuellen Herstellung von Gewebeschnitten kann das Stahlsieb entfernt und mit Hilfe einer Stellschraube das Herausdrücken des Gewebes in 100 μm Schritten reguliert werden. Die große Auflagefläche soll ein präzises Schneiden ermöglichen.

2.1.3 Herstellung von Gewebeschnitten mit dem Vibratom

Um die gewünschte Schnittdicke der Gewebeproben (200 bis 300 μm) reproduzierbar erzeugen zu können, wurde ein Vibratom (Mikrotom HYRAX V 50, Carl Zeiss GmbH, Deutschland) verwendet (Abb. 2-3).

Nach Empfehlung der Herstellerfirma wurden die Tumorproben mit Loctide 406 (Henkel AG, Deutschland) auf dem Probenteller des Vibratoms aufgeklebt (Abb. 2-3b). Es kann jedoch nicht nachvollzogen werden, in wie weit dieser nicht-biokompatible Kleber in die Probe hinein diffundiert und diese schädigt. In weiteren Schritten soll biokompatibler Kleber (z.B. Fibrinkleber) auf seine Eignung für die Befestigung einer Gewebeprobe auf dem Vibratomteller hin untersucht werden.

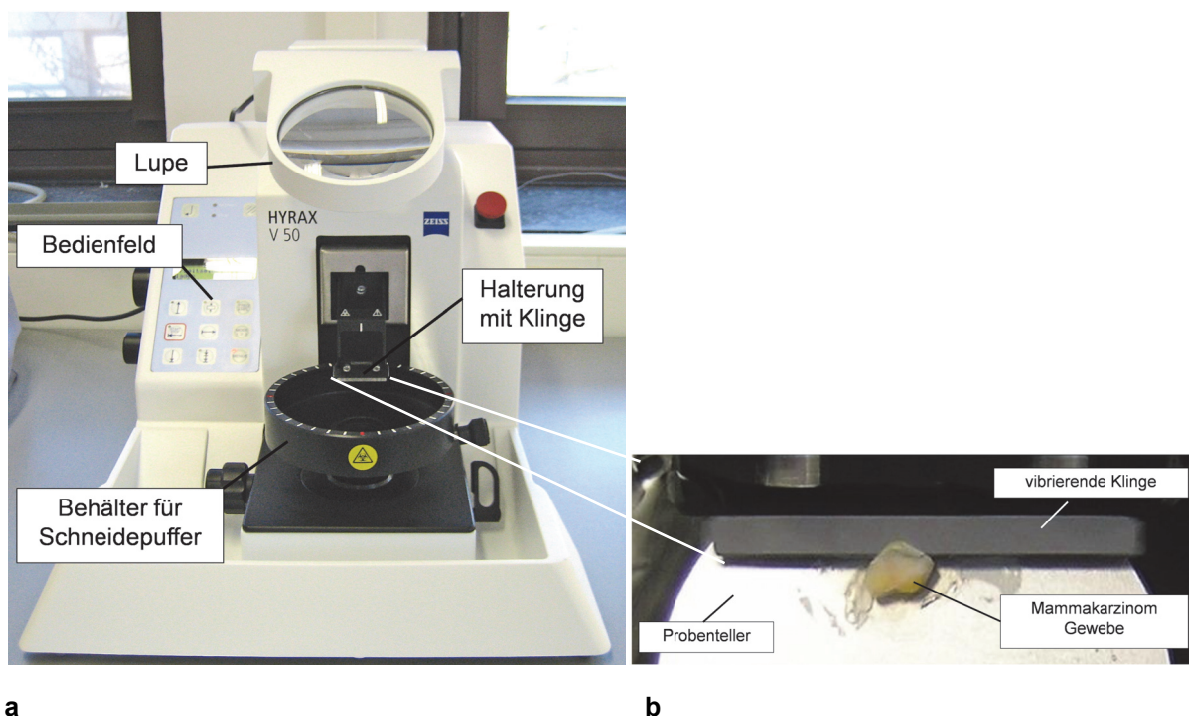


Abb. 2-3: Schneiden von Mammakarzinom-Gewebe mit einem Vibratom

(a) Vibratom HYRAX V 50 (Carl Zeiss GmbH)²⁰³ und (b) vergrößerter Ausschnitt der auf dem Probenteller aufgeklebten Mammakarzinom-Probe während des Schneidevorgangs. Die Bildunschärfe resultiert aus den Vibrationen der Klinge beim Schneidevorgang.

In Abhängigkeit von der Konsistenz der Probe besteht das Risiko, dass sehr weiches Gewebe nicht erfolgreich geschnitten wird, sondern durch die Vorwärtsbewegung der Vibratom-Klinge nach hinten weggedrückt wird. Da das Festkleben von sehr weichen Gewebeproben allein keine ausreichende Stabilität bot, wurden in verschiedenen Versuchen nach Möglichkeiten gesucht, um das Mammakarzinom-Gewebe optimal auf dem Vibratom-Teller zu stabilisieren.

Es wurde getestet das Gewebe in Agarose einzubetten und dieses auf dem Probenteller festzukleben. Vorteil der Verwendung von Agarose als Einbettmedium ist, dass Zellen durch dieses nicht verändert

oder in ihrem Metabolismus beeinflusst werden. Dennoch erwies sich diese Methode als ungeeignet, da die Proben sich während des Schneidevorgangs aus der Agarose-Ummantelung herauslösten.

Im Gegensatz zu Agarose dringt Alginat in die äußeren Zellschichten der Gewebeprobe ein und bietet somit bessere Stabilität beim Schneiden. Die Fixierungsversuche in Alginat erschienen zunächst vielversprechend. Einige Mammakarzinom-Proben ließen sich auf den Probenhalter aufkleben und mit dem Vibratom schneiden. Jedoch ist diese Methode aufgrund langer Inkubationszeiten sehr zeitaufwändig und arbeitsintensiv. Hierdurch ist sie für die routinemäßige Durchführung unpraktikabel. Auch wird die Vitalität der Proben durch die zeitaufwändige Präparation beeinträchtigt. Weiterhin muss das Ausgelieren des Alginats durch Zugabe von Ca^{2+} induziert werden. Die Stimulation von Zellen mit Ca^{2+} könnte jedoch nicht kalkulierbare Auswirkungen auf intrazelluläre Signalwege zur Folge haben, die sich u.a. in Veränderungen der metabolischen Aktivität manifestieren und die Testergebnisse gravierend beeinflussen könnten. Aus diesen Gründen wurde dieser Präparationsansatz verworfen.

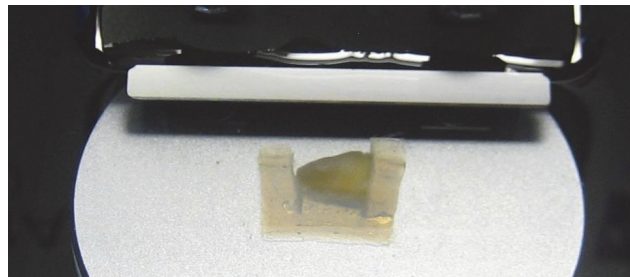


Abb. 2-4: Stabilisierung der Gewebeprobe durch Agarose-Klötzchen beim Schneidevorgang

Mittig auf dem Probenhalter aufgeklebte Probe umgeben von einem stabilisierenden u-förmigen Agaroseklötzchen. Die Öffnung des u-förmigen Klötzchens ist beim Schneiden zur Vibratom-Klinge hingewandt.

Als erfolgreich erwies es sich, die Gewebeproben bei dem Schneidevorgang zwar von drei Seiten zu stabilisieren, aber dadurch nicht durch die Zugabe von Reagenzien zu beeinflussen. Hierfür wurde ein u-förmiges Agaroseklötzchen auf den Probenhalter geklebt, in dessen Mitte die Probe aufgebracht wurde (Abb. 2-4). Auf diese Weise kann ein Wegdrücken sehr weicher Gewebeproben durch die Vibratom-Klinge während des Schneidevorgangs vermieden werden. Obwohl auch bei dieser Methode eine Fixierung der Probe auf dem Probenhalter mit einem Kleber nötig ist, wurde diese Methode weiterhin verwendet. Es wurde zwar so wenig Kleber wie möglich verwendet, jedoch ist nicht auszuschließen, dass dieser in die untersten Zellschichten der Probe diffundiert. Aus diesem Grund wurden die Gewebeschnitte, die möglicherweise mit dem Kleber in Berührung gekommen sein könnten, nicht für die metabolischen Messungen eingesetzt.

Im Gegensatz zu den anderen Methoden ist die Herstellung von Gewebeschnitten mit dem Vibratom nur mit einem relativ geringen zeitlichen Aufwand und geringerer Beeinflussung der Probe durch äußere Faktoren verbunden.

Um erfolgreich Schnitte von Mammakarzinom-Gewebe herzustellen, mussten diverse Einstellungen des Schneidevorgangs modifiziert werden. Ausschlaggebend für den Erfolg der Schnittherstellung mit dem Vibratom sind der Winkel der Klinge, die Vorschubgeschwindigkeit der Klinge, die Frequenz und

Amplitude der Vibration. Nach diversen Versuchen konnten die geeigneten Parameter definiert werden. Diese sind in Tabelle 2-1 aufgelistet.

Tabelle 2-1: Schnitteinstellungen des Vibratorms für die Herstellung von Mammakarzinom-Gewebeschnitten

Winkel der Klinge	2°
Frequenz	80-85 Hz
Amplitude	1-1,2 mm
Geschwindigkeit	0,3-0,6 mm/sec
Schnittdicke	250-300 µm

2.1.4 Einlegen der Gewebeschnitte in die Messplatte

Unmittelbar nach der Präparation der Gewebeschnitte wurden diese in die Wells der Messplatte eingelegt (Abb. 2-5) und die Messung möglichst zeitnah gestartet. Gewebeschnitte sollten zur optimalen Signalerzeugung ca. 3/4 der Oberfläche eines Wells bedecken. Um das direkte Aufliegen des Schnitts auf den Sensoren zu verhindern und somit den Medien austausch an den Sensorspots zu gewährleisten, wurden Nylonnetzchen (PA-475/56, Franz Eckert GmbH, Deutschland) zwischen das Gewebe und den Well-Boden platziert. Die Gewebeschnitte wurden zunächst auf dem Netz platziert und anschließend in den Wells der Messplatte überführt. Das Einlegen der Gewebeschnitte mit der Pinzette in die einzelnen Wells erwies sich als unhandlich und zeitaufwändig. Um den Aufwand dieses langwierigen Arbeitsschritts in Zukunft so gering wie möglich zu halten, soll in Zukunft das Design der Multiwellplatte modifiziert werden. In Abb. 2-6 ist der im Rahmen dieser Arbeit etablierte und festgelegte Präparationsablauf von Tumorgewebeschnitten und das Einlegen der Schnitte in die Messplatte dargestellt.

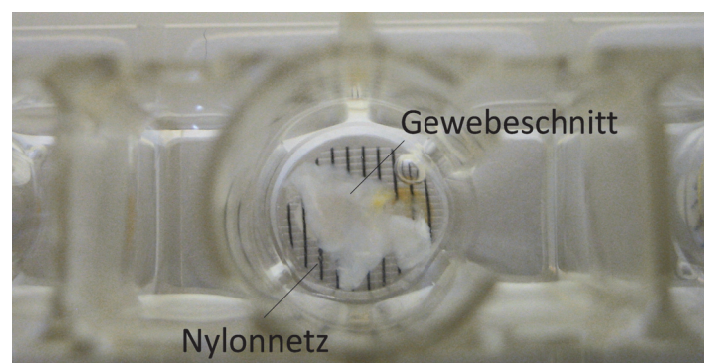


Abb. 2-5: Mammakarzinom-Gewebeschnitt in einem Well der Messplatte

Aufsicht auf ein Well mit eingelegtem Nylonnetz und Gewebeschnitt (250 µm Dicke). Das Nylonnetz verhindert den direkten Kontakt der Probe mit den Sensoren auf dem Plattenboden.

2.1.5 Definition von Schnittdicke und Schnittdurchmesser

Eine Reihe von Testläufen mit dem IMR-System waren erforderlich, um die geeignete Größe und Dicke der Gewebeschnitte für metabolische Messungen definieren zu können. Es musste ein Kompromiss zwischen einer für die Erzeugung detektierbarer Signale erforderlichen Zellzahl und einer möglichst in vivo ähnlichen Länge der Diffusionsstrecke für O₂ und Nährstoffe innerhalb des Gewebeschnitts eingegangen werden. Gewebeschnitte mit Dicken von 200 bis 250 µm mit einem Durchmesser von ca. 5 mm erwiesen sich als am geeignetsten für auswertbare Messungen mit dem IMR-System.

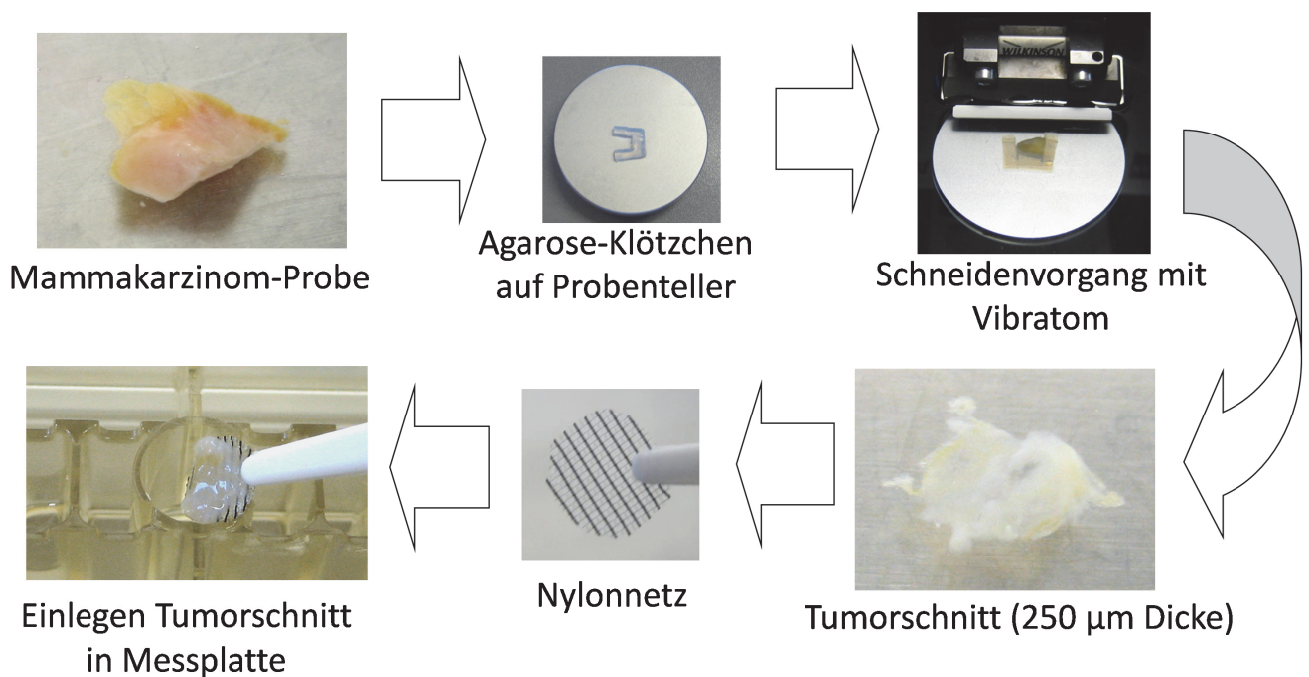


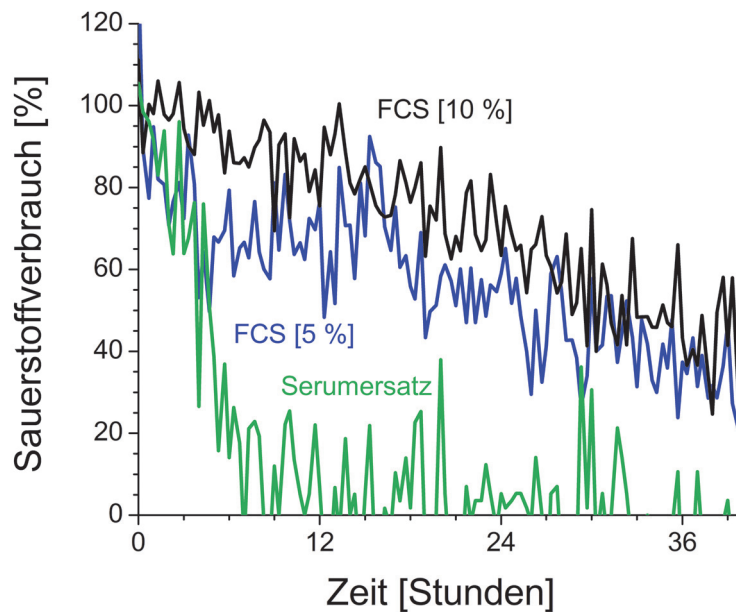
Abb. 2-6: Präparationsablauf für die Herstellung von Mammakarzinom-Gewebeschnitten

Eine Mammakarzinom-Gewebeprobe wird zum Stabilisieren während des Schneidvorgangs durch ein u-förmiges Agarose-Klötzchen von drei Seiten umschlossen. Mit dem Vibratom werden Gewebeschnitte von 250 µm Dicke hergestellt, auf einem Nylonnetz platziert und mit diesem in ein Well der Messplatte eingelegt.

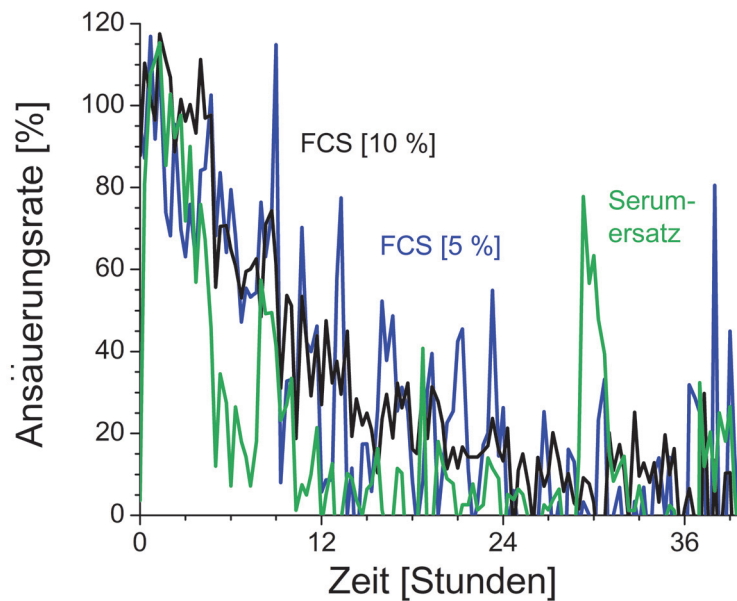
2.1.6 Zusammensetzung des Kulturmediums

Die Messbedingungen im IMR-System unterscheiden sich deutlich von den Bedingungen einer Standard-Zellkultur. Der Austausch des Mediums erfolgt durch den Pipettierroboter des IMR in regelmäßigen Abständen von 20 Minuten. Die Zusammensetzung des Mediums (Dulbeccos Modified Eagles Medium D5030 + 25 mM D-Glucose, + 50 µg/ml Gentamycin, + 4 mM L-Glutamin, + 5% FCS; Sigma-Aldrich GmbH) ist an die Anforderungen des Messprinzips angepasst. Die Medien der sensorbasierten IMR-Messungen enthalten keinen Puffer und kein Phenolrot. Pufferzusatz würde den pH-Wert des Mediums nahezu konstant halten, wodurch die aus der metabolischen Aktivität der Zellen resultierende Ansäuerung des Mediums nicht detektierbar wäre. Die Zugabe von Phenolrot würde als Farbstoff die Signalgebung der optischen Sensoren beeinflussen.

Die Zusammensetzung des Kulturmediums ist für die Erhaltung der Probenqualität, d.h. deren Vitalität, entscheidend. Hierbei spielen v.a. der pH-Wert, die Osmolarität, sowie das verwendete Serum eine entscheidende Rolle. Optimal ist die Verwendung von patienteneigenem Serum. Da dies im Rahmen dieses Projektes nicht möglich war, wurde fötales Kälberserum (FCS) eingesetzt. Da die Zusammensetzung des FCS bezüglich der enthaltenen Proteine und Wachstumsfaktoren nicht genau bekannt ist und chargenspezifisch schwankt, wurde der Serumgehalt im Medium so gering wie nötig gehalten werden. Der Vergleich der Vitalität von Proben, die in Medium mit zwei verschiedenen FCS-Konzentrationen (5% und 15%) kultiviert wurden, zeigte keine signifikanten Unterschiede. Für weitere Messungen wurde die Konzentration von 5% FCS verwendet. Serumersatz (Panexin[®], PAN-Biotech GmbH) erwies sich als nicht geeignet (Abb. 2-7).



a



b

Abb. 2-7: Serumgehalt des Kulturmediums

Metabolische Messungen zur Bestimmung des für eine Kultur von primären Mammakarzinom-Gewebe optimalen Serumgehalts des Mediums. (a) Sauerstoffverbrauch, (b) Ansäuerungsrate. Unterschiedliche Gewebeschnitte derselben Tumorprobe wurden in Serumersatz oder FCS-Konzentrationen von 5% oder 10% kultiviert. Die Kultivierung in Serumersatz führte zu einem schnellen Absterben der Proben. Beide FCS-Konzentrationen führten zu keinen signifikanten Unterschieden der metabolischen Aktivität. In weiteren Experimenten wurde Medium mit einer FCS-Konzentration von 5% verwendet, um den Serumgehalt möglichst gering zu halten.

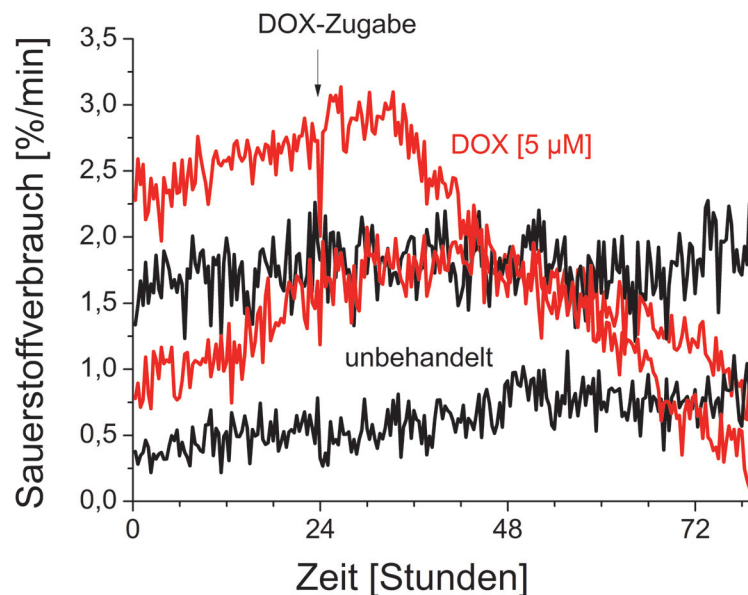
2.2 Datenqualität und Auswertung

2.2.1 Verbesserung der Proben- und Datenqualität

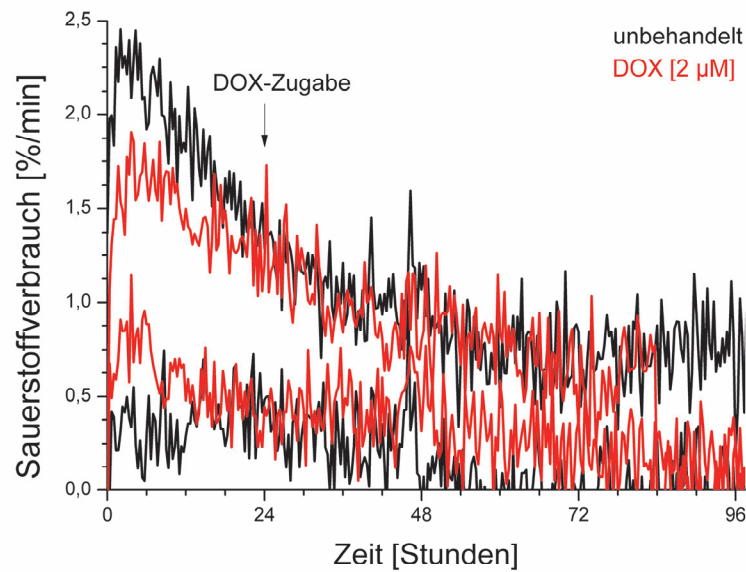
Um einen erfolgreichen, qualitativ hochwertigen und somit aussagekräftigen Chemosensitivitätstest mit einem hohen prädiktiven Wert durchführen zu können, ist eine gleichbleibend hohe Qualität (Vitalität) der Proben über den Testzeitraum Voraussetzung. Zur Erhaltung der Vitalität spielt besonders die Behandlung der Proben während der Explantation und des Transports zum Testlabor eine ausschlaggebende Rolle. Risiken, die schon im Vorfeld der Präparation und der Messung zu einem gravierenden Vitalitätsverlust von Primärgewebe führen, sind:

- Austrocknen des Gewebes während oder nach der Explantation
- eine mangelhafte Kühlung während des Transports
- ungeeignetes Transportmedium
- eine zu lange Transportdauer (>24 Stunden)

Vitalitätsverluste des Gewebes bei IMR-Messungen konnten nicht eindeutig möglichen Transportschäden, Präparations- oder auch auftretenden technischen Problemen (bspw. einer schlechten Qualität der optischen Sensorspots oder Fehler des Pipettiervorgangs) zugeordnet werden.



a



b

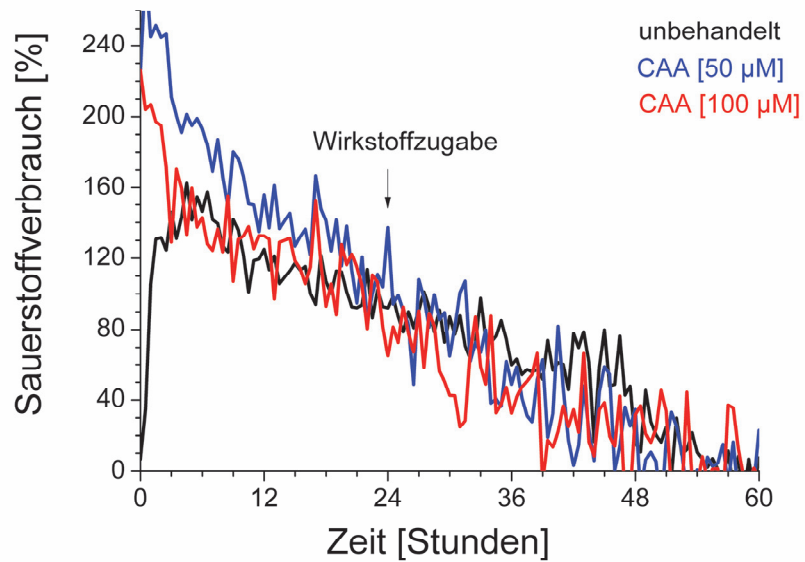
Abb. 2-8: Signalstärke manuell präparierter Gewebeschnitte

Sauerstoffverbrauch jeweils vier manuell hergestellter Gewebeschnitte von zwei verschiedenen Mammakarzinom-Gewebeproben. Die Unterschiede in den Stärken des Sauerstoffverbrauchs resultiert aus den stark variierenden Zellzahlen der unterschiedlich dicken Gewebeschnitte. 24 Stunden nach Beginn der Messung erfolgte jeweils eine DOX-Zugabe für einen Zeitraum von 24 Stunden. (a) Die Behandlung mit DOX [5 µM] resultiert in einer erkennbaren Abnahme des Sauerstoffverbrauchs im Vergleich zu unbehandelten Gewebeschnitten. (b) Die Behandlung mit DOX [2 µM] führt zu keinen Unterschieden im Sauerstoffverbrauch. Pro Messbedingung konnten bei beiden Proben zwei Gewebeschnitte ausgewertet werden. Aus technischen Gründen konnten keine pH-Wert-Veränderungen des Mediums aufgezeichnet werden.

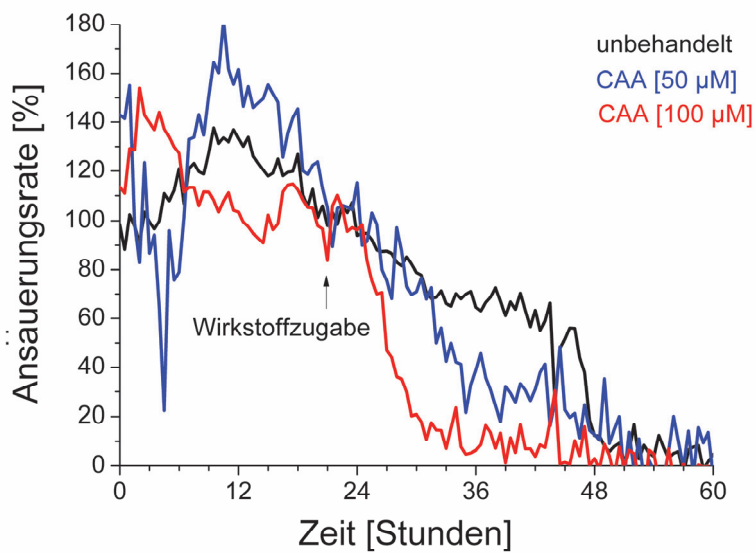
Anfängliche Messungen, die im Rahmen der Entwicklung des Präparations- und Messprotokolls durchgeführt wurden, lieferten nur eine geringe Anzahl vitaler Gewebeschnitte. Aus diesem Grund war nicht bei jeder Messung eine statistische Auswertung möglich. Aufgrund der manuellen Herstellung der Schnitte konnten keine reproduzierbaren Schnittdicken erzeugt werden (Abb. 2-8).

Das unbehandelte Gewebe zeigte eine rasch abnehmende Vitalität über den Verlauf der Messung bis hin zum Absterben der Proben. Dies vermindert gravierend die Vergleichbarkeit zwischen zytostatikabehandelten und unbehandelten Gewebeschnitten und somit die Genauigkeit der Testaus-sage über Chemosensitivität und Resistenz (Abb. 2-8, Abb. 2-9).

Aufgrund technischer Probleme des Messsystems konnten bei den in Abb. 2-8 dargestellten Messungen keine Daten zum Medien-pH-Wert aufgezeichnet werden.



a



b

Abb. 2-9: Metabolische Aktivität von humanem Mammakarzinom-Gewebe von anfänglichen Messungen

(a) Sauerstoffverbrauch und (b) Ansäuerungsrate einer anfänglichen Messung an Gewebeschnitten, die im Rahmen der Entwicklung des Präparations- und Messprotokolls erfolgte. Ein schneller Vitalitätsverlust der unbehandelten Gewebeschnitte (n=5) vermindert die Aussagekraft über mögliche Chemosensitivität gegenüber CAA [50, 100 µM] (jeweils n=3). Die Daten wurden auf den Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe normiert.

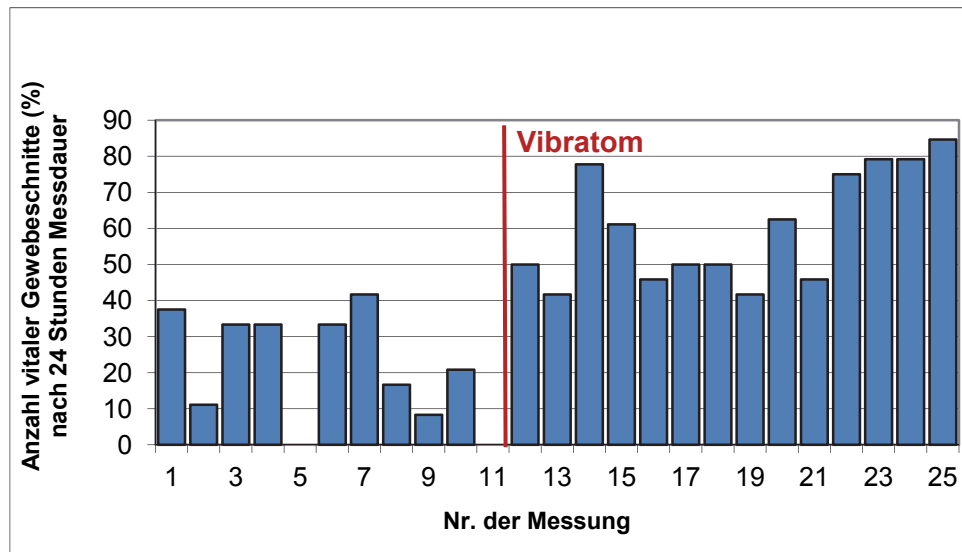


Abb. 2-10: Übersicht über alle durchgeführten IMR-Messungen an humanen Mammakarzinom-Gewebeschnitten

Übersicht über alle durchgeführten IMR-Messungen an humanen Mammakarzinom-Gewebeschnitten. Angegeben ist die Anzahl der vitalen Gewebeschnitte pro Messung (%) nach 24 Stunden Messdauer. Jeder Balken entspricht einer untersuchten Tumorprobe. Mit verbesserter Präparationstechnik konnte die Anzahl der metabolisch aktiven Gewebeschnitte erhöht werden. Ab Messung Nr. 12 wurde ein Vibratom zur Herstellung reproduzierbarer Schnittstärken (250 µm) benutzt, resultierend in einer größeren Anzahl vitaler Gewebeschnitte nach 24 Stunden Messdauer.

Abb. 2-10 zeigt eine chronologische Übersicht aller im IMR durchgeführten metabolischen Untersuchungen an humanem Mammakarzinom-Gewebe. Jede dargestellte Messung entspricht einer individuellen Tumorprobe. Angegeben ist die Anzahl an Gewebeschnitten (in % von der Gesamtzahl an untersuchten Schnitten der jeweiligen Probe), die nach 24 Stunden Messdauer auswertbare Vitalitätssignale zeigten. Da sich die Vitalität von Mammakarzinom-Schnitten als deutlich abhängig von der Art der Präparationsmethode und -dauer erwies, konnte mit der Verbesserung der Präparationstechnik die Anzahl der vitalen Gewebeschnitte drastisch erhöht werden. Durch Anwendung der im Rahmen dieser Arbeit etablierten SOP (Abschnitt 4) zur Präparation von humanen Mammakarzinom-Gewebeschnitten (verwendet ab Messung Nr. 22, Abb. 2-10) ist es nun möglich, die Vitalität einer großen Anzahl von Schnitten über einen Zeitraum von mindestens vier Tagen auf einem hohen Level stabil zu halten (bspw. Abb. 2-16).

2.2.2 Datenauswertung

Grundlegende Voraussetzung für eine genaue prädiktive Aussagekraft eines Chemosensitivitätstests sind die Standardisierbarkeit der Messungen und Objektivierung der Datenauswertung. Durch die parallele Untersuchung einer möglichst großen Anzahl gleich behandelter Gewebeschnitte einer Probe wurden die Testergebnisse in dieser Arbeit validiert. Weiterhin erhöht die Messung mehrerer unterschiedlicher Vitalitätsparameter die Genauigkeit der Testaussage.

Unterschiede in der Stärke der metabolischen Aktivität resultieren aus variierenden Zellzahlen der einzelnen Gewebeschnitte (Abb. 2-8). Mit Erreichen von standardisierten Schnittdicken durch die Präparation mit dem Vibratom konnte dieses Problem deutlich reduziert werden.

Im Gegensatz zu Messungen an Zelllinien lässt sich die Zellzahl eines Gewebeschnitts im Vorfeld der Messung nicht eindeutig festlegen. Da jedoch die relativen Veränderungen der metabolischen Aktivität der Gewebeproben über den Testzeitraum analysiert werden, spielt die absolute Zellzahl der einzelnen Gewebeschnitte keine Rolle für die Dateninterpretation. Ein Zusammenhang zwischen der Position des Schnittes innerhalb des Gewebeblocks und dessen gemessener metabolischer Aktivität war nicht zu beobachten.

Um eindeutige Messergebnisse zu erhalten, müssen Gewebeschnitte zum Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe eine ausreichend hohe Vitalität besitzen. Als Einschlusskriterium der Auswertung wurden ein Sauerstoffverbrauch von mindestens 1 %/min und eine Ansäuerungsaktivität von mindestens 0,03 - pH/min definiert. Ausgeschlossen wurden auch Gewebeproben, die durch mangelhaften Transport offensichtlich geschädigt im Testlabor ankamen. So wurden zwei Proben zu stark gekühlt und tiefgefroren geliefert. Der Transport einer weiteren Probe dauerte 48 Stunden, so dass diese ebenfalls ausgeschlossen wurde. Zur statistischen Auswertung wurden die Kurvenverläufe mehrerer gleich behandelte Gewebeschnitte auf den Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe normiert und diese gemittelt. Die Signifikanz der Unterschiede in den Graphenverläufen wird mithilfe eines zweiseitigen Student's t-Test ermittelt. p-Werte kleiner 0,05 werden als signifikant angesehen. Als Tod des Gewebes und somit Chemosensitivität gegenüber einer Wirkstoffzugabe wird eine Abnahme sowohl des Sauerstoffverbrauchs als auch der Ansäuerungsaktivität auf weniger als 20% des Ausgangswerts definiert.

2.3 Validierung der Messergebnisse von humanem Mammakarzinom-Gewebe anhand von Zelllinien

2.3.1 Typische Verläufe metabolischer Messungen von Zelllinien und Primärgewebe

Das Standard-Messprotokoll (Abschnitt 5.1.5) für humanes Mammakarzinom-Gewebe sieht einen Medien austausch von 100 µl in 20 minütigem Rhythmus und eine Datenaufzeichnung von sieben Messpunkten pro 20 minütigem Zyklus für jeden Parameter und jedes Well vor. Bilder werden alle 20 Minuten aufgenommen. Die Zytostatika-Zugabe erfolgt 24 Stunden nach dem Start der Messung über einen Zeitraum von 24 Stunden. Alle 24 Stunden erfolgt ein Wechsel des Pipettierroboters auf ein frisches Medien-Vorratsgefäß. Die Gesamtmessdauer beträgt in der Regel 96 Stunden. Der zeitliche Versuchsablauf einer IMR-Messung an humanem Mammakarzinom-Gewebe ist in Abb. 2-11 dargestellt.

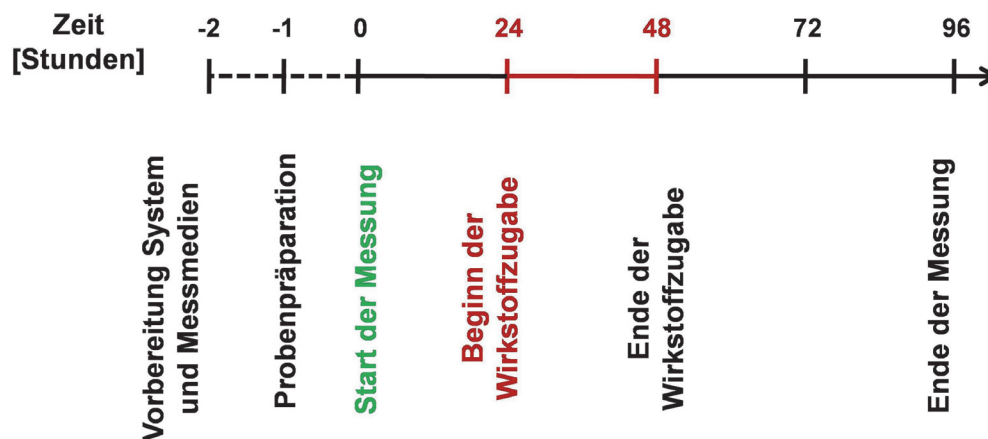
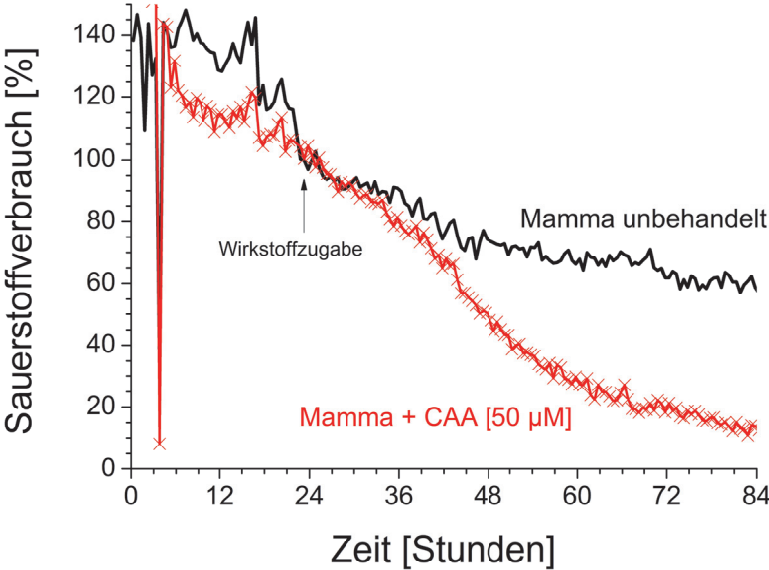


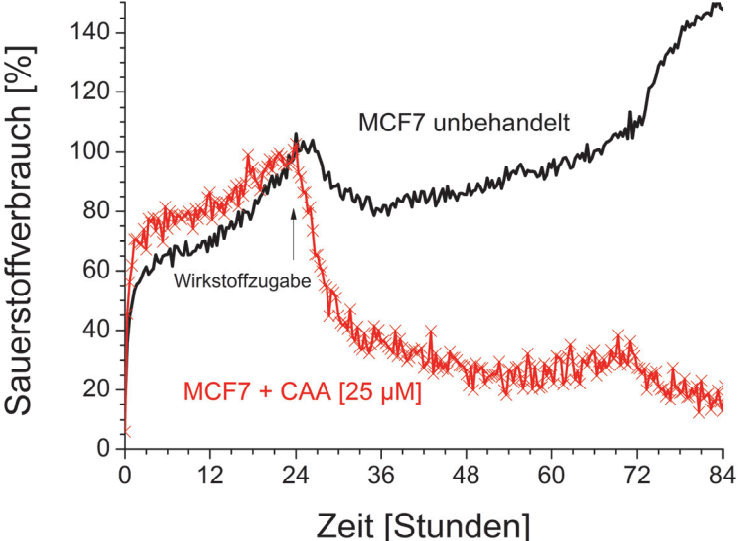
Abb. 2-11: Schematischer Ablauf einer metabolischen Messung an Mammakarzinom-Gewebeprouben

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf von Messungen mit dem IMR-System an Mammakarzinom-Gewebeprouben. Vor der Probenpräparation werden die erforderlichen Vorbereitungen des Messsystems getroffen. Der Start der Messung wird als Stunde 0 definiert. Die Zytostatika-Behandlung beginnt ab Stunde 24 über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Messung wird nach einem Zeitraum von 96 bis 120 Stunden beendet.

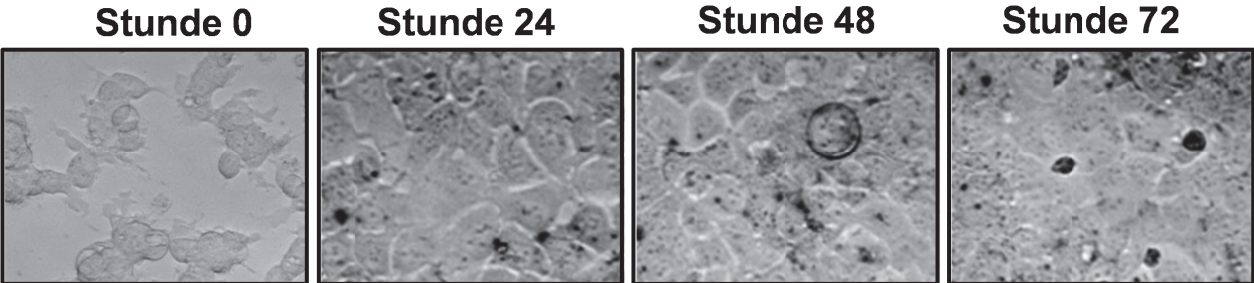
In Abb. 2-12 sind am Beispiel des Sauerstoffverbrauchs die Charakteristika von IMR-Messungen an Zelllinien und humanem Mammakarzinom-Gewebe gegenübergestellt. Typischerweise erfolgt in den ersten Stunden einer IMR-Messung eine Adaption sowohl der Zelllinien als auch des Primärgewebes an die Kulturbedingungen des Messsystems. Um diese Gewöhnung an die veränderten Umgebungsbedingungen zu gewährleisten, erfolgte die Wirkstoffzugabe standardmäßig nach einer Adaptionsphase von 24 Stunden.



a



b



c

Abb. 2-12: Typische Verläufe metabolischer Messungen an Zelllinien und primärem Tumorgewebe

Typische Verläufe von Messungen des Sauerstoffverbrauchs mit dem IMR-System an (a) Mammakarzinom-Gewebe und (b) einer Zelllinie. Innerhalb der ersten 12 bis 24 Stunden erfolgt eine Adaptionsphase an die Messbedingungen. (a) Unbehandelte Mammakarzinom-Gewebeschnitte zeigen einen für Primärgewebe typischen leicht abnehmenden Sauerstoffverbrauch über den Verlauf der Messung. (b) Unbehandelte MCF-7 Zellen gehen im Anschluss an eine Adaptionsphase in eine durch Anstieg des Sauerstoffverbrauchs gekennzeichnete Proliferationsphase über. Die Wirkstoffzugabe resultiert in einer Abnahme des Sauerstoffverbrauchs um 50% bei (a) Gewebeschnitten innerhalb von die 24 Stunden und bei (b) MCF-7 Zellen innerhalb von 4 Stunden. (c) Morphologische Veränderungen von MCF-7 Zellen von der Aussaat bis zum Ende der Messung.

Erkennbar ist die Adaptionsphase von Mammakarzinom-Gewebeschnitten an die Messbedingungen an den Schwankungen des Sauerstoffverbrauchs innerhalb der ersten 24 Stunden der Messung. Unbehandelte Gewebeschnitte zeigen einen konstanten oder leicht abfallenden Sauerstoffverbrauch über den gesamten Messzeitraum (Abb. 2-12a), zurückzuführen auf den grundsätzlichen Vitalitätsverlust von Primärgewebe unter ex vivo Bedingungen²⁰⁴.

Die als Zellsuspension vorliegenden MCF-7 Zellen werden nach der Aussaat in die Messplatte sechs Stunden im Inkubator gehalten. Dieser Zeitraum ist erforderlich, um ein Anheften der Zellen an der Plattenoberfläche zu gewährleisten. Zu Beginn der Messung zeigen die Zellen eine Proliferationsphase, die durch einen stetigen Anstieg der metabolischen und proliferativen Aktivität gekennzeichnet ist. Nach Erreichen eines konfluenten Monolayers verringert sich aufgrund der Kontakt-Inhibition die Proliferationsaktivität der Zellen. In der folgenden, aus dieser Messung jedoch nicht ersichtlichen Plateau-Phase stehen Zellteilung und Zelltod im Gleichgewicht, resultierend in einer geringer ansteigenden oder nahezu konstant bleibenden metabolischen Aktivität der Kulturen (Abb. 2-12b, c). Da die Wirkstoffe manuell und frisch zugegeben werden müssen, und hierfür die Inkubatortür geöffnet werden muss, ändern sich zu Stunde 24 kurzzeitig die Umgebungsbedingungen (Temperatur, Luftfeuchtigkeit, leichte Erschütterungen), auf die Zelllinien metabolisch sensibel reagieren können. Deutlich wird dieses Problem in der kurzzeitigen Verringerung des Sauerstoffverbrauchs von unbehandelten Zellkulturen zu Stunde 24 (Abb. 2-12b).

Die Wirkstoffzugabe zu Zelllinien und Gewebeschnitten zeigt vergleichbare Effekte. Die Hemmung des Sauerstoffverbrauchs als Folge einer Behandlung mit CAA 25 μM tritt bei den als Monolayer vorliegenden MCF-7 Zellen typischerweise schneller ein als bei Mammakarzinom-Gewebeschnitten, obwohl diesen CAA in der doppelten Konzentration [50 μM] zugegeben wurde (Abb. 2-12a, b).

2.4 Chemosensitivitätsanalysen an individuellem humanem Mammakarzinom-Gewebe

Metabolische Messungen an frisch explantiertem, humanem Mammakarzinom-Gewebe wurden mit dem IMR-System nach dem im Abschnitt 5.1.5 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die Wirkstoffzugabe erfolgte standardmäßig 24 Stunden nach Beginn der Messung über einen Zeitraum von 24 Stunden. Anschließend wurden die Proben bis zum Ende der Messung mit wirkstofffreiem Kulturmedium versorgt.

Das Messprotokoll für Gewebeproben entspricht dem für die MCF-7 Zelllinie eingesetzten Protokoll, jedoch mit dem Unterschied, dass eine höhere Wirkstoffkonzentration benötigt wurde, um vergleichbare und deutlich sichtbare metabolische Effekte hervorzurufen (bspw. Gewebeschnitte 50 μM CAA; Zelllinie 25 μM CAA, Abb. 2-12). Aufgrund der benötigten Diffusionsstrecke erreichen Zytostatika tiefer gelegene Gewebeschichten innerhalb eines Schnittes erst mit Verzögerung im Vergleich zu Zelllinien, die ein Monolayer ausbilden und dem Wirkstoff unmittelbar nach der Zugabe ausgesetzt sind. Alle auswertbaren metabolischen Messungen zeigten als Resultat einer CAA-Behandlung vergleichbare Ergebnisse. DOX hat nur auf einen Teil der Proben einen Effekt.

In den folgenden Abbildungen sind Chemosensitivitätstests jeweils einer individuellen Tumorprobe dargestellt.

2.4.1 Dosisabhängigkeit der CAA-Effekte auf die metabolische Aktivität von Mammakarzinom-Gewebe

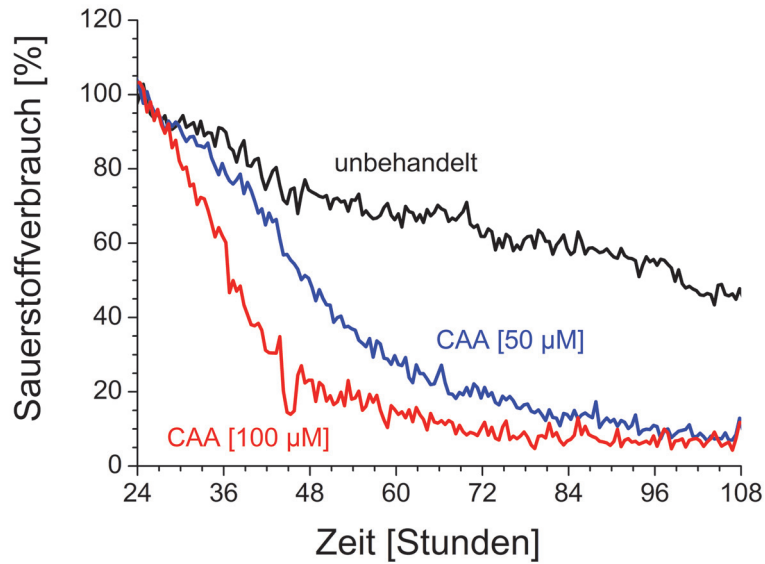
Abb. 2-13 zeigt eine Messung, die die typischen metabolischen Reaktionen der in dieser Arbeit untersuchten Mammakarzinom-Gewebeproben auf eine Behandlung mit CAA darstellt. Die Messdauer betrug 108 Stunden. Unbehandelte Schnitte weisen eine leichte Abnahme in Sauerstoffverbrauch und Ansäuerungsaktivität über den Verlauf der Messung auf. Die Zugabe von CAA [50 oder 100 μM] resultiert, wie auch bei Zelllinien beobachtet, zu einer signifikanten dosisabhängigen Hemmung sowohl von Sauerstoffverbrauch als auch von Ansäuerungsaktivität im Vergleich zu unbehandelten Gewebeschnitten (Abb. 2-13a, b). Die Hemmung des Sauerstoffverbrauchs setzt schneller ein als die der Ansäuerungsaktivität. Die Zugabe von 50 μM CAA führt nach ca. 24 Stunden nach Beginn der Wirkstoffzugabe (Stunde 48 nach Messbeginn) zu einer Abnahme des Sauerstoffverbrauchs um ca. 50%. 48 Stunden nach der Wirkstoffzugabe (72 Stunden nach Beginn der Messung) ist der Sauerstoffverbrauch auf weniger als 20% des Ausgangswerts gesunken. Dieser Wert der metabolischen Aktivität wird in dieser Arbeit als Tod des Gewebes definiert (Abb. 2-13b).

Die Hemmung der Ansäuerungsaktivität durch CAA [50 μM] tritt mit Verzögerung ein. Diese liegt 38 Stunden nach der Wirkstoffzugabe (Stunde 65 nach Beginn der Messung) bei 50% und 54 Stunden nach der Wirkstoffzugabe (Stunde 78 nach Beginn der Messung) bei ca. 20%.

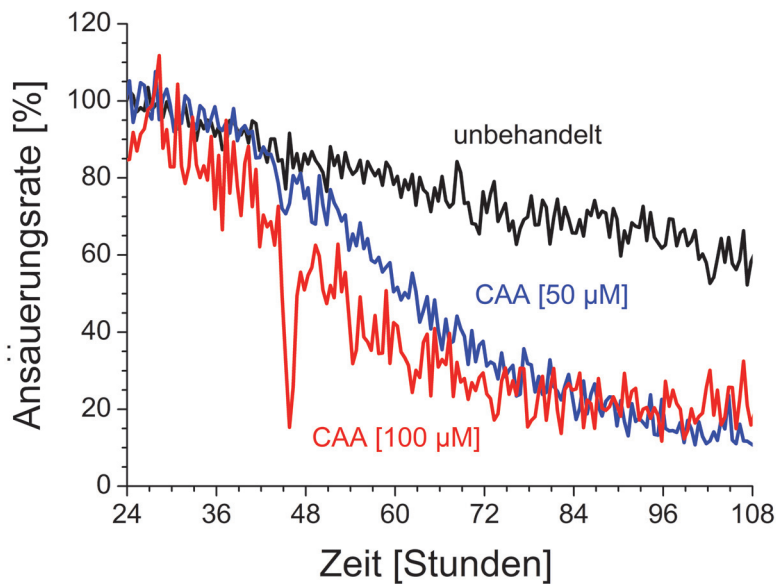
Nach der Zugabe von CAA [100 μM] nimmt der Sauerstoffverbrauch bereits innerhalb der ersten 12 Stunden auf ca. 50% des Ausgangswertes ab (Stunde 36 nach Beginn der Messung). Zu Stunde 65 ist ein Wert von 20% erreicht (Abb. 2-13a). Die Ansäuerungsaktivität ist ca. 24 Stunden nach der

Wirkstoffzugabe (48 Stunden nach Beginn der Messung) auf 50% abgefallen und erreicht nach ca. 48 Stunden (Stunde 72 nach Beginn der Messung) den Wert von 20% (Abb. 2-13b).

Der t-Test bestätigt die Signifikanz der Wirkstoffeffekte auf Sauerstoffverbrauch und Ansäuerungsrate im Vergleich zu unbehandelten Kulturen zu verschiedenen Messzeitpunkten (Abb. 2-13c).



a



b

2 Ergebnisse

Sauerstoffverbrauch			Ansäuerungsrate		
	50 μM	100 μM		50 μM	100 μM
Stunde 36	0,93557	0,44041	Stunde 36	0,64269	0,59957
Stunde 48	0,85194	0,11490	Stunde 48	0,48696	0,83651
Stunde 65	0,21343	0,12747	Stunde 65	0,76318	0,80889
Stunde 72	0,02383	0,01026	Stunde 72	0,00271	0,04700
Stunde 108	0,04828	0,03887	Stunde 108	0,01810	0,01986

c

Abb. 2-13: Konzentrationsabhängige CAA-Effekte auf Sauerstoffverbrauch und Ansäuerungsaktivität einer Mammakarzinom-Gewebeprobe

Dynamische metabolische Veränderungen von Gewebeschnitten einer individuellen Mammakarzinom-Probe nach CAA-Zugabe. Unbehandelte Schnitte zeigen eine leicht abfallende Aktivität des (a) Sauerstoffverbrauchs und der (b) Ansäuerungsaktivität über den Messzeitraum. Die Zugabe von CAA [50 oder 100 μM] erfolgte 24 Stunden nach dem Start der Messung über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Zytostatika-Behandlung resultiert in einer dosisabhängigen Abnahme (a) des Sauerstoffverbrauchs und (b) der Ansäuerungsaktivität der Zellen. Angegeben sind die Stunden nach Testbeginn. Dargestellt sind Mittelwerte gleich behandelter Gewebeschnitten ($n=3$). Die Daten wurden auf den Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe normiert. (c) Der t-Test bestätigt die Signifikanz der Wirkungseffekte auf die metabolische Aktivität im Vergleich zu unbehandelten Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten. *grün*: Unterschied zu unbehandelten Proben signifikant ($p<0,05$). *schwarz*: Unterschied zu unbehandelten Proben nicht signifikant ($p>0,05$).

2.4.2 Individuelle metabolische Reaktionen von Mammakarzinom-Proben auf CAA und DOX

In den mit dem IMR durchgeführten Experimenten wurden die individuellen Reaktionen von Mammakarzinom-Proben auf verschiedene Zytostatika untersucht. Hierfür wurde ein Teil der Gewebeschnitte einer Mammakarzinom-Probe mit CAA, weitere Schnitte mit DOX oder gar nicht behandelt. Die untersuchten Mammakarzinom-Gewebeprobe zeigen unterschiedlich stark ausgeprägte Reaktionen auf DOX (Abb. 2-14, Abb. 2-15, Abb. 2-16). Bei allen untersuchten Proben konnte jedoch eine rasche metabolische Reaktion auf eine CAA-Zugabe beobachtet werden. Dies ist ein Hinweis, dass die in einigen Messungen nicht vorhandenen metabolischen Reaktionen auf DOX nicht auf methodische Fehler zurück zu führen sind.

Abnahme des Sauerstoffverbrauchs als Folge einer DOX-Behandlung

In Abb. 2-14 dargestellt ist eine der ersten Messungen an humanen Mammakarzinom-Gewebeprobe. Aufgrund des noch nicht optimalen Präparationsprotokolls waren für jede Messbedingung jeweils nur zwei auswertbare Gewebeschnitte vorhanden. Dargestellt sind nicht normierte Daten. Erkennbar ist die unterschiedlich hohe metabolische Aktivität der einzelnen Schnitte zu Beginn der Messung, resultierend aus unterschiedlichen Zellzahlen der für diese Messung manuell hergestellten Gewebeschnitte. Dieses Problem konnte durch die spätere Verwendung eines Vibratoms zur Herstellung reproduzierbarer Schnittdicken deutlich verringert werden.

Als Folge einer Behandlung mit 5 μM DOX zeigen die Gewebeschnitte eine deutliche Abnahme des Sauerstoffverbrauchs bis hin zum Absterben. Im Vergleich hierzu bleibt der Sauerstoffverbrauch un behandelter Tumorschnitte über den Verlauf der Messung konstant. Hieraus lässt sich tendenziell eine Chemosensitivität der behandelten Mammakarzinom-Gewebeschnitte gegenüber dem Wirkstoff DOX erkennen. Für diese Probe sind nur Daten des Sauerstoffverbrauchs vorhanden, auch eine Zugabe von CAA, sowie eine statistische Auswertung konnten aufgrund einer zu geringen Anzahl an verfügbaren vitalen Gewebeschnitten nicht durchgeführt werden.

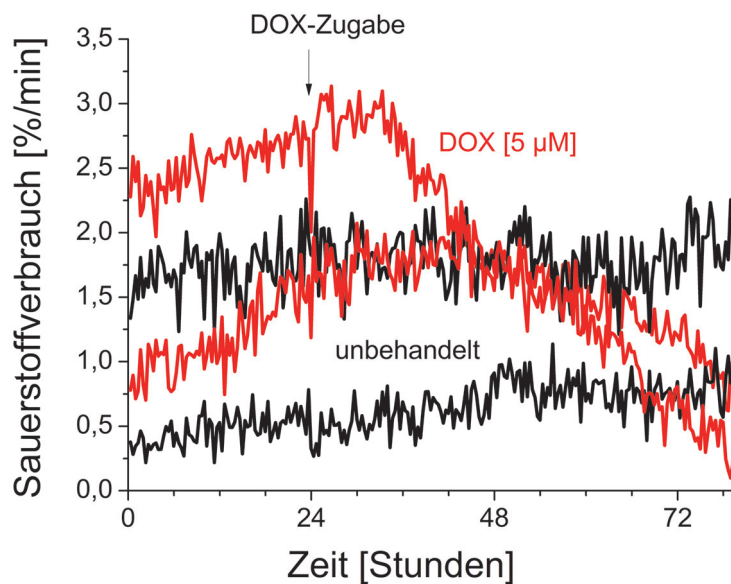


Abb. 2-14: DOX induzierte Hemmung des Sauerstoffverbrauchs einer Mammakarzinom-Gewebeprobe

Dynamische metabolische Veränderungen von Gewebeschnitten einer individuellen Mammakarzinom-Probe nach DOX-Zugabe. Unbehandelte Schnitte zeigen eine gleichbleibende Sauerstoffverbrauchsrate über den Verlauf der Messung. Die Zugabe von DOX [5 μM] erfolgte 24 Stunden nach dem Start der Messung über einen Zeitraum von 24 Stunden. Dies resultiert in einer Abnahme des Sauerstoffverbrauchs bis hin zum Zelltod. Angegeben sind die Stunden nach Testbeginn. Dargestellt sind nicht normierte Daten der metabolischen Aktivität der einzelnen Gewebeschnitte für jede Messbedingung ($n=2$).

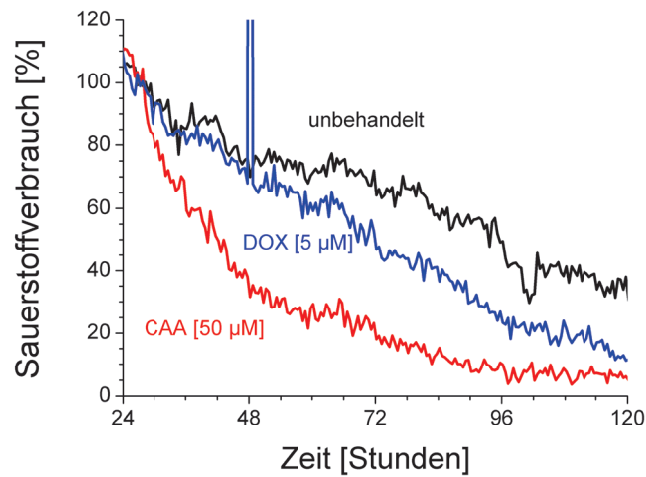
Abnahme der metabolischen Aktivität als Folge einer CAA-Behandlung und geringe Reaktion auf DOX

Unbehandelte Schnitte der in Abb. 2-15 dargestellten Probe zeigten eine Verringerung des Sauerstoffverbrauchs bei einer leichten Verringerung der Ansäuerungsaktivität über den Messzeitraum von 132 Stunden.

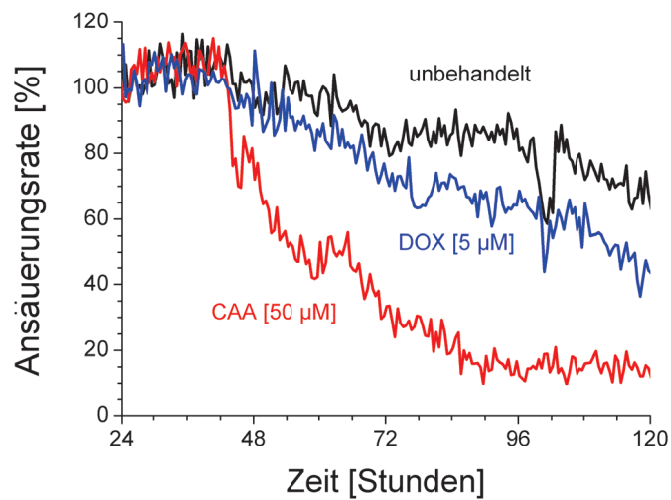
Die 5 μM DOX-Zugabe zeigt nur eine geringe, für die Ansäuerungsaktivität nicht signifikante Wirkung (Abb. 2-15b, c). Der Sauerstoffverbrauch wird ab Stunde 72 (Stunde 96 nach Messbeginn) durch DOX signifikant gehemmt (Abb. 2-15a). Die Zugabe von CAA [50 μM] resultiert in einer schnellen Abnahme des Sauerstoffverbrauchs innerhalb von 12 Stunden (Stunde 36 nach Messbeginn) auf 50% des Ausgangswertes (Abb. 2-15a). Die Ansäuerungsaktivität erreicht diesen Wert 24 Stunden nach Beginn

2 Ergebnisse

der Wirkstoffzugabe (Stunde 48 nach Messbeginn) (Abb. 2-15b). Der Basiswert von 20% wird für Sauerstoffverbrauch und Ansäuerungsaktivität ca. 48 Stunden nach der CAA-Zugabe erreicht (Stunde 72 nach Messbeginn).



a



b

Sauerstoffverbrauch

	CAA [50 µM]	DOX [5 µM]
Stunde 36	0,03250442	0,68681067
Stunde 42	0,00215481	0,34851078
Stunde 48	0,00166258	0,39750273
Stunde 72	0,00020273	0,12119216
Stunde 96	0,00443773	0,02271579
Stunde 120	0,00499549	0,00879768

Ansäuerungsrate

	CAA [50 µM]	DOX [5 µM]
Stunde 36	0,62774525	0,35885442
Stunde 42	0,76089118	0,4254685
Stunde 48	0,06219501	0,51591942
Stunde 72	0,00189694	0,31559064
Stunde 96	0,00023233	0,19305824
Stunde 120	0,00129444	0,16424779

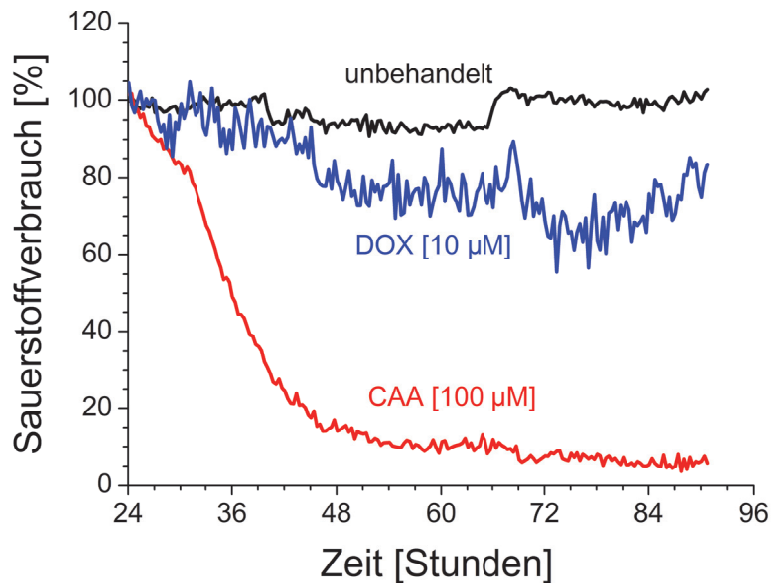
c

Abb. 2-15: DOX induzierte geringe Hemmung des Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerungsrate einer Mammakarzinom-Probe

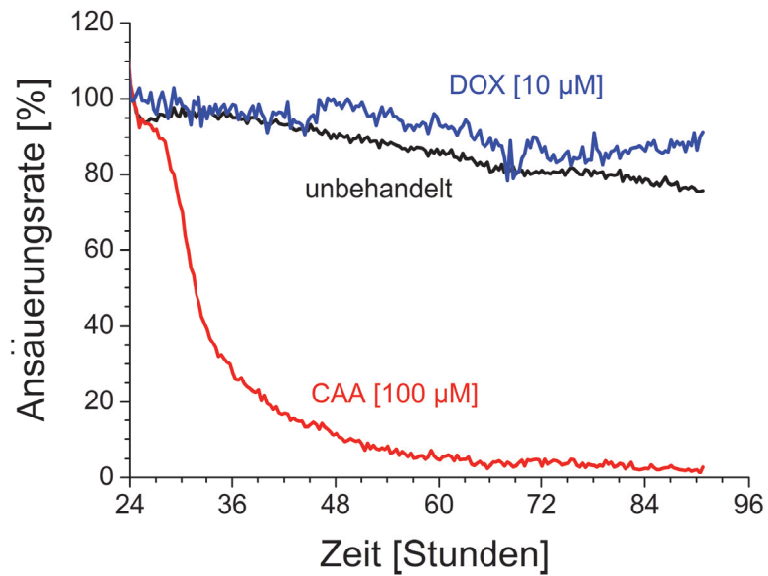
Dynamische Veränderungen der metabolischen Aktivität von Gewebeschnitten einer individuellen Mammakarzinom-Probe nach CAA- oder DOX-Zugabe. Unbehandelte Schnitte zeigen einen deutlich abfallenden (a) Sauerstoffverbrauch und eine leicht abfallende (b) Ansäuerungsaktivität über den Messzeitraum. Die Zugabe von CAA [50 μM] oder DOX [5 μM] erfolgte 24 Stunden nach dem Start der Messung über einen Zeitraum von 24 Stunden. Als Folge der CAA-Zugabe erfolgt eine rasche Abnahme (a) des Sauerstoffverbrauchs und (b) der Ansäuerungsaktivität. Die Zugabe von DOX resultiert in einer geringen Verringerung der metabolischen Aktivität im Vergleich zu unbehandelten Gewebeschnitten. Angegeben sind die Stunden nach Testbeginn. Dargestellt sind Mittelwerte gleich behandelter Gewebeschnitte (n=5). Die Daten wurden auf den Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe normiert. (c) Der t-Test bestätigt die Signifikanz der Wirkstoffeffekte auf die metabolische Aktivität im Vergleich zu unbehandelten Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten. *grün*: Unterschied zu unbehandelten Proben signifikant ($p < 0,05$). *schwarz*: Unterschied zu unbehandelten Proben nicht signifikant ($p > 0,05$).

Abnahme der metabolischen Aktivität als Folge einer CAA-Behandlung, jedoch nicht signifikante Reaktion auf DOX

Da das in Abb. 2-15 dargestellte Mammakarzinom-Gewebe keine eindeutige Reaktion auf die Zugabe von DOX [5 μM] gezeigt hat, wurden die Gewebeschnitte der in Abb. 2-16 dargestellten Probe mit einer höheren Konzentration des Zytostatikums [DOX 10 μM] behandelt, um eine möglicherweise zu geringe Wirkstoffkonzentration zur Erzielung metabolischer Effekte auszuschließen. Diese Probe reagiert mit einer leichten, jedoch signifikanten Hemmung des Sauerstoffverbrauchs (Abb. 2-16a, c). Im Gegensatz dazu zeigt die Ansäuerungsaktivität im Vergleich zu unbehandelten Gewebeschnitten einen leichten Anstieg (Abb. 2-16b). Die CAA-Zugabe [100 μM] resultiert in einer starken und schnellen Reaktion des Zellmetabolismus. Der Sauerstoffverbrauch nimmt innerhalb von ca. 12 Stunden (Stunde 36 nach Messbeginn) um die Hälfte ab (Abb. 2-16a). Bei dieser Probe tritt die Hemmung der Ansäuerungsaktivität im Vergleich zum Sauerstoffverbrauch etwas schneller ein (Abb. 2-16b). Innerhalb von ca. acht Stunden nach der Wirkstoffzugabe (Stunde 32 nach Messbeginn) erreicht die Ansäuerungsaktivität 50% des Ausgangswertes. Sowohl Sauerstoffverbrauch als auch Ansäuerungsaktivität erreichen einen Wert von 20% nach ca. 18 Stunden (Stunde 42 nach Messbeginn) (Abb. 2-16a, b). Unbehandelte Gewebeschnitte dieser Probe zeigen gleichbleibende und stabile Aktivität von Sauerstoffverbrauch und Ansäuerungsaktivität über den Messzeitraum.



a



b

Sauerstoffverbrauch			Ansäuerungsrate		
	CAA [100 µM]	DOX [10 µM]		CAA [100 µM]	DOX [10 µM]
Stunde 30	0,18333017	0,82474500	Stunde 30	0,07162765	0,86400069
Stunde 42	0,00006418	0,47342125	Stunde 42	0,00218325	0,40028385
Stunde 48	0,00059761	0,20589771	Stunde 48	0,00018814	0,58070059
Stunde 72	0,00000583	0,18204122	Stunde 72	0,00000132	0,49097928
Stunde 90	0,00000521	0,16090425	Stunde 90	0,00000869	0,56788274

c

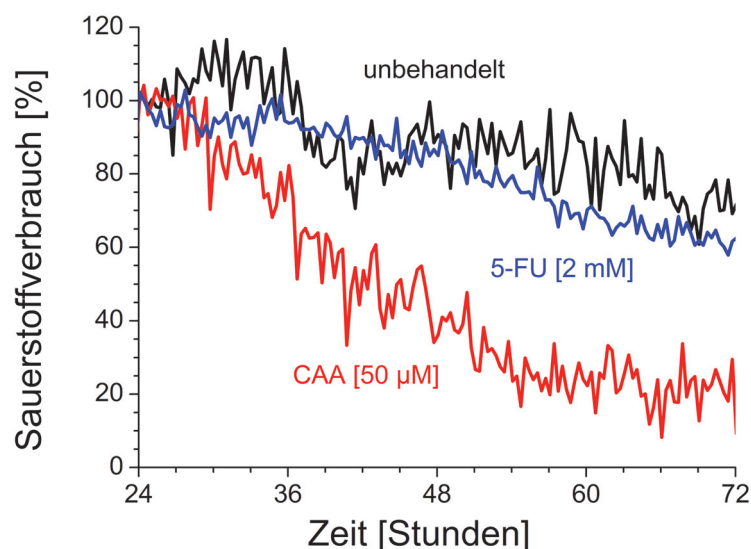
Abb. 2-16: Nicht signifikante DOX induzierte Hemmung des Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerungsrate einer Mammakarzinom-Probe

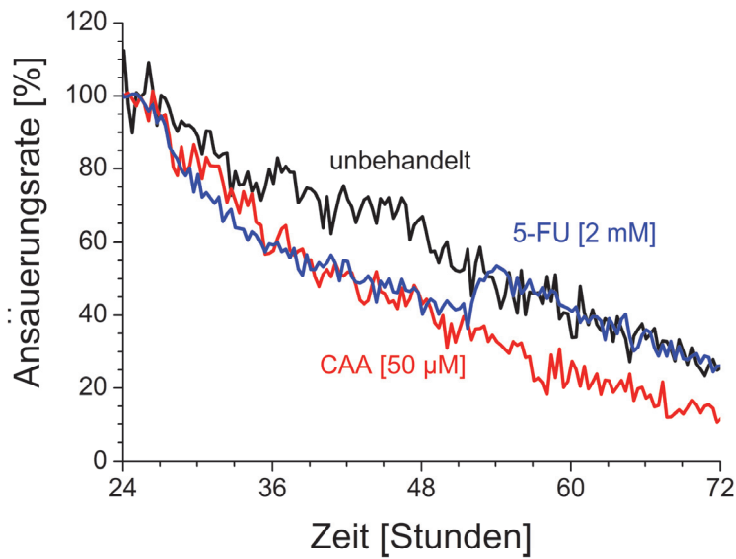
Dynamische Veränderungen des Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerungsaktivität von Gewebeschnitten einer individuellen Mammakarzinom-Probe nach CAA- oder DOX-Zugabe. Unbehandelte Schnitte zeigen gleichbleibende (a) Sauerstoffverbrauchs- und (b) Ansäuerungsraten über den Messzeitraum. Die Zugabe von CAA [100 μ M] oder DOX [10 μ M] erfolgte 24 Stunden nach dem Start der Messung über einen Zeitraum von 24 Stunden. Als Folge der CAA-Zugabe erfolgt eine rasche Abnahme (a) des Sauerstoffverbrauchs und (b) der Ansäuerungsaktivität. Die Zugabe von DOX resultiert in einer nicht signifikanten Verringerung des Sauerstoffverbrauchs und zu einem nicht signifikanten Anstieg der Ansäuerungsaktivität. Angegeben sind die Stunden nach Testbeginn. Dargestellt sind Mittelwerte gleich behandelter Gewebeschnitte (n=4). Die Daten wurden auf den Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe normiert. (c) Der t-Test bestätigt die Signifikanz der Wirkstoffeffekte auf die metabolische Aktivität im Vergleich zu unbehandelten Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten. *grün*: Unterschied zu unbehandelten Proben signifikant ($p < 0,05$). *schwarz*: Unterschied zu unbehandelten Proben nicht signifikant ($p > 0,05$).

Keine metabolische Reaktion auf die Zugabe von 5-FU

Die in Abb. 2-17 dargestellte Mammakarzinom-Probe zeigt eine signifikante Abnahme des Sauerstoffverbrauchs als Folge der Zugabe von CAA [50 μ M]. Ca. 18 Stunden nach der Wirkstoffzugabe (42 Stunden nach Beginn der Messung) fallen Sauerstoffverbrauch und Ansäuerungsaktivität um die Hälfte ab. Jedoch zeigen unbehandelte Gewebeschnitte für die Ansäuerungsaktivität im Vergleich eine ebenso starke Abnahme (Abb. 2-17b). Die Zugabe von 5-FU resultiert in keinen signifikanten Änderungen des Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerungsaktivität im Vergleich zu unbehandelten Gewebeschnitten (Abb. 2-17a, b, c).

Die Ansäuerungsaktivität unbehandelter Gewebeschnitte fällt über den Verlauf der Messung auf einen Minimum-Wert von 20% der Aktivität zum Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe ab und lässt den Wirkstoffeffekt (CAA) somit als nicht signifikant erscheinen und ist somit schwer interpretierbar (Abb. 2-17c). Der Sauerstoffverbrauch der unbehandelten Gewebeschnitte nimmt jedoch nur gering über den Verlauf der Messung ab.

**a**



b

Sauerstoffverbrauch

	CAA [50 µM]	5FU [2 mM]
Stunde 42	0,16216533	0,51457098
Stunde 48	0,04948641	0,29255977
Stunde 72	0,04087051	0,18473985

Ansäuerungsrate

	CAA [50 µM]	5FU [2 mM]
Stunde 42	0,01261488	0,01448754
Stunde 48	0,27222759	0,15196348
Stunde 72	0,01142505	0,70778059

c

Abb. 2-17: Nicht signifikante 5-FU induzierte Hemmung des Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerungsrate einer Mammakarzinom-Probe

Dynamische Veränderungen des Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerungsaktivität von Gewebeschnitten einer individuellen Mammakarzinom-Probe nach 5-FU- oder CAA-Zugabe. Unbehandelte Schnitte zeigen eine leichte Abnahme des (a) Sauerstoffverbrauchs und eine starke Abnahme der (b) Ansäuerungsrate über den Messzeitraum. Die Zugabe von 5-FU [2 mM] oder CAA [50 µM] erfolgte 24 Stunden nach dem Start der Messung über einen Zeitraum von 24 Stunden. Als Folge der CAA-Zugabe erfolgt eine rasche Abnahme (a) des Sauerstoffverbrauchs jedoch keiner signifikanten Hemmung (b) der Ansäuerungsaktivität. Die Zugabe von 5-FU resultiert in keiner signifikanten Veränderung der metabolischen Aktivität. Angegeben sind die Stunden nach Testbeginn. Dargestellt sind Mittelwerte gleich behandelter Gewebeschnitte (n=4). Die Daten wurden auf den Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe normiert. (c) Der t-Test bestätigt die Signifikanz der Wirkstoffeffekte auf die metabolische Aktivität im Vergleich zu unbehandelten Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten. *grün*: Unterschied zu unbehandelten Proben signifikant ($p < 0,05$). *schwarz*: Unterschied zu unbehandelten Proben nicht signifikant ($p > 0,05$).

2.5 Metabolische und morphologische Effekte von Zytostatika auf MCF-7 Zellen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Validierung der Messergebnisse von humanem Mammakarzinom-Gewebe. Hierfür wurden parallel zu den Messungen an humanem Mammakarzinom-Gewebe metabolische Messungen an der MCF-7 Zelllinie mit dem IMR-System unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt.

Um die Ergebnisse der metabolischen Messungen mit dem IMR-System zu validieren, wurden diese anhand der Ergebnisse herkömmlicher Methoden verglichen. Herkömmliche Methoden konnten jedoch aufgrund der geringen Menge an verfügbarem Tumorgewebe nicht an Mammakarzinom-Proben, sondern nur an der MCF-7 Zelllinie durchgeführt werden. Wirkungseffekte auf die adherenten Zellen konnten somit anhand unterschiedlicher zellulärer Parameter analysiert und die Ergebnisse validiert werden. Die verwendeten Methoden und deren Messparameter sind in Abb. 2-18 dargestellt.

Die Bestimmung der Zellzahl gibt Aufschluss über die Teilungsaktivität und die Lichtmikroskopischen Aufnahmen über Veränderungen der Zellmorphologie als Resultat einer Wirkstoffzugabe. Problematisch bei der Interpretation des Resazurintests ist, dass nicht eindeutig nachgewiesen ist, ob neben mitochondrialen Dehydrogenasen¹⁰⁴ noch weitere unbekannte intrazelluläre Mechanismen den Farbstoff umsetzen. Aus diesem Grund kann keine direkte Aussage über mitochondriale Aktivität und Zellvitalität getroffen werden. In dieser Arbeit wurde der Resazurintest lediglich zu einer Abschätzung der Vitalität von Zellen eingesetzt.

Die humane MCF-7 Zelllinie wurde 1970 aus dem Pleuraerguss eines Adenokarzinoms der Brust einer 69-jährigen Patientin gewonnen. Die epithelialen, adherent als Monolayer wachsenden Zellen besitzen einen hohen Differenzierungsgrad und sind Östrogenrezeptor-positiv²⁰⁵.

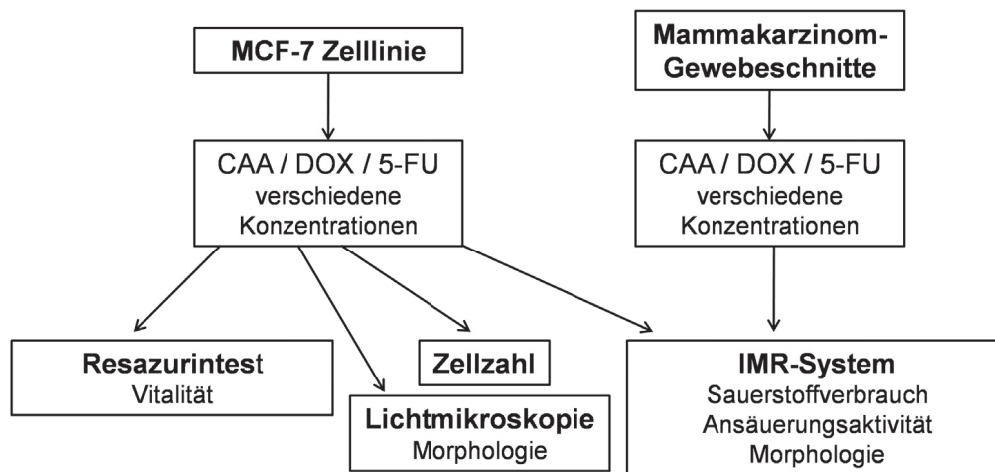


Abb. 2-18: Übersicht der verwendeten Testmethoden und Testparameter von Messungen an MCF-7 Zellen und Mammakarzinom-Gewebe

Ziel der Experimente war die Validierung der Ergebnisse des IMR-Systems anhand herkömmlicher Methoden und Zelllinien. Diese wurden mit den IMR-Testergebnissen an humanen Mammakarzinom-Gewebeproben verglichen. Aufgrund der geringen Menge an verfügbarem Tumormaterial konnte Mammakarzinom-Gewebe nicht mit herkömmlichen Methoden untersucht werden.

Die Testdurchführung erfolgte bei allen Experimenten wie im Material und Methodenteil im Abschnitt 0 beschrieben. Für die Chemosensitivitätstests wurden die Zytostatika Chloracetaldehyd (CAA), Doxorubicin (DOX) und 5-Fluoruracil (5-FU) verwendet, die derzeit als die wichtigsten Wirkstoffe bei der Mammakarzinom-Behandlung gelten. Für jedes Zytostatikum wurden Dosis-Wirkungsanalysen durchgeführt. Die Wirkstoffzugabe erfolgte, sowohl mit herkömmlichen Methoden als auch mit dem IMR-System, nach einer 24-stündigen Vorinkubationszeit der Proben. Anschließend erfolgte eine Zytostatika-Zugabe über einen Zeitraum von 24 Stunden. Bis zum Ende der Messung wurden die Zellen dann mit wirkstofffreiem Kulturmedium versorgt.

2.5.1 Dosisabhängigkeit der CAA-Effekte auf Metabolismus und Morphologie

CAA-Effekte auf Vitalität, Morphologie und Zellzahl von MCF-7 Zellen, gemessen mit Standardmethoden

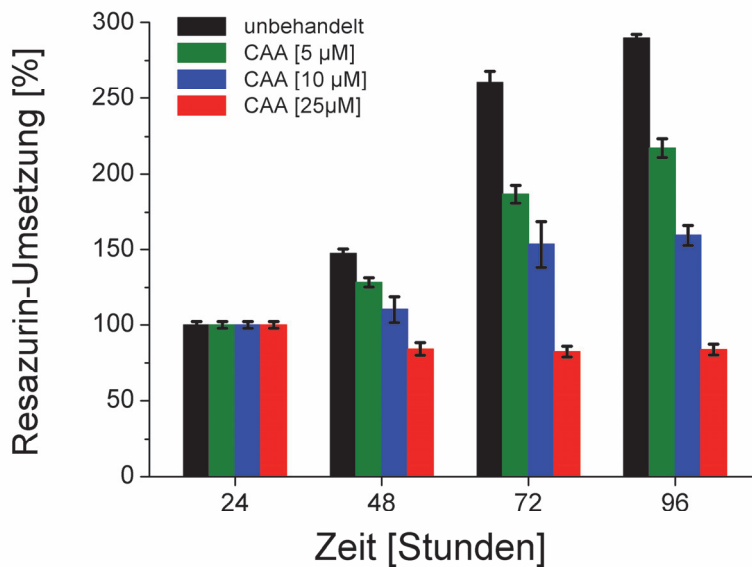
Für die Tests mit herkömmlichen Methoden wurden MCF-7 Zellen gemäß Protokoll ausgesät und sechs Stunden lang vorinkubiert. Es folgte die Zugabe verschiedener Konzentrationen der Zytostatika CAA, DOX und 5-FU. Die Vitalität (abgeschätzt mit dem Resazurintest), die Lebend-Zellzahl (gemessen mit einem Zellzählgerät) und Morphologie (analysiert anhand manueller Lichtmikroskopie) wurden im Abstand von 24 Stunden vor, während und nach der Wirkstoffzugabe bestimmt. Da das Mammakarzinom-Gewebe nicht in einer ausreichend großen Menge zur Verfügung stand, konnten diese Endpunktmessungen nur an Zelllinien durchgeführt werden.

Unbehandelte Zellen heften sich im Verlauf der Messung flach an die Zellkulturplatten-Oberfläche an und bilden über den Verlauf der Messung ein konfluentes Monolayer aus. Aufgrund ihrer Kontaktinhibition nimmt die Zellzahl von diesem Zeitpunkt an nicht weiter zu, Proliferation und Apoptose stehen im Gleichgewicht (Abb. 2-19a). Über den 72 stündigen Verlauf nehmen die Resazurin-Umsetzung (Abb. 2-19a) und Zellzahl (Abb. 2-19b) insgesamt um ca. das Dreifache zu.

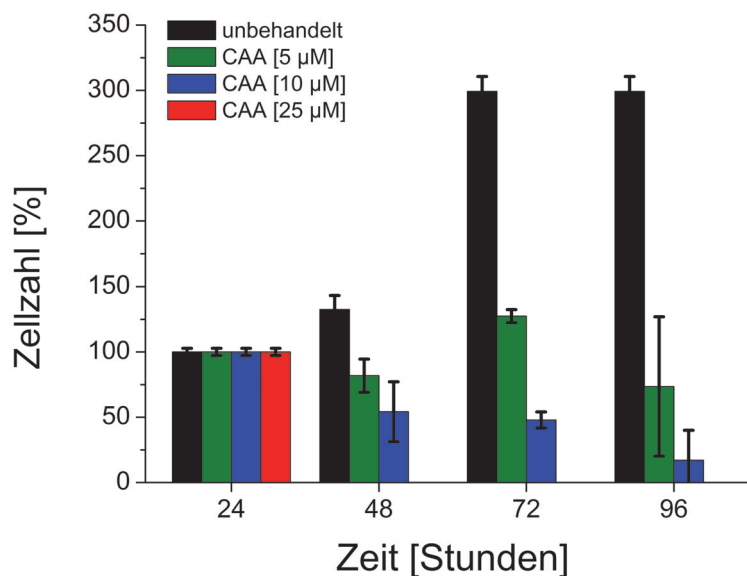
Die Zugabe von 5 μM CAA resultiert in einer leichten Hemmung der Resazurin-Umsetzung im Vergleich zu unbehandelten Kulturen. Die Resazurin-Umsetzung steigt im Verlauf der Messung um das 2,3-fache an (Abb. 2-19b). Anhand der Zellzahlbestimmung und der lichtmikroskopischen Aufnahmen wird deutlich, dass die mit 5 μM CAA behandelten Zellen kaum Proliferations-Aktivität aufweisen (Abb. 2-19b, d). Die Zugabe von 10 μM CAA resultiert in einer deutlichen Hemmung der metabolischen Aktivität. So kommt es im Verlauf der Messung zu einem Anstieg um das 1,5-fache der Resazurin-Umsetzung im Vergleich zu dem Ausgangswert zum Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe (Abb. 2-19a). Im Gegensatz hierzu fällt die Zahl an lebenden Zellen schon innerhalb der ersten 24 Stunden um die Hälfte ab, danach erfolgt eine weitere stetige Abnahme der Zellzahl bis am Ende der Messung nur noch 25% der anfänglichen Zellzahl vorhanden ist (Abb. 2-19b). Bereits 24 Stunden nach der Wirkstoffzugabe zeigen die Bildaufnahmen eine Abnahme der Lebend-Zellzahl, begleitet von Veränderungen der Zellmorphologie. Es kommt zu einem Verlust der Zell-Zell-Kontakte, Veränderung der intrazellulären Granulierung und im weiteren Verlauf der Messung zu einem teilweisen Ablösen der Zellen von der Plattenoberfläche. Dies ist charakteristisch für ein Absterben von Zellen als Folge der Wirkstoffzugabe (Abb. 2-19d). Es sind jedoch vereinzelt Zellteilungen zu beobachten. Die Behandlung mit 25 μM CAA resultiert in einem Abfall der metabolischen Aktivität auf ca. 80% des Ausgangswertes

schon innerhalb der ersten 24 Stunden nach Beginn der Wirkstoffzugabe (Stunde 48 nach Messbeginn). Bis zum Ende der Messung bleibt die metabolische Aktivität konstant (Abb. 2-19a). Die Bildaufnahmen zeigen die Abnahme der Zellzahl bereits nach 24 Stunden (Abb. 2-19d). Die Bestimmung der Lebend-Zellzahl liefert, möglicherweise aufgrund Probleme bei der Testdurchführung, keine verwertbaren Daten (Abb. 2-19b).

Aus dem in Abb. 2-19 c dargestellten Student's t-Test geht hervor, dass bereits 24 Stunden nach der Zugabe von CAA (Stunde 48 nach Messbeginn) die metabolische Aktivität sowie die Zellzahl bei allen eingesetzten Konzentrationen (5, 10, 25 μM) signifikant abfallen. Die beschriebenen Ergebnisse konnten in drei unabhängigen Experimenten reproduziert werden.



a

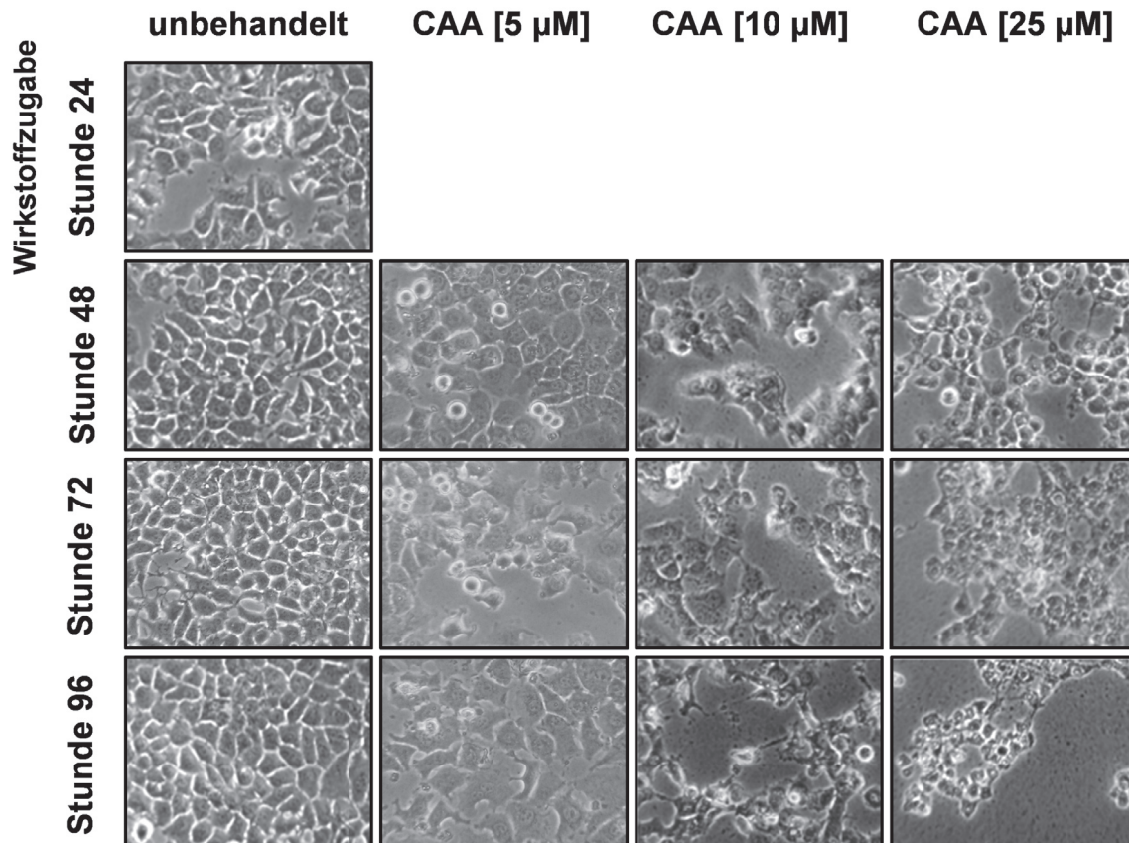


b

2 Ergebnisse

Resazurin-Umsetzung				Zellzahl			
	5 μM	10 μM	25 μM		5 μM	10 μM	25 μM
Stunde 48	0,00474	0,01162	0,00005	Stunde 48	0,00943	0,00212	0,00381
Stunde 72	0,00895	0,00409	0,00324	Stunde 72	0,01076	0,00577	0,00429
Stunde 96	0,00355	0,00019	0,00005	Stunde 96	0,00180	0,00440	0,00429

c



d

Abb. 2-19: CAA-Effekte auf Vitalität, Zellzahl und der Morphologie der MCF-7 Zelllinie gemessen mit herkömmlichen Methoden

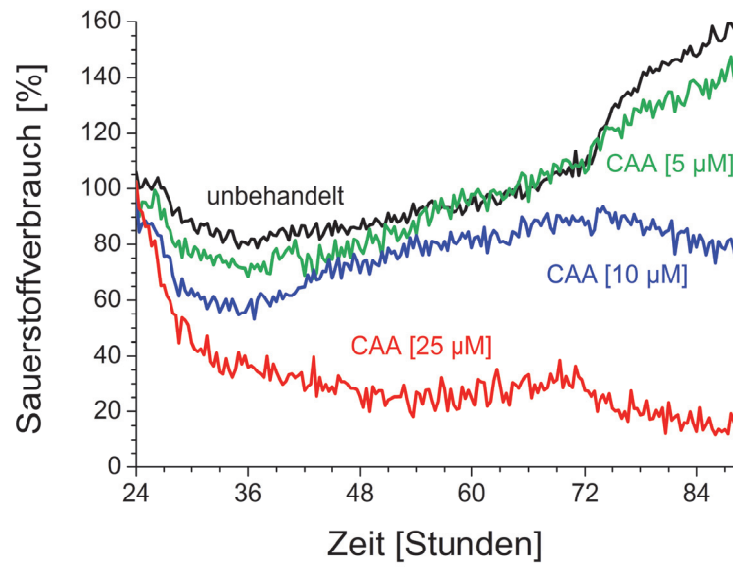
CAA-Effekte auf verschiedene zelluläre Parameter zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Wirkstoffzugabe. Angegeben sind die Stunden nach Testbeginn. Die Zugabe von CAA [5, 10, 25 μM] erfolgte 24 Stunden nach Start des Experiments über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Daten wurden auf den Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe normiert. Dargestellt ist jeweils die Standardabweichung jeder Testbedingung (n=3). Die Zugabe von CAA resultiert in einer konzentrationsabhängigen Abnahme (a) der Umsetzung von Reszurin, (b) der Zellzahl und (d) Veränderungen der Morphologie (Lichtmikroskop, Vergrößerung 100-fach). (c) Der t-Test bestätigt die Signifikanz der Wirkstoffeffekte im Vergleich zu unbehandelten Kulturen. *grün*: Unterschied zu unbehandelten Proben signifikant ($p < 0,05$). *schwarz*: Unterschied zu unbehandelten Proben nicht signifikant ($p > 0,05$).

CAA-Effekte auf Sauerstoffverbrauch, Ansäuerungsaktivität und Morphologie von MCF-7 Zellen gemessen mit dem IMR-System

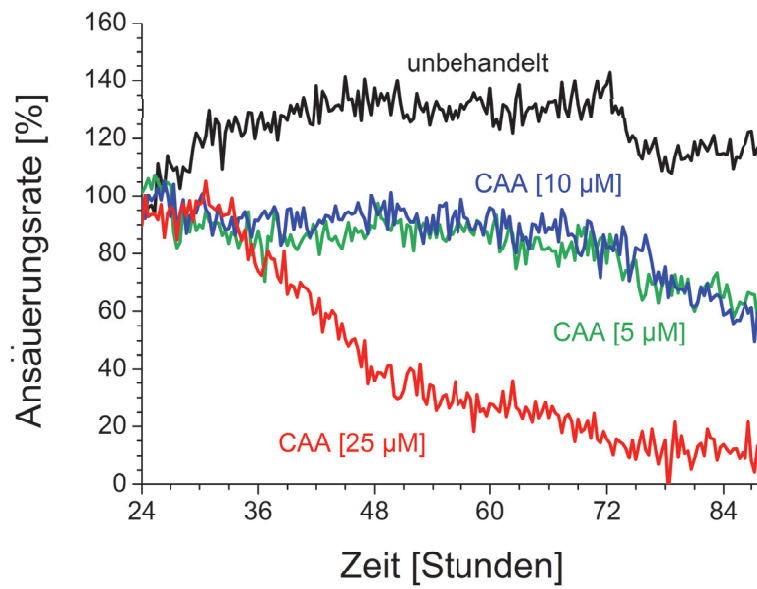
Das multiparametrische sensorbasierte IMR-System bietet im Vergleich zu den beschriebenen herkömmlichen Methoden den Vorteil markerfreier Messungen und ermöglicht somit einen direkten und zeitaufgelösten Vergleich unterschiedlicher zellulärer Parameter einer Probe. Die Vitalität wurde anhand des Sauerstoffverbrauchs aus dem Kulturmedium und der Ansäuerung des Mediums bestimmt. Parallel wurden lichtmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

Unbehandelte MCF-7 Zellkulturen zeigen in der dargestellten Messung über den gesamten Messzeitraum eine stetige Zunahme des Sauerstoffverbrauchs um ca. das 1,4-fache (Abb. 2-20a), die Ansäuerungsrate bleibt annähernd konstant (Abb. 2-20b). Die Kulturen zeigen die typische Morphologie von MCF-7 Zellen. Die Zellen heften flach an der Oberfläche an und bilden Zell-Zell-Kontakte aus. Im Verlauf der Messung bildet sich durch die hohe Proliferationsaktivität der Zellen ein konfluentes Monolayer. Ist dies erreicht, kommt es aufgrund der Kontaktinhibition der Zellen untereinander nur noch vereinzelt zu Zellteilungen. Dieser Effekt ist in den Bildaufnahmen (Abb. 2-20d) durch das Erreichen einer Plateau-Phase, in der eine lediglich geringe Zunahme von Sauerstoffverbrauch und Ansäuerungsaktivität zu sehen ist, gekennzeichnet. Das Absterben von Zellen und die Proliferation sind zu diesem Zeitpunkt im Gleichgewicht.

24 Stunden nach Start der Messung wurde zu einem Teil der Wells das Zytostatikum CAA in Konzentrationen von 5, 10 oder 25 μM für einen Behandlungszeitraum von 24 Stunden zugegeben. Die Zugabe von 5 μM CAA resultiert in einer sichtbaren, jedoch nicht signifikanten Hemmung des Sauerstoffverbrauchs aber einer signifikanten Hemmung der Ansäuerungsaktivität 24 Stunden nach Beginn der Wirkstoffzugabe (Stunde 48 nach Messbeginn) (Abb. 2-20c). Die Ausbildung eines konfluenten Monolayers über den Verlauf der Messung wird nicht beeinträchtigt. Desweiteren zeigt die Zellmorphologie keine lichtmikroskopisch sichtbaren Unterschiede zu unbehandelten Proben (Abb. 2-20d). Die Zugabe einer Konzentration von 10 μM CAA führt in der IMR-Messung zu einer Hemmung der metabolischen Aktivität. Es sind konstant bleibender Sauerstoffverbrauch und Ansäuerungsaktivität bis Stunde 72 zu erkennen (Abb. 2-20a, b). Ab diesem Zeitpunkt nimmt der Sauerstoffverbrauch bis zum Ende der Messung auf 80% des zum Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe gemessenen Wertes ab. Die anfangs stabile Ansäuerungsrate sinkt ab diesem Zeitpunkt bis zum Ende der Messung auf 60%. Die hemmenden Effekte von 10 μM unterscheiden sich nach 48 Stunden nach Wirkstoffzugabe signifikant von der metabolischen Aktivität unbehandelter Proben (Abb. 2-20c). Trotz der Zugabe von 10 μM CAA bilden die Zellen ein konfluentes Monolayer aus, ab 48 Stunden nach Wirkstoffzugabe werden Veränderungen der Zellmorphologie sichtbar. Zellen verlieren ihre Zell-Zell-Kontakte untereinander, kugeln sich ab und lösen sich vom Substrat. Kurz vor dem Ende der Messung (Stunde 90) haben sich viele Zellen von der Plattenoberfläche abgelöst und werden durch den Pipettiervorgang des IMR-Systems aus dem Well ausgespült. Als metabolische Reaktion auf die Zugabe von 25 μM CAA zeigt sich innerhalb von sechs Stunden nach Wirkstoffzugabe (Stunde 30 nach Messbeginn) eine starke Abnahme des Sauerstoffverbrauchs auf ca. 50% des Ausgangswerts (Abb. 2-20a). Aus den Bildaufnahmen werden jedoch zu diesem Zeitpunkt keine morphologischen Veränderungen deutlich. Die Zellen zeigen die ursprüngliche Morphologie, Zell-Zell-Kontakte untereinander sowie ein konfluentes Monolayer (Abb. 2-20d).



a



b

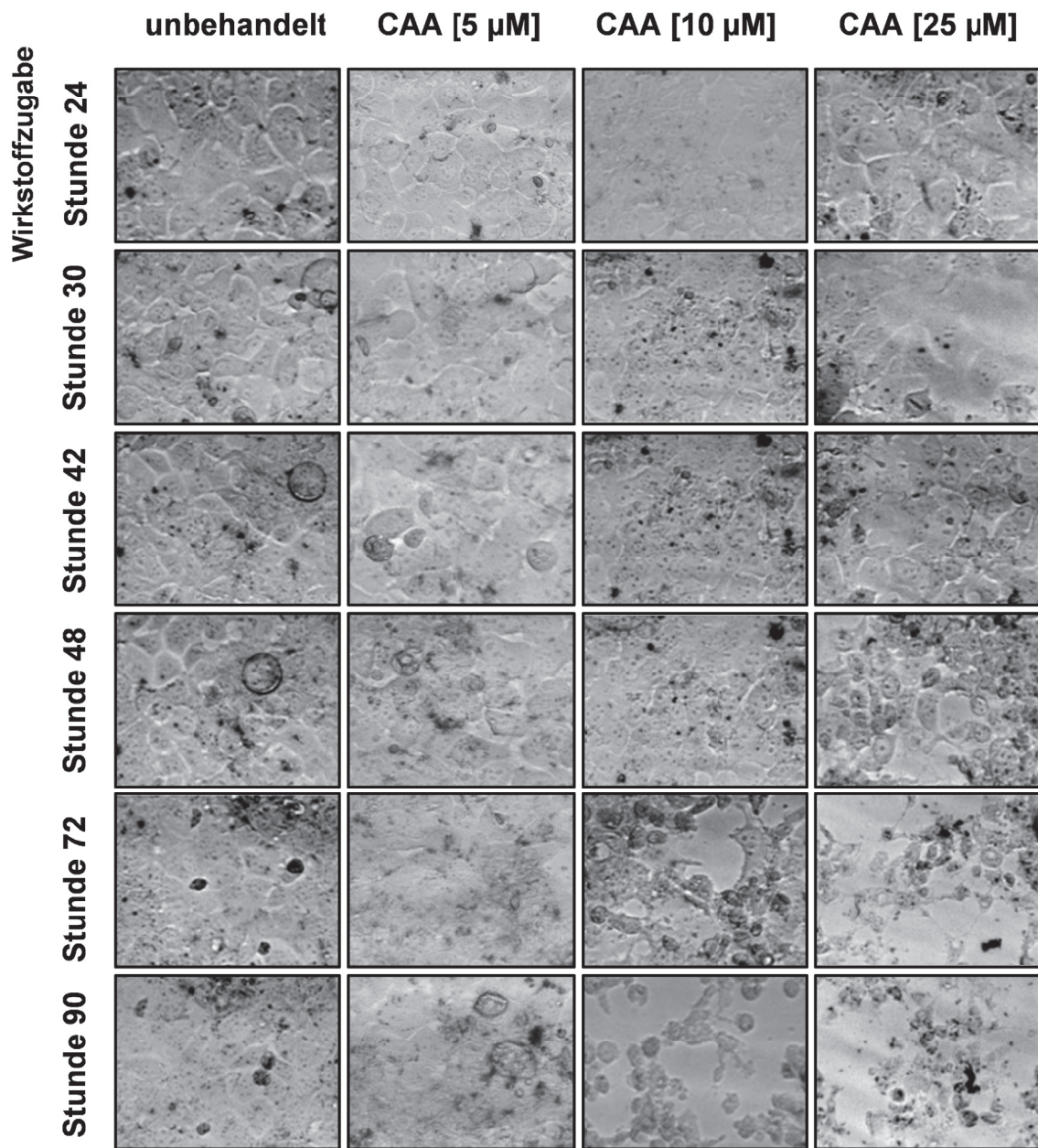
Sauerstoffverbrauch

	5 µM	10 µM	25 µM
Stunde 30	0,08139	0,00976	0,02312
Stunde 42	0,05049	0,06786	0,00042
Stunde 48	0,13520	0,34310	0,00025
Stunde 72	0,36479	0,11254	0,00064
Stunde 90	0,53346	0,00389	0,00000

Ansäuerungsrate

	5 µM	10 µM	25 µM
Stunde 30	0,32066	0,40781	0,76729
Stunde 42	0,64985	0,11500	0,00203
Stunde 48	0,02340	0,08246	0,01142
Stunde 72	0,04462	0,03733	0,00373
Stunde 90	0,04617	0,02597	0,00485

c



d

Abb. 2-20: Dynamische CAA-Effekte auf Metabolismus und Morphologie der MCF-7 Zelllinie gemessen mit dem IMR-System

Dynamische metabolische und morphologische Veränderungen von MCF-7 Zellen unter CAA-Einfluss. Angegeben sind die Stunden nach Testbeginn. Unbehandelte Zellen zeigen eine stetige Zunahme des (a) Sauerstoffverbrauchs bei einer gleichbleibenden (b) Ansäuerungsaktivität über den Messzeitraum. Die Zugabe von CAA [5, 10 oder 25 μ M] erfolgte 24 Stunden nach dem Start der Messung über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Zytostatika-Behandlung resultiert in einer dosisabhängigen Abnahme (a) des Sauerstoffverbrauchs und (b) der Ansäuerungsaktivität der Zellen. Die hemmende Wirkung auf die Ansäuerungsaktivität tritt im Vergleich zur Verringerung des Sauerstoffverbrauchs mit Verzögerung ein. Dargestellt sind Mittelwerte gleich behandelter Wells (n=5). Die Daten wurden auf den Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe normiert. (c) Der t-Test bestätigt die Signifikanz der Wirksamkeit im Vergleich zu unbehandelten Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten. *grün*: Unterschied zu unbehandelten Proben signifikant ($p < 0.05$). *schwarz*: Unterschied zu

unbehandelten Proben nicht signifikant ($p > 0,05$). (d) Zu verschiedenen Messzeitpunkten aufgenommene lichtmikroskopische Bilder des jeweils gleichen Wells (Vergrößerung 100-fach). Morphologische Veränderungen treten in Abhängigkeit von der eingesetzten CAA-Dosis auf und im Vergleich zur metabolischen Aktivität mit Verzögerung ein.

Die Ansäuerungsrate fällt bis Stunde 42 (18 Stunden nach der Wirkstoffzugabe) auf ca. die Hälfte des Ausgangswertes ab (Abb. 2-20b). Auch zu diesem Zeitpunkt sind keine morphologischen Veränderungen der Zellkulturen zu erkennen. Morphologische Veränderungen manifestieren sich erst nach ca. 24 Stunden nach Wirkstoffzugabe (Stunde 48). Ab Stunde 72 verlieren die Zellen ihre Zell-Zell-Kontakte untereinander. Sie zeigen eine abgerundete Form, beginnen sich abzukugeln und von der Well-Oberfläche abzulösen (Abb. 2-20d). Die Sauerstoffverbrauchsrate zu diesem Zeitpunkt liegt nur noch bei 20% und die Ansäuerungsaktivität hat auf ca. 50% der ursprünglichen Aktivität abgenommen (Abb. 2-20a, b). 48 Stunden nach der Wirkstoffzugabe (Stunde 72) sind nur noch vereinzelte apoptotische Zellen zu erkennen. Der Großteil ist durch das Pipettieren aus dem Well ausgespült worden. Gegen Ende der Messung sind lediglich Zelltrümmer zu erkennen (Abb. 2-20d). Sowohl Sauerstoffverbrauch als auch Ansäuerungsaktivität sind unter 20% der Aktivität zum Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe gesunken. Dies wird als Zelltod definiert (Abb. 2-20a, b). Die aus der CAA-Zugabe resultierende Abnahme der metabolischen Aktivität zeigt zu allen beschriebenen Analyse-Zeitpunkten signifikante Unterschiede im Vergleich mit unbehandelten Proben (Abb. 2-20c).

Morphologische Veränderungen treten in Abhängigkeit von der eingesetzten CAA-Dosis auf. Ein direkter Vergleich mit den Veränderungen der metabolischen Aktivität demonstriert, dass die die Zellmorphologie betreffenden Wirksamkeitseffekte mit Verzögerung eintreten (Abb. 2-20). Drei von einander unabhängige Experimente lieferten vergleichbare Ergebnisse.

2.5.2 Dosisabhängigkeit der DOX-Effekte auf Metabolismus und Morphologie

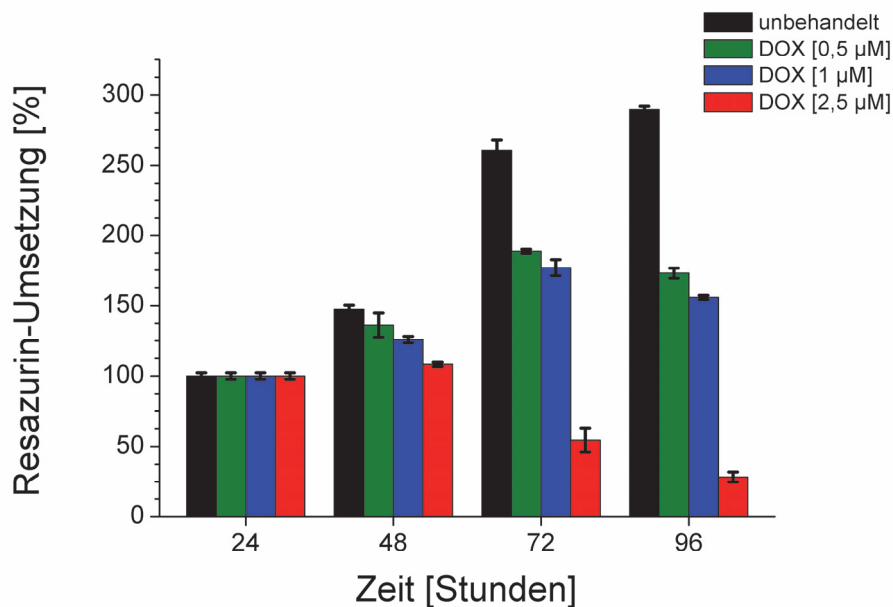
DOX-Effekte auf Vitalität, Morphologie und Zellzahl von MCF-7 Zellen, gemessen mit Standardmethoden

Im direkten Vergleich zu den Experimenten der CAA-Behandlung von MCF-7 Zellen zeigt sich bei den Experimenten mit DOX ein ähnlicher Effekt des Zytostatikums. Ab dem Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe bis zum Ende der Messung nach 72 Stunden nimmt die Resazurin-Umsetzung der unbehandelten Kulturen parallel zur Zellzahl um ca. das 2,5-fache zu (Abb. 2-21a, b). Die Lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen eine Zunahme der Zellzahl und die Ausbildung eines konfluenten Monolayers über den Verlauf der Messung (Abb. 2-21d).

Die Zugabe von 0,5 sowie 1 μM DOX resultiert in einer geringen Hemmung der Zellproliferation im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollproben, es kommt im Verlauf der Messung zu einem Anstieg um ca. das 1,5-fache der Resazurin-Umsetzung im Vergleich zu dem Wert zum Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe. Im Gegensatz hierzu fällt die Zahl an lebenden Zellen bis zum Ende der Messung auf 50% des Wertes zum Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe (Abb. 2-21a, b). Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen eine nur geringe Abnahme der Konfluenz, jedoch Veränderungen der Zellmorpholo-

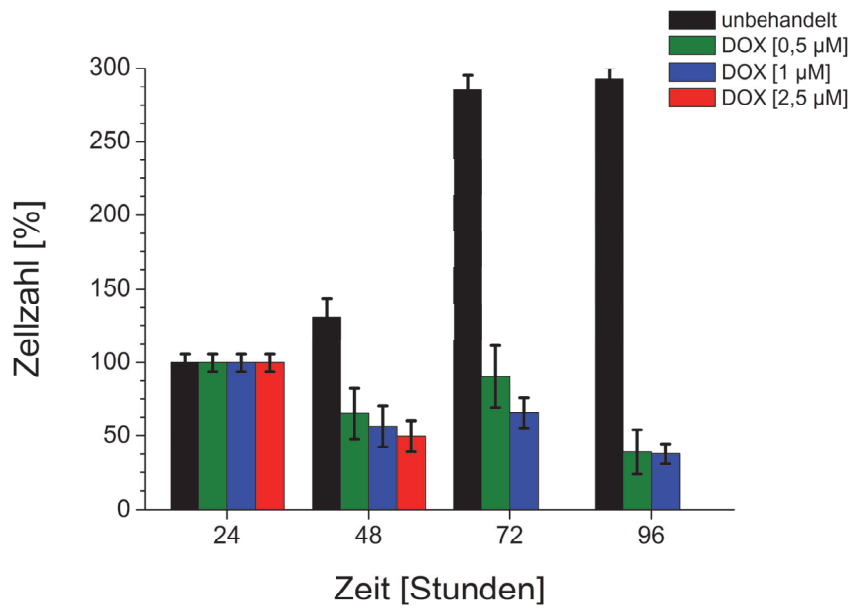
gie. Die einzelnen Zellen scheinen eine größere Oberfläche einzunehmen im Vergleich zu denen der Kontrolle (Abb. 2-21d).

Aus dem t-Test (Abb. 2-21c) geht hervor, dass bereits 24 Stunden nach der Zugabe von 1 μM DOX (Stunde 48 nach Messbeginn) und 48 Stunden nach der Zugabe von 0,5 μM DOX (Stunde 72 nach Messbeginn) die Vitalität und Zellzahl signifikant abfallen. Die Behandlung mit 2,5 μM DOX führt zu einer Abnahme der Resazurin-Umsetzung auf 25% der Aktivität zu Beginn der Wirkstoffzugabe. Am Ende der Messung beträgt die Vitalität der Zellen noch 50% des Ausgangswertes. Die Anzahl an lebenden Zellen verringert sich jedoch innerhalb der ersten 24 Stunden nach Wirkstoffzugabe um 50%. 48 Stunden nach der Wirkstoffzugabe (Stunde 72 nach Messbeginn) sind keine lebenden Zellen mehr zählbar. Die stark abnehmende metabolische Aktivität wird ebenfalls durch die lichtmikroskopischen Aufnahmen deutlich, die innerhalb der 24 Stunden der Wirkstoffzugabe eine Wachstumshemmung, dann eine schnelle Abnahme der Zellzahl zeigen (Abb. 2-21d). Die beschriebenen Ergebnisse konnten in drei unabhängigen Experimenten reproduziert werden.



a

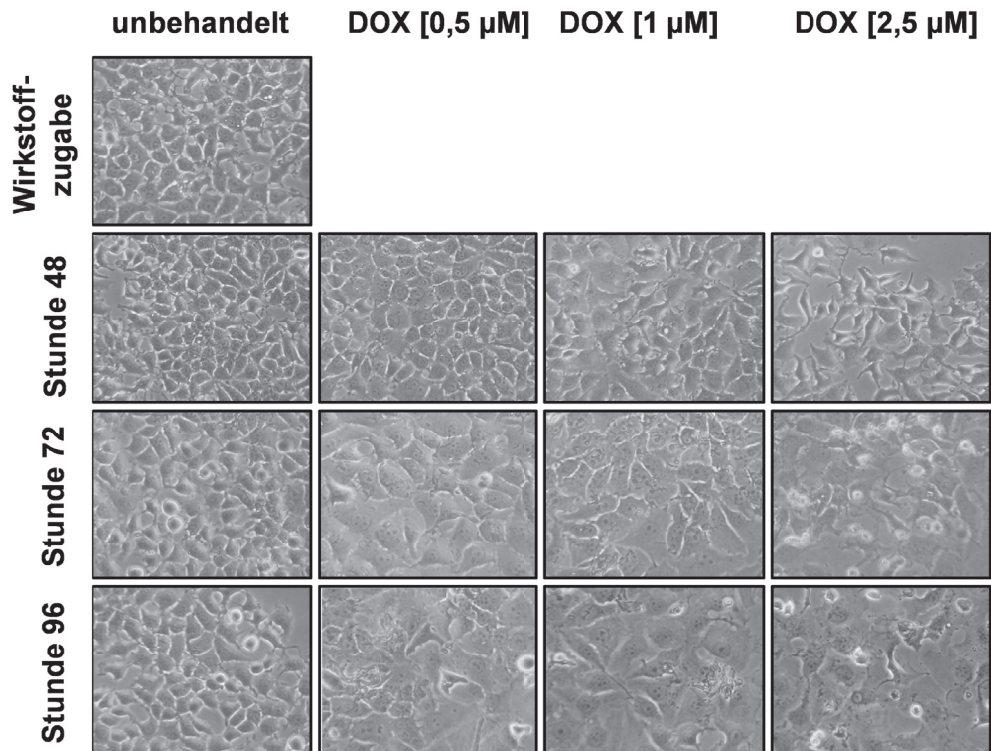
2 Ergebnisse



b

Resazurin-Umsetzung				Zellzahl			
	0,5 µM	1, µM	25 µM		0,5 µM	1, µM	25 µM
Stunde 48	0,23774	0,00290	0,00132	Stunde 48	0,00692	0,00692	0,00862
Stunde 72	0,02141	0,00645	0,00186	Stunde 72	0,00110	0,00380	0,00326
Stunde 96	0,00003	0,00028	0,00017	Stunde 96	0,00169	0,00251	0,00210

c



d

Abb. 2-21: DOX-Effekte auf Vitalität, Zellzahl und der Morphologie der MCF-7 Zelllinie gemessen mit Standardmethoden

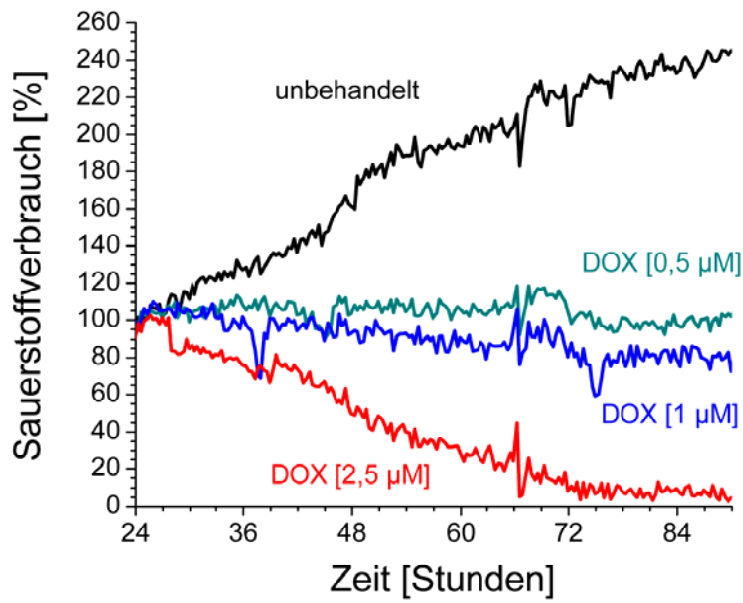
DOX-Effekte auf verschiedene zelluläre Parameter zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Wirkstoffzugabe. Angegeben sind die Stunden nach Testbeginn. Die Zugabe von DOX [0,5, 1,0, 2,5 µM] erfolgte 24 Stunden nach Start des Experiments über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Daten wurden auf den Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe normiert. Dargestellt ist die Standardabweichung jeder Testbedingung (n=3). Die Zugabe von DOX resultiert in einer konzentrationsabhängigen Abnahme (a) der Umsetzung von Reszurin, (b) der Zellzahl und (d) Veränderungen der Zellmorphologie (Lichtmikroskop, Vergrößerung 100-fach). (c) Der t-Test bestätigt die Signifikanz der Wirkstoffeffekte im Vergleich zu unbehandelten Kulturen. *grün*: Unterschied zu unbehandelten Proben signifikant ($p < 0,05$). *schwarz*: Unterschied zu unbehandelten Proben nicht signifikant ($p > 0,05$).

DOX- Effekte auf Sauerstoffverbrauch, Ansäuerungsaktivität und Morphologie von MCF-7 Zellen, gemessen mit dem IMR-System

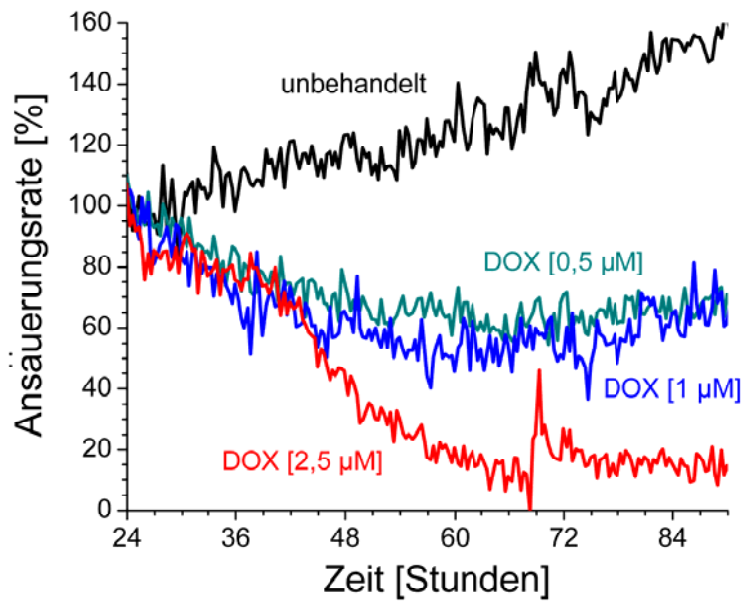
In Abb. 2-22 ist eine Messung mit dem IMR-System dargestellt, bei der MCF-7 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von DOX [0,5, 1,0 und 2,5 µM] behandelt wurden. Ab dem Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe zeigen unbehandelte Proben eine stetige Zunahme des Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerungsaktivität um das 2-fache bzw. 1,6-fache über den Verlauf der Messung mit dem IMR-System.

Die Zugabe von 0,5 und 1 µM DOX führt zu einer Hemmung des Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerungsaktivität der Zellen. Der Sauerstoffverbrauch nach der Zugabe von 0,5 µM DOX bleibt über den Verlauf des Messzeitraums konstant. Die Ansäuerungsaktivität fällt auf 60% des Anfangswertes ab. Die Zugabe von 1 µM unterscheidet sich in ihrem Effekt auf die metabolische Aktivität nicht gravierend von der Konzentration von 0,5 µM (Abb. 2-22a, b). Die Bildaufnahmen beider Konzentrationen zeigen zum Ende der Messung ein konfluentes Monolayer, jedoch im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen eine größere Zahl an apoptotischen Zellen (Abb. 2-22d).

Die Konzentration von 2,5 µM DOX resultiert in einer deutlichen Abnahme der metabolischen Aktivität. Der Sauerstoffverbrauch sinkt innerhalb von 21 Stunden nach der Wirkstoffzugabe (Stunde 45 nach Messbeginn) auf 50% ab. Die Ansäuerungsaktivität erreicht diesen Wert nach 24 Stunden (Stunde 48 nach Messbeginn) (Abb. 2-22a, b). Die Bildaufnahmen zeigen, dass neben der Proliferationshemmung sich zusätzlich eine große Zahl apoptotischer Zellen von der Plattenoberfläche ablöst. Über den weiteren Verlauf der Messung kommt es zum Absterben und dem Ausspülen der Zellen aus den Wells der Messplatte (Abb. 2-22d). Drei voneinander unabhängige Messungen lieferten vergleichbare Ergebnisse.



a



b

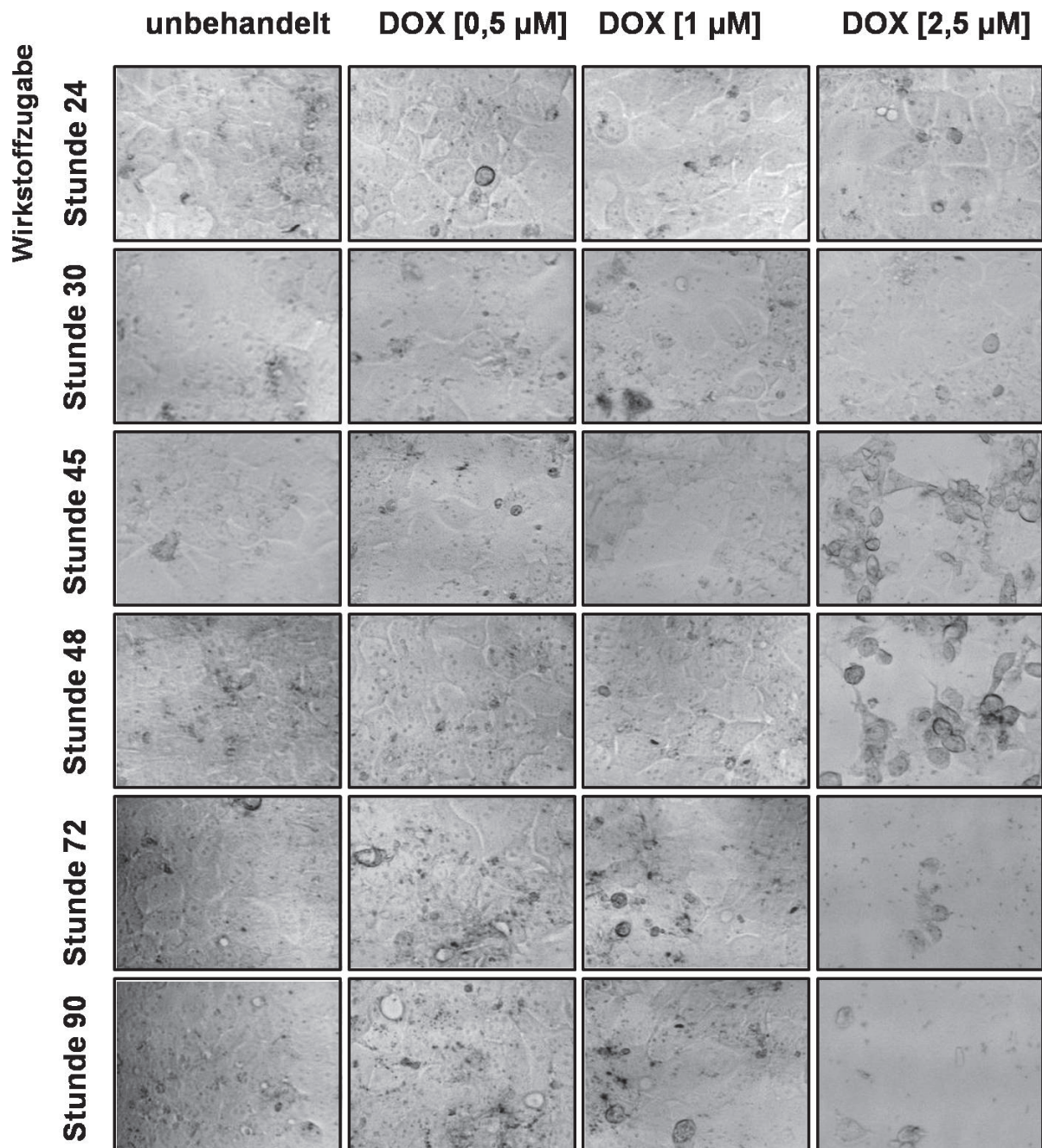
Sauerstoffverbrauch

	0,5 µM	1 µM	2,5 µM
Stunde 45	0,04601	0,03515	0,00706
Stunde 48	0,04685	0,04827	0,01499
Stunde 72	0,03635	0,02512	0,00887
Stunde 90	0,03297	0,01849	0,00901

Ansäuerungsrate

	0,5 µM	1 µM	2,5 µM
Stunde 45	0,01440	0,00563	0,00345
Stunde 48	0,01170	0,01071	0,00370
Stunde 72	0,00094	0,00108	0,00008
Stunde 90	0,00291	0,00256	0,00106

c



d

Abb. 2-22: Dynamische DOX-Effekte auf Metabolismus und Morphologie der MCF-7 Zelllinie gemessen mit dem IMR-System

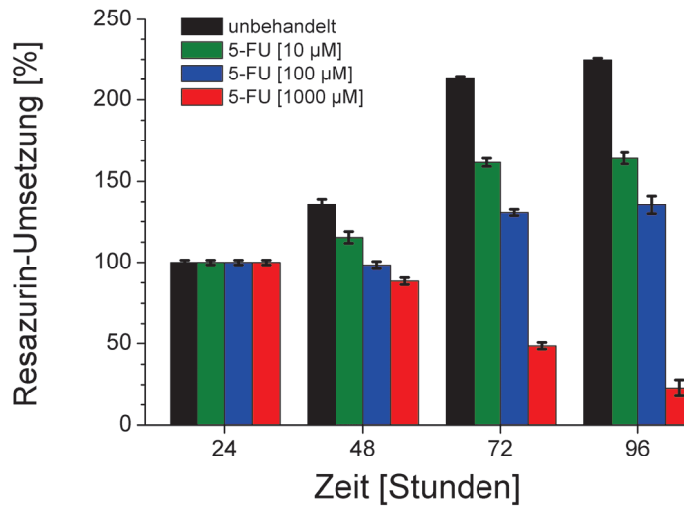
Dynamische metabolische und morphologische Veränderungen von MCF-7 Zellen unter DOX-Einfluss. Angegeben sind die Stunden nach Testbeginn. Unbehandelte Zellen zeigen eine stetige Zunahme des (a) Sauerstoffverbrauchs bei einer gleichbleibenden (b) Ansäuerungsaktivität über den Messzeitraum. Die Zugabe von DOX [0,5, 1,0, 2,5 μ M] erfolgt 24 Stunden nach dem Start der Messung über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Zytostatika-Behandlung resultiert in einer dosisabhängigen Abnahme (a) des Sauerstoffverbrauchs und (b) der Ansäuerungsaktivität der Zellen. Die hemmende Wirkung auf die Ansäuerungsaktivität tritt im Vergleich zur Verringerung des Sauerstoffverbrauchs mit Verzögerung ein. Dargestellt sind Mittelwerte gleich behandelter Wells ($n > 3$). Die Daten wurden auf den Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe normiert. (c) Der t-Test bestätigt die

Signifikanz der Wirkstoffeffekte im Vergleich zu unbehandelten Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten. *grün*: Unterschied zu unbehandelten Proben signifikant ($p < 0,05$). *schwarz*: Unterschied zu unbehandelten Proben nicht signifikant ($p > 0,05$). (d) Zu verschiedenen Messzeitpunkten aufgenommene lichtmikroskopische Bilder des jeweils gleichen Wells (Vergrößerung 100-fach). Morphologische Veränderungen treten in Abhängigkeit von der eingesetzten DOX-Dosis auf und im Vergleich zur metabolischen Aktivität mit Verzögerung ein.

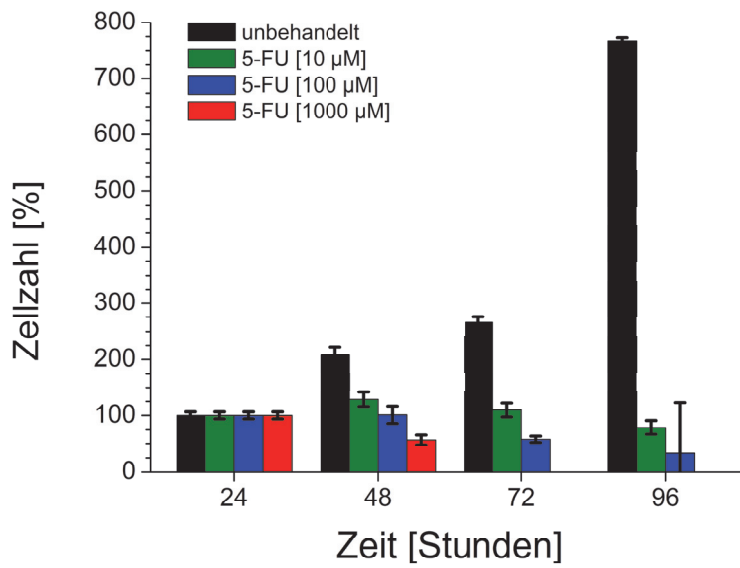
2.5.3 Dosisabhängigkeit der 5-FU-Effekte auf Vitalität und Morphologie

5-FU-Effekte auf Vitalität, Morphologie und Zellzahl von MCF-7 Zellen, gemessen mit Standardmethoden

Die Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen des Zytostatikums 5-FU [10, 100, 1000 μM] führen, wie auch bei CAA und DOX beobachtet, zu einer dosisabhängigen signifikanten Hemmung der Resazurin-Umsetzung (Abb. 2-23a) und Zellzahl (Abb. 2-23b) sowie Veränderungen der Morphologie (Abb. 2-23d) im Vergleich zu unbehandelten MCF-7 Zellkulturen. Unbehandelte Kulturen zeigen einen Anstieg auf das 2,5-fache der Resazurin-Umsetzung, die Zellzahl steigt um das 8-fache im Verlauf der Messung. Nach Zugabe der Konzentration von 10 μM steigt die Resazurin-Umsetzung auf das 1,5-fache an, die Zellzahl sinkt um ca. 20%. Es zeigen sich keine Änderungen in der Zellmorphologie, das Zellmonolayer bleibt über den Verlauf der Messung bestehen. Die Behandlung mit 100 μM 5-FU führt zu einer Hemmung in der Zunahme der Resazurin-Umsetzung, welche bis zum Ende der Messung um ca. 20% leicht ansteigt. Die Zellzahl fällt auf ca. die Hälfte des Werts zum Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe. Aus den lichtmikroskopischen Aufnahmen wird ebenfalls die leichte Abnahme der Zellzahl über den Verlauf der Messung deutlich. Die Zugabe von 1000 μM führen zu einem Absterben der Zellen, ersichtlich aus der Abnahme der Vitalität auf ca. 20% des Ausgangswertes und der Apoptose der Zellen. Im Verlauf der Messung werden deutliche morphologische Veränderungen der Zellen sichtbar. Es kommt innerhalb der ersten 24 Stunden nach Wirkstoffzugabe zu einem Verlust der Zell-Zellkontakte. Die beschriebenen Ergebnisse wurden zweimal reproduziert.



a



b

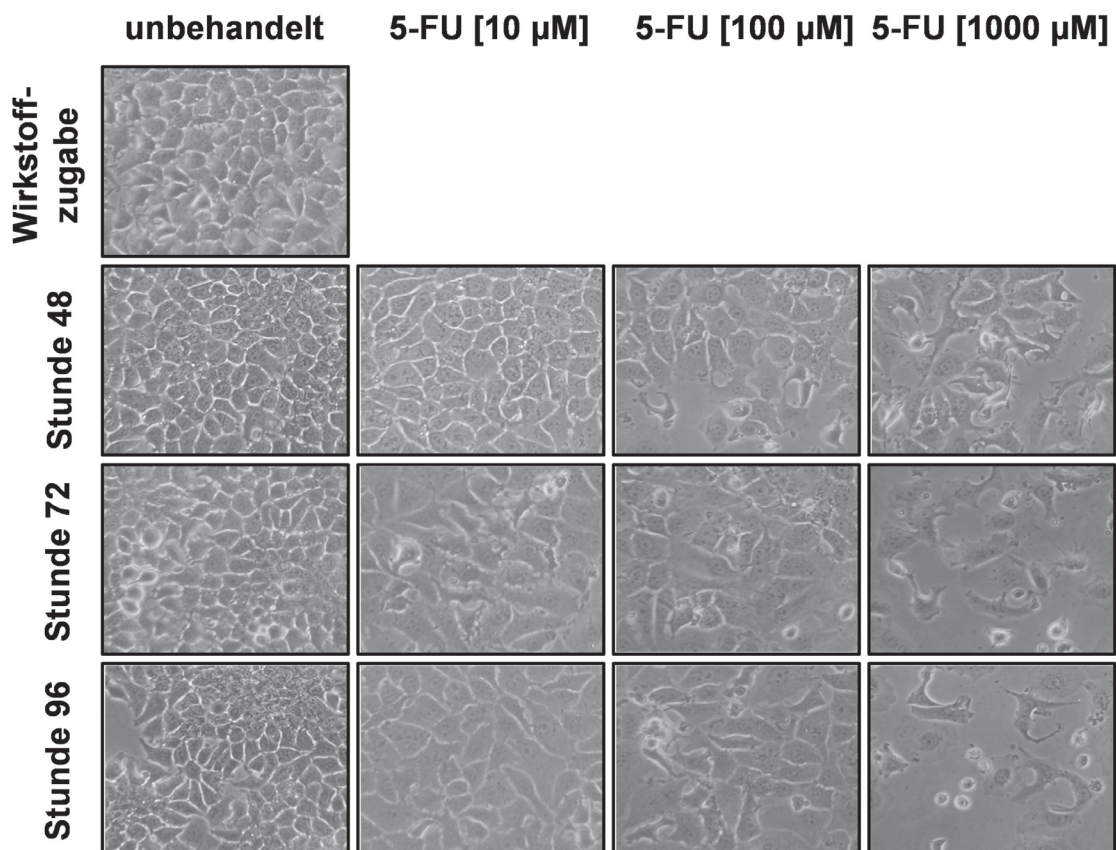
Resazurin-Umsetzung

	10 µM	100 µM	1000 µM
Stunde 48	0,00486	0,00133	0,00097
Stunde 72	0,00024	0,00000	0,00000
Stunde 96	0,00080	0,00101	0,00000

Zellzahl

	10 µM	100 µM	1000 µM
Stunde 48	0,02753	0,01300	0,01154
Stunde 72	0,00233	0,00436	0,00303
Stunde 96	0,00085	0,00005	0,00108

c



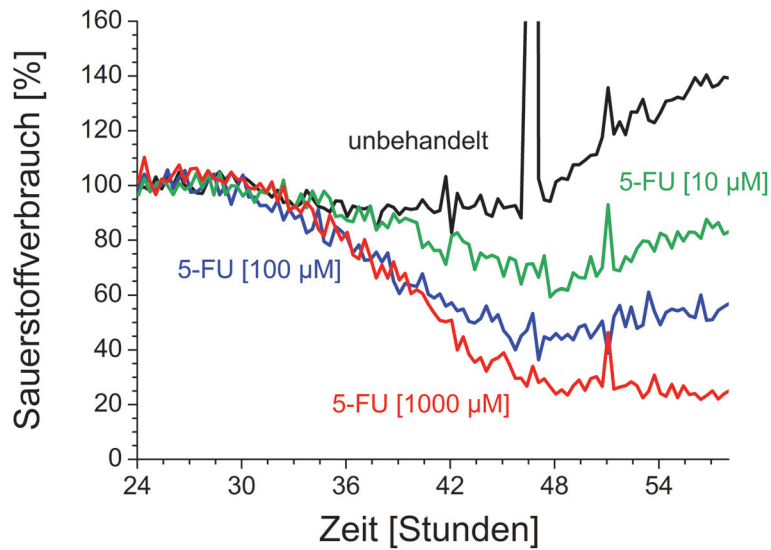
d

Abb. 2-23: 5-FU-Effekte auf Vitalität, Zellzahl und der Morphologie der MCF-7 Zelllinie gemessen mit Standardmethoden

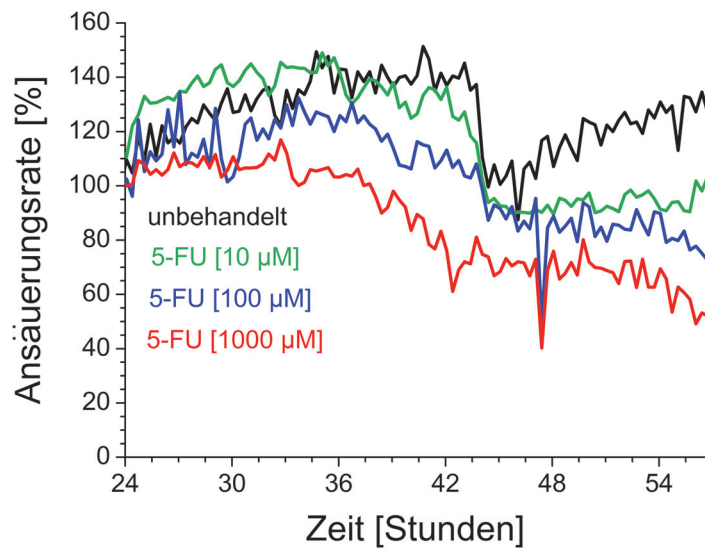
5-FU-Effekte auf verschiedene zelluläre Parameter zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Wirkstoffzugabe. Angegeben sind die Stunden nach Testbeginn. Die Zugabe von 5-FU [10, 100, 1000 μ M] erfolgte 24 Stunden nach Start des Experiments über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Daten wurden auf den Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe normiert. Dargestellt ist die Standardabweichung jeder Testbedingung (n=3). Die Zugabe von 5-FU resultiert in einer konzentrationsabhängigen Abnahme (a) der Umsetzung von Resazurin, (b) der Zellzahl und (d) Veränderungen der Zellmorphologie (Lichtmikroskop, Vergrößerung 100-fach). (c) Der t-Test bestätigt die Signifikanz der Wirkstoffeffekte im Vergleich zu unbehandelten Kulturen. *grün*: Unterschied zu unbehandelten Proben signifikant ($p < 0,05$). *schwarz*: Unterschied zu unbehandelten Proben nicht signifikant ($p > 0,05$).

5-FU-Effekte auf Sauerstoffverbrauch, Ansäuerungsaktivität und Morphologie von MCF-7 Zellen, gemessen mit dem IMR-System

In Abb. 2-24 ist eine Messung mit dem IMR-System dargestellt, bei der MCF-7 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von 5-FU [10, 100, 1000 µM] behandelt wurden. Die Foto-Aufnahmen zeigen bei allen Wells Verunreinigungen, erkennbar als schwarze Punkte. Diese resultieren aus Anhaftungsproblemen mit den auf dieser Platte aufgetragenen Sensorspots, welche sich zum Teil im Verlauf der Messung vom Substrat ablösten (Abb. 2-24b, d).



a



b

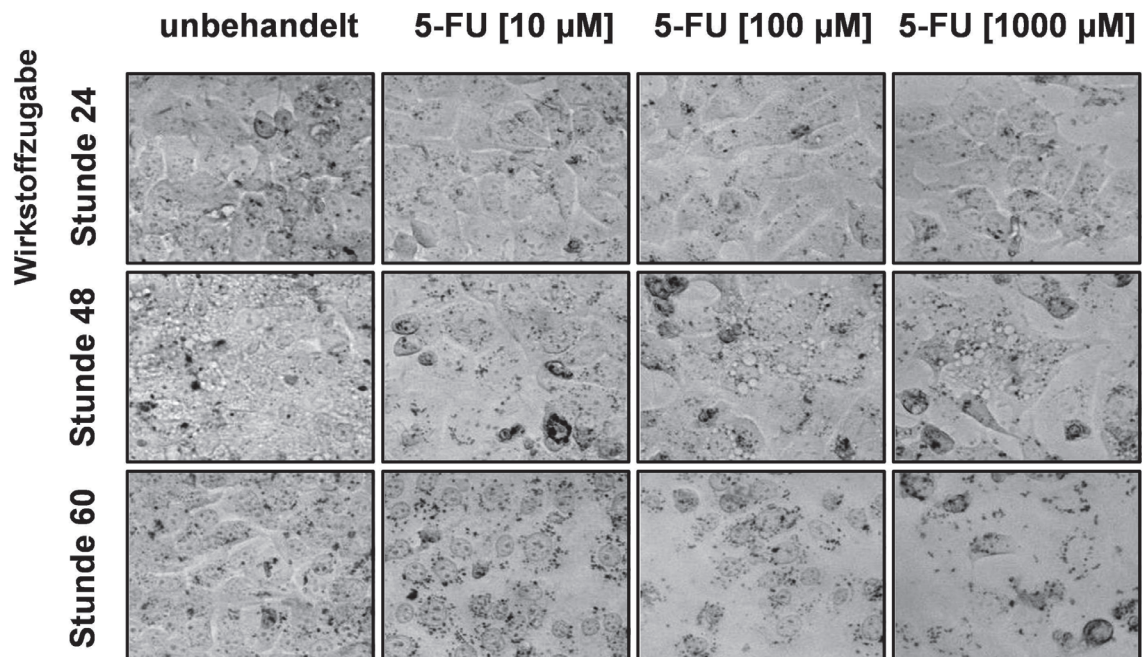
Sauerstoffverbrauch

	10 µM	100 µM	1000 µM
Stunde 30	0,08189	0,00976	0,02312
Stunde 40	0,05049	0,06786	0,00042
Stunde 48	0,13520	0,34310	0,00025
Stunde 56	0,47531	0,19831	0,47093

Ansäuerungsrate

	10 µM	100 µM	1000 µM
Stunde 30	0,32066	0,40781	0,76729
Stunde 40	0,64985	0,11500	0,00203
Stunde 48	0,02340	0,08246	0,01142
Stunde 56	0,04902	0,20107	0,17879

c



d

Abb. 2-24: Dynamische 5-FU-Effekte auf Metabolismus und Morphologie von MCF-7 Zellen gemessen mit dem IMR-System

Dynamische metabolische und morphologische Veränderungen von MCF-7 Zellen unter 5-FU-Einfluss. Angegeben sind die Stunden nach Testbeginn. Unbehandelte Zellen zeigen eine zunächst gleichbleibende, ab Stunde 48 stetige Zunahme des (a) Sauerstoffverbrauchs bei einer annähernd gleichbleibenden (b) Ansäuerungsaktivität über den Messzeitraum. Die Zugabe von 5-FU [10, 100, 1000 µM] erfolgte 24 Stunden nach dem Start der Messung über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Zytostatika-Behandlung resultiert in einer dosisabhängigen Abnahme (a) des Sauerstoffverbrauchs und (b) der Ansäuerungsaktivität der Zellen. Die hemmende Wirkung auf die Ansäuerungsaktivität tritt im Vergleich zur Verringerung des Sauerstoffverbrauchs mit Verzögerung ein. Dargestellt sind Mittelwerte gleich behandelter Wells (n=6). Die Daten wurden auf den Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe normiert. (c) Der t-Test bestätigt die Signifikanz der Wirkstoffeffekte im Vergleich zu unbehandelten Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten. *grün*: Unterschied zu unbehandelten Proben signifikant ($p < 0,05$). *schwarz*: Unterschied zu unbehandelten Proben nicht signifikant ($p > 0,05$). (d) Zu verschiedenen Messzeitpunkten aufgenommene lichtmikroskopische Bilder des jeweils gleichen Wells (Vergrößerung 100-fach). Morphologische Veränderungen treten in Abhängigkeit von der eingesetzten 5-FU-Dosis auf und im Vergleich zur metabolischen Aktivität mit Verzögerung ein.

Wie auch bei Experimenten mit CAA- und DOX-Zugaben zu beobachten, ist eine deutliche Dosisabhängigkeit der Effekte des Zytostatikum 5-FU zu erkennen. Die Verringerung des Sauerstoffverbrauchs durch 10 und 100 µM 5-FU ist im Vergleich zur Hemmung der Resazurin-Umsetzung deutlich stärker. Diese Hemmung scheint für den Sauerstoffverbrauch, nicht jedoch für die Ansäuerungsaktivität, reversibel zu sein. 24 Stunden nach Beginn der Wirkstoffzugabe, ab dem Zeitpunkt des Wirkstoffentzugs steigt v.a. die Sauerstoffverbrauchsrate wieder leicht an (Abb. 2-24a, b).

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen 24 Stunden nach der Zugabe aller 5-FU-Konzentrationen (Stunde 48 nach Messbeginn) morphologische Veränderungen der Zellen. Es kommt zu Verlusten der

Zell-Zell-Kontakte als Folge beider Wirkstoffkonzentrationen. 36 Stunden nach der Zugabe von 10 μM (Stunde 60 nach Messbeginn) beginnen sich die Zellen abzurunden, für 100 μM 5-FU ist zu diesem Zeitpunkt eine drastische Abnahme der Zellzahl und eine große Zahl apoptotischer Zellen zu erkennen.

Konzentrationen von 100 und 1000 μM 5-FU haben innerhalb von ca. 16 Stunden (Stunde 40) eine Abnahme des Sauerstoffverbrauchs der Zellen um die Hälfte zur Folge. Zu diesem Zeitpunkt ist eine große Zahl apoptotischer Zellen in den mikroskopischen Aufnahmen zu erkennen. Gegen Ende der Messung liegen sowohl der Sauerstoffverbrauch als auch die Ansäuerungsaktivität unter 20% des Wertes zum Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe. Lichtmikroskopisch sind keine lebenden Zellen mehr erkennbar (Abb. 2-24a, b, d).

2.6 Einfluss des extrazellulären pH-Wertes auf metabolische Wirkungseffekte

Neben Chemosensitivitätsmessungen an individuellem Tumorgewebe werden im Folgenden weitere Anwendungsbereiche sensorbasierter metabolischer Analysen im klinischen Bereich aufgezeigt.

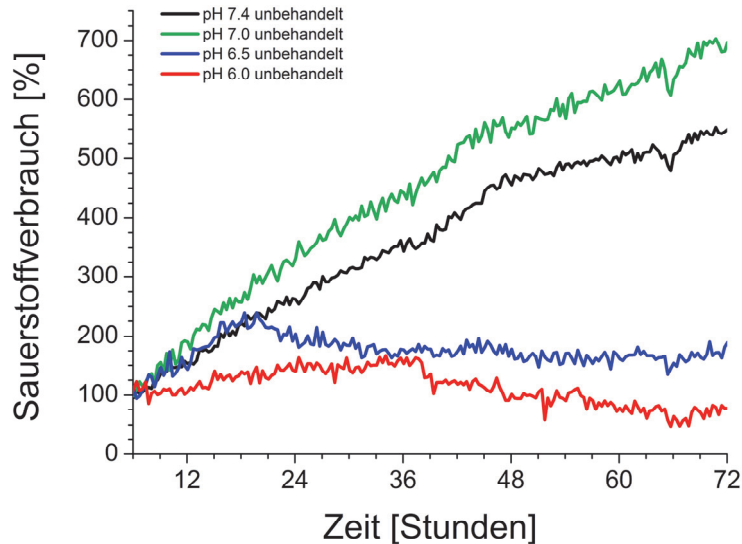
Um den großen Einfluss der im Tumorgewebe sich häufig und schnell verändernden extrazellulären pH-Bedingungen auf die metabolische Aktivität von Zellen und vor allem deren Reaktion auf Wirkstoffbehandlungen zu demonstrieren, wurden Experimente mit Amilorid, einem Inhibitor des Na^+/H^+ -Antiporters (NHE-1), durchgeführt.

Zur Untersuchung des Einflusses des extrazellulären pH-Werts auf den Metabolismus und die Reaktionen von Zellen auf Wirkstoffzugaben, wurden MCF-7 Zellen für die IMR-Messung nach dem Standardprotokoll (Abschnitt 5.1.2) ausgesät. Alle Kulturen wurden in den ersten sechs Stunden der IMR-Messung in Kulturmedium mit pH-Wert 7,4 vorinkubiert. Anschließend erfolgte bei einem Teil der Kulturen ein Absenken des Medien-pH-Werts auf pH 7,0, 6,5 sowie 6,0, oder ein gleichbleibender pH-Wert von 7,4. Da zur Konstanthaltung des extrazellulären pH-Wertes das Medium gepuffert werden musste, konnten keine auswertbaren Daten zur Ansäuerungsaktivität gemessen werden.

2.6.1 Effekte der extrazellulären Ansäuerung auf die metabolische Aktivität von MCF-7 Zellen

Abb. 2-25 und Abb. 2-27 stellen den Einfluss des extrazellulären pH-Werts auf die Sauerstoffverbrauchsrate von MCF-7 Zellen dar. Deutlich werden die dynamischen Veränderungen des Sauerstoffverbrauchs von MCF-7 Zellen bei unterschiedlichen extrazellulären pH-Wert-Bedingungen. Während extrazelluläre pH-Werte von 6,5 und 6,0 zu einer signifikanten Hemmung des Sauerstoffverbrauchs führen, steigt der Sauerstoffverbrauch nach einem Wechsel auf einen extrazellulären pH-Wert von 7,0 im Vergleich zu unbehandelten Kulturen scheinbar leicht, jedoch nicht signifikant an (Abb. 2-25b). Dies könnte auf einen erhöhten Sauerstoffverbrauch zurückzuführen sein, resultierend aus einer gesteigerten Aktivität der in der Zellmembran lokalisierten Ionenkanäle, die durch den Export von H^+ -Ionen den intrazellulären pH-Wert auf einem leicht basischen Level halten^{67,95-97}. Extrazelluläre pH-Werte von 7,4 und 7,0 ermöglichen die Proliferation der Zellen, was nach ca. 72 Stunden Messdauer zur Bildung von konfluenten Monolayern führt. Deutlich wird jedoch, dass die Zelldichte bei dem pH-Wert von 7,0 geringer ist als bei dem extrazellulären pH von 7,4 (Abb. 2-25, Abb. 2-27c). Der Wechsel auf einen pH Wert von 6,5 hat zur Folge, dass der Sauerstoffverbrauch innerhalb von 12 Stunden parallel zu dem von in pH 7,4 kultivierten Kulturen ansteigt. Anschließend bleibt der Sauerstoffverbrauch jedoch über den weiteren Verlauf der Messung konstant. Die Zelldichte ist bei diesen Kulturen nach 72 Stunden nicht so hoch wie bei einem extrazellulären pH-Wert von 7,4. Es treten Lücken im Zellrasen auf und teilweise sind die Zell-Zell-Kontakte verloren gegangen (Stunde 72). Desweiteren sind absterbende Zellen erkennbar (Abb. 2-27c). Der Wechsel auf einen extrazellulären pH Wert von 6,0 resultiert in einem leichten Abfall des Sauerstoffverbrauchs über den Verlauf der Messung auf 50% des Wertes zum Zeitpunkt des pH-Wert-Wechsels. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen 18 Stunden nach dem pH-Wert-Wechsel (Stunde 24 nach Messbeginn) keine proliferierenden son-

den eine Reihe sich vom Substrat ablösenden Zellen, die schließlich aus den Wells ausgespült werden (Abb. 2-27c). Die Daten wurden zwei Mal reproduziert.



a

Sauerstoffverbrauch

	pH 7,0 - pH 7,4	pH 6,5 - pH 7,4	pH 6,0 - pH 7,4
Stunde 24	0,24153	0,18440	0,04905
Stunde 48	0,92667	0,02095	0,00547
Stunde 72	0,76995	0,00625	0,00466

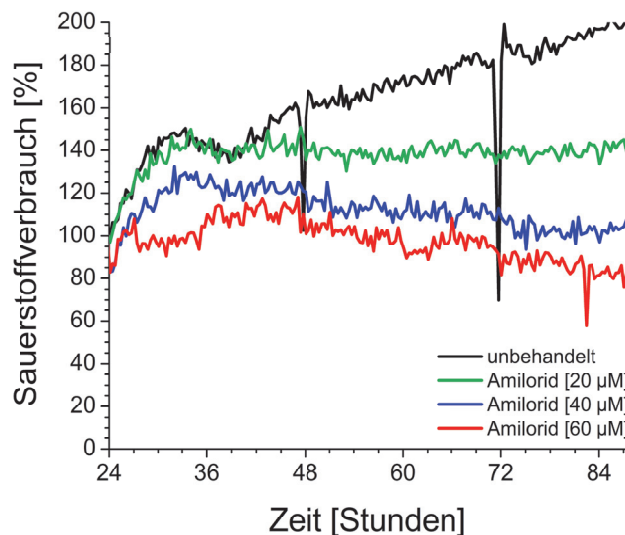
b

Abb. 2-25: Einfluss des extrazellulären pH-Wertes auf den Sauerstoffverbrauch von MCF-7 Zellen

(a) Dynamische Veränderungen des Sauerstoffverbrauchs von MCF-7 Zellen in Abhängigkeit von extrazellulären pH-Wert-Bedingungen. Alle Kulturen wurden in den ersten sechs Stunden der IMR-Messung in Kulturmedium mit pH-Wert 7,4 inkubiert. Anschließend erfolgte bei einem Teil der Kulturen ein Absenken des Medien-pH-Wertes auf pH 7,0, 6,5 oder 6,0 über den weiteren Verlauf der Messung. Angegeben sind die Stunden nach Testbeginn. Dargestellt sind Mittelwerte gleich behandelte MCF-7 Kulturen (n=3). Die Daten wurden auf den Zeitpunkt des pH-Wert-Wechsels normiert. (b) Der t-Test bestätigt die Signifikanz des Einflusses unterschiedlicher extrazellulärer pH-Werte auf die metabolische Aktivität im Vergleich zu Kulturen in pH 7,4 zu verschiedenen Zeitpunkten. *grün*: Unterschied zu unbehandelten Proben signifikant ($p < 0,05$). *schwarz*: Unterschied zu unbehandelten Proben nicht signifikant ($p > 0,05$).

2.6.2 Amilorid-Effekte auf die metabolische Aktivität von MCF-7 Zellen

Neben den oben beschriebenen Effekten des extrazellulären pH-Werts auf die metabolische Aktivität wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen des NHE-1-Inhibitors Amilorid [20, 40, 60 µM] auf den Sauerstoffverbrauch untersucht. Alle Kulturen wurden in Kulturmedium mit pH-Wert 7,4 kultiviert. Sechs Stunden nach Beginn der Messung erfolgte die Zugabe der verschiedenen Amilorid-Konzentrationen über den weiteren Verlauf der Messung. In Abb. 2-26 sind die Veränderungen des Sauerstoffverbrauchs von MCF-7 Zellen, resultierend aus der Zugabe verschiedener Konzentrationen von Amilorid [20, 40, 60 µM], dargestellt. Die Zugabe von Amilorid 24 Stunden nach Start der Messung führt zu einer signifikanten Wirkstoffkonzentrationsabhängigen Hemmung [20 µM] und Abnahme [40 und 60 µM] des Sauerstoffverbrauchs (Abb. 2-26). Da zur Konstanthaltung des Medien-pH-Wertes dieses gepuffert werden musste, konnten keine auswertbaren Daten zur Ansäuerungsaktivität gemessen werden.



a

Sauerstoffverbrauch

	Amilorid 20 µM - unbehandelt	Amilorid 40 µM - unbehandelt	Amilorid 60 µM - unbehandelt
Stunde 24	0,770822676	0,239720955	0,99366773
Stunde 48	0,056251394	0,02724557	0,0280407
Stunde 72	0,02350	0,01191	0,01252

b

Abb. 2-26: Konzentrationsabhängige Amilorid-Effekte auf den Sauerstoffverbrauch von MCF-7 Zellen

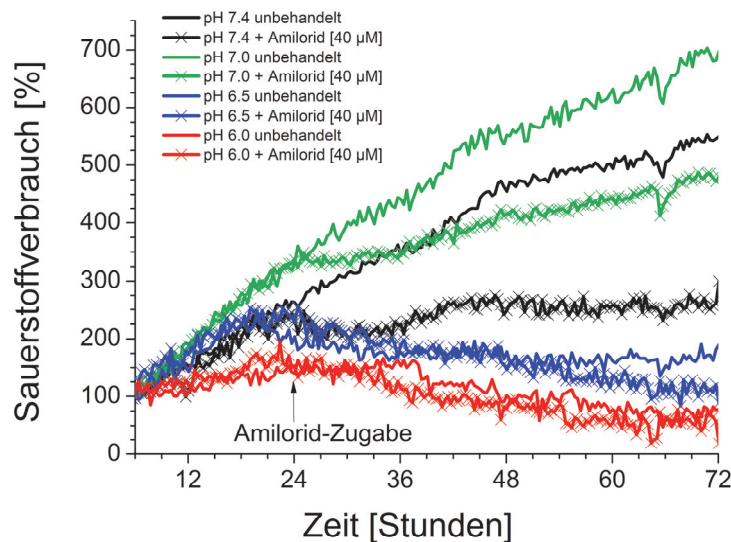
Dynamische Veränderungen des Sauerstoffverbrauchs von MCF-7 Zellen nach Zugabe unterschiedlicher Amilorid-Konzentrationen [20, 40, 60 µM] bei einem extrazellulären pH-Wert von 7,4. Die Wirkstoffzugabe erfolgte ab Stunde 24 bis zum Ende des Messzeitraums. Angegeben sind die Stunden nach Testbeginn. Dargestellt sind Mittelwerte gleich behandelte MCF-7 Kulturen (n=3). Die Daten wurden auf den Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe normiert. (a) Deutlich wird die wirkstoffkonzentrationsabhängige signifikante Hemmung bzw. Abnahme des Sauerstoffverbrauchs. (b) Der t-Test bestätigt die Signifikanz des Wirksamkeitseffekts im Vergleich zu unbehandelten Kulturen. *grün*: Unterschied zu unbehandelten Proben signifikant (p<0,05). *schwarz*: Unterschied zu unbehandelten Proben nicht signifikant (p>0,05).

2.6.3 Effekte der extrazellulären Ansäuerung auf die metabolischen Effekte von Amilorid

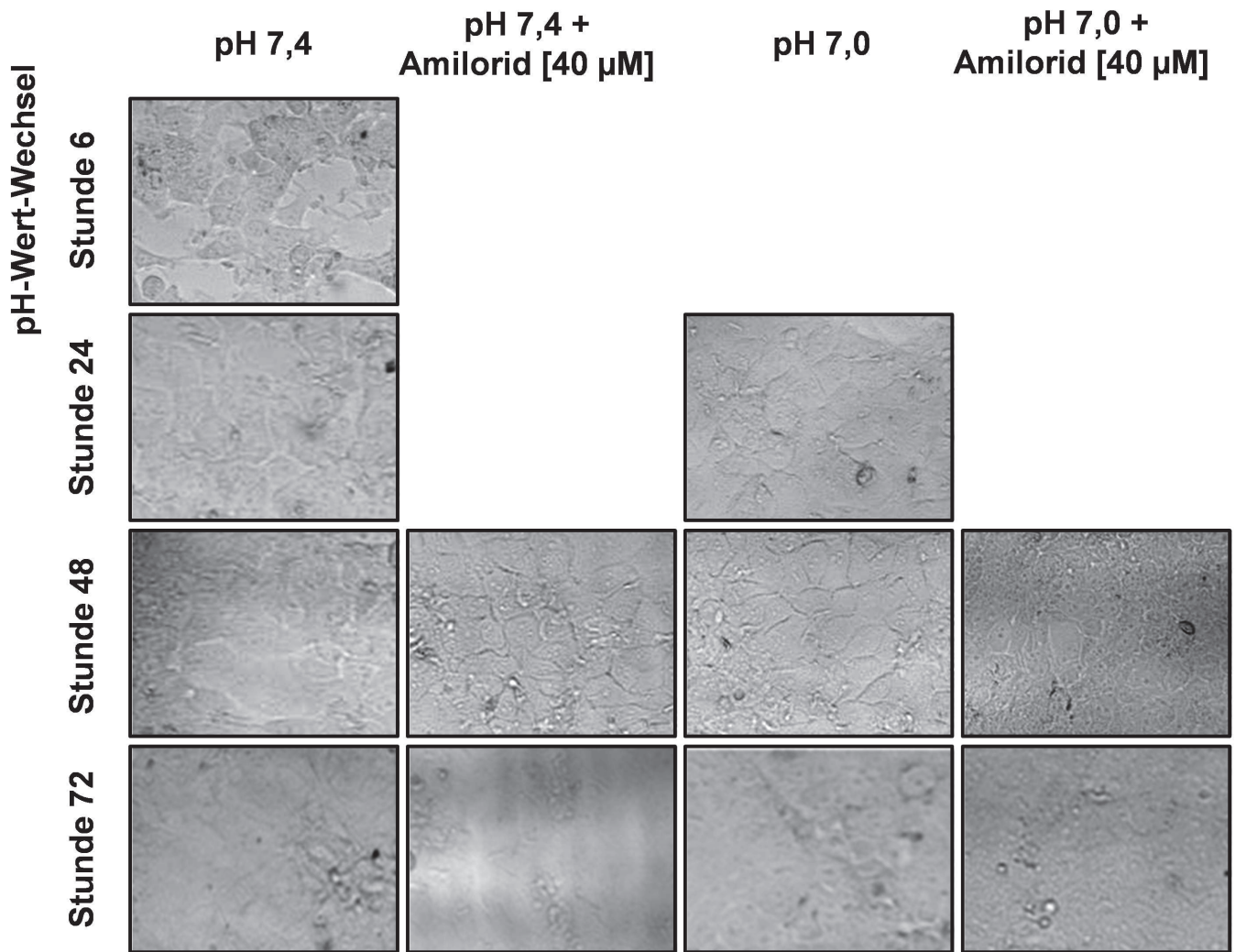
Desweiteren wurden diese Effekte von Amilorid [40 µM] bei unterschiedlichen pH Werten (pH 7,4, 7,0, 6,5, 6,0) analysiert. In Abb. 2-27 dargestellt sind dynamische Veränderungen des Sauerstoffverbrauchs von MCF-7 Zellen als Folge der Amilorid-Zugabe [40 µM] nach Azidifikation der extrazellulären Umgebung. Alle Kulturen wurden in den ersten sechs Stunden der IMR-Messung in Kulturmedium mit pH-Wert 7,4 inkubiert. Anschließend erfolgte bei einem Teil der Kulturen ein Absenken des Medien-pH-Werts auf pH 7,0, 6,5 oder 6,0 oder ein gleichbleibender pH-Wert von 7,4 über den weiteren Verlauf der Messung.

Die Zugabe von Amilorid [40 µM] resultiert bei extrazellulären pH-Werten von 7,4 und 7,0 in einer signifikanten Hemmung des Sauerstoffverbrauchs, bei pH-Werten von 6,5 und 6,0 ist keine signifikante Hemmung im Vergleich zu den entsprechenden unbehandelten Kulturen zu erkennen (Abb. 2-27a, b).

Die zu verschiedenen Messzeitpunkten aufgenommenen lichtmikroskopischen Bilder zeigen keine Unterschiede der Zellmorphologie zwischen behandelten und unbehandelten Kulturen bei den jeweiligen pH-Werten (Abb. 2-27c). Der Wirkungseffekt scheint sich lediglich in der metabolischen Aktivität und nicht in der Zellmorphologie zu manifestieren. Morphologische Veränderungen treten hingegen in Abhängigkeit vom extrazellulären pH-Wert auf (Abb. 2-27c). Da zur Konstanthaltung des Medien-pH-Wertes dieses gepuffert werden musste, konnten keine auswertbaren Daten zur Ansäuerungsaktivität gemessen werden. Alle Daten wurden zwei Mal reproduziert.



a



b

Sauerstoffverbrauch

	pH 7,4 Amilorid - pH 7,4 unbehandelt	pH 7,0 Amilorid - pH 7,0 unbehandelt	pH 6,5 Amilorid - pH 6,5 unbehandelt	pH 6,5 Amilorid - pH 6,5 unbehandelt
Stunde 24	0,73976	0,55297	0,27216	0,87497
Stunde 48	0,02682	0,03698	0,29755	0,93019
Stunde 72	0,02099	0,02176	0,78830	0,74526

c

pH 6,5 pH 6,5 +
Amilorid [40 µM] pH 6,0 pH 6,0 +
Amilorid [40 µM]

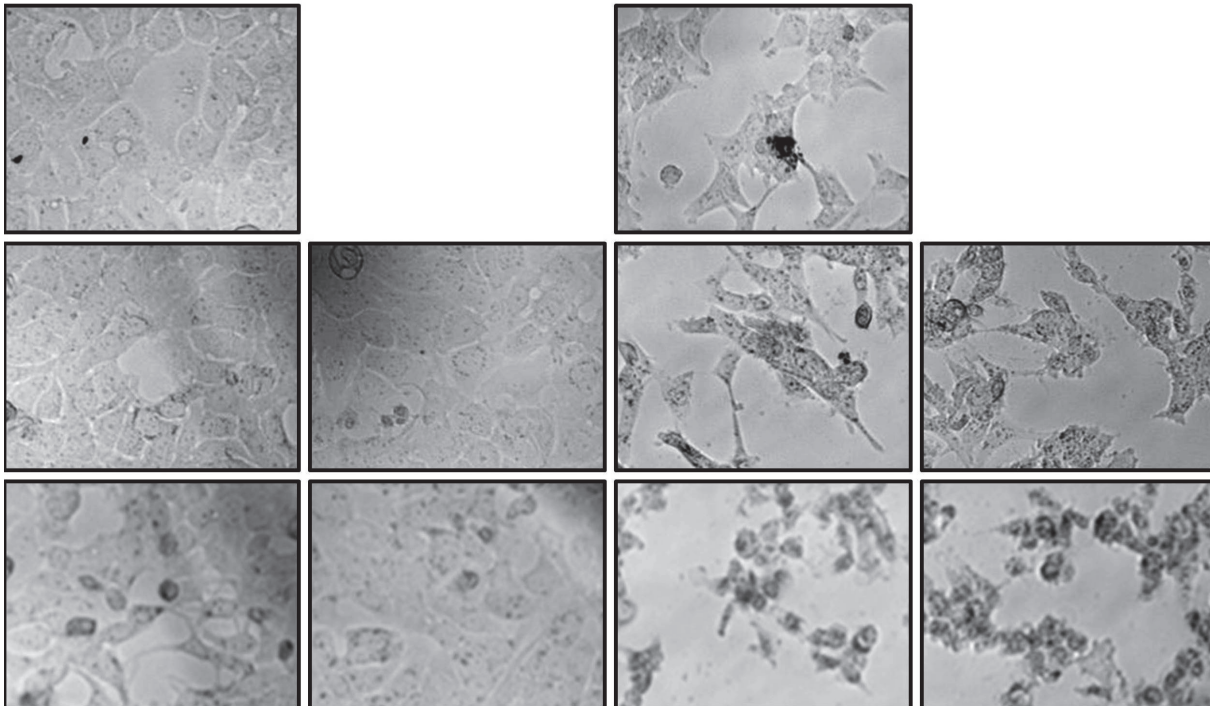


Abb. 2-27: pH-Wert abhängige Amilorid-Effekte auf den Sauerstoffverbrauch von MCF-7 Zellen

(a) Dynamische Veränderungen des Sauerstoffverbrauchs von MCF-7 Zellen in Abhängigkeit von extrazellulären pH-Wert-Bedingungen und Amilorid-Behandlungen. Angegeben sind die Stunden nach Testbeginn. Dargestellt sind Mittelwerte gleich behandelte MCF-7 Kulturen (n=3). Die Daten wurden auf den Zeitpunkt des pH-Wert-Wechsels normiert. Alle Kulturen wurden in den ersten sechs Stunden der IMR-Messung in Kulturmedium mit pH-Wert 7,4 inkubiert. Anschließend erfolgte bei einem Teil der Kulturen ein Absenken des Medien-pH-Werts auf pH 7,0, 6,5 oder 6,0 über den weiteren Verlauf der Messung. Nach 24 Stunden Messdauer wurde Amilorid [40 µM] zu einem Teil der Zellkulturen zugegeben über den gesamten weiteren Verlauf der Messung. (b) Zu verschiedenen Messzeitpunkten aufgenommene lichtmikroskopische Bilder des jeweils gleichen Wells (Vergrößerung 100-fach). Morphologische Veränderungen treten in Abhängigkeit vom extrazellulären pH-Wert, jedoch nicht in Abhängigkeit von einer Wirkstoffzugabe auf. (c) Der t-Test bestätigt die Signifikanz des Einflusses verschiedener extrazellulärer pH-Werte auf die durch Amilorid induzierte Hemmung des Sauerstoffverbrauchs im Vergleich zu unbehandelten Kulturen. *grün*: Unterschied zu unbehandelten Proben signifikant ($p < 0,05$). *schwarz*: Unterschied zu unbehandelten Proben nicht signifikant ($p > 0,05$).

3 Diskussion und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, auf der Basis des neuentwickelten sensorbasierten IMR-Testsystems^{28,29} einen prädiktiven metabolischen Chemosensitivitätstest für die Tumorthapie zu entwickeln und auf sein Potenzial für zukünftige klinische Anwendungen an humanen Tumorgewebeproben zu testen²⁶. Anhand von Veränderungen der metabolischen Aktivität sollte zwischen Sensitivität und Resistenz individueller humaner Mammakarzinom-Gewebeproben gegenüber verschiedenen chemotherapeutischen Wirkstoffen differenziert werden.

Um mehrtägige metabolische Messungen durchführen zu können, musste ein speziell auf die Anforderungen an Chemosensitivitätstests mit dem Testsystem abgestimmtes standardisiertes Präparations- und Messprotokoll entwickelt werden. Dieses Ziel wurde durch die Definition einer Standard Operating Procedure (SOP), beschrieben in Abschnitt 4, umgesetzt.

Die erreichten Ziele bezüglich der Anforderungen an einen aussagekräftigen prädiktiven Chemosensitivitätsassay sowie die Verbesserungsmöglichkeiten der metabolischen Messungen mit dem IMR-System werden im Folgenden im Vergleich mit anderen derzeit verfügbaren Chemosensitivitätsassays diskutiert. Zunächst werden die allgemeinen Einflüsse auf die prädiktive Aussagekraft von in vitro Chemosensitivitätsmessungen zusammengefasst. Anschließend werden die Möglichkeiten und Limitierungen derzeit verfügbarer Chemosensitivitätstests diskutiert und mit den Eigenschaften des IMR-Systems verglichen. Danach wird auf die wichtigsten Aspekte der Entwicklung des Präparations- und Messprotokolls eingegangen. Es folgt eine Diskussion der Validierung des Messsystems anhand herkömmlicher Methoden und einer Zelllinie. Weiterhin werden die Ergebnisse mehrtägiger Chemosensitivitätstests von verschiedenen humanen Mammakarzinom-Proben analysiert. Der darauf folgende Abschnitt befasst sich mit den Perspektiven der personalisierten Medizin in der Onkologie. Abschließend werden mögliche Einsatzgebiete des Messsystems, vor allem im medizinischen Bereich, beschrieben und erforderliche Optimierungen diskutiert.

3.1 Einflüsse auf den prädiktiven Wert von Chemosensitivitätstests

Die wichtigsten Aspekte für einen sinnvollen molekularen oder metabolischen Chemosensitivitätstest sind Spezifität und Sensitivität der prädiktiven Aussage. Um einen aussagekräftigen Chemosensitivitätstest zu erhalten, müssen alle Faktoren, die Einfluss auf die Sensitivitätseigenschaften einer Tumorzelle haben können, in den Test mit einbezogen werden. Hierbei spielt die Heterogenität der Tumor-Mikroumgebung eine ausschlaggebende Rolle.

3.1.1 Tumorerheterogenität

Die Interaktionen zwischen Krebszellen und den Zellen ihrer Umgebung generieren einen Kontext, der das Tumorwachstum begünstigt und die Sensitivitäts- und Resistenzeigenschaften der einzelnen Tumorzellen verändert. Hierbei spielen die pH-Eigenschaften des Gewebes, die Gewebesauerstoff-

konzentration und die Eigenschaften der vorhandenen Tumor- und Nicht-Tumorzellen eine gravierende Rolle^{39,42,45,84,86}.

Durch Mutationen der Karzinomzellen (klonale Diversifizierung), die spontan, aber auch durch Veränderungen der extrazellulären Umgebung ausgelöst werden, kommt es zu einer Heterogenität der Sensitivitäts- und Resistenzeigenschaften verschiedener Bereiche innerhalb eines Tumors^{39,67,101,102}.

Bei den durch die Tumor-Mikroumgebung ausgelösten Resistenzeigenschaften spielen, wie in Abschnitt 1.6.2 beschrieben, folgende Faktoren eine führende Rolle:

- Die zumeist unkoordinierte Durchblutung des Tumors determiniert die verfügbare Zytostatika-Konzentration im Gewebe⁴⁸.
- Der Gewebe-pH-Wert beeinflusst die Diffusion und Aktivität von Wirkstoffen^{102,108}.
- Hypoxische Eigenschaften des Gewebes vermindern das Ansprechen auf Therapien^{79,82}.
- Interaktionen mit Nicht-Tumorzellen verändern die Eigenschaften von Tumorzellen¹²⁷.
- Tumorassoziierte Gewebezellen besitzen eine eigene spezifische Sensibilität gegenüber Zytostatika, die die Reaktion des gesamten Tumors auf eine Therapie beeinflusst⁸⁶.

Für die Genauigkeit der prädiktiven Aussage eines Chemosensitivitätstests spielt es somit eine große Rolle, in wie weit die variierenden Bedingungen der Mikroumgebung verschiedener Tumorbereiche in den Test und die Ergebnisanalyse einbezogen werden können.

3.1.2 Dateninterpretation

Die Zuverlässigkeit der Aussage über Chemosensibilität hängt stark von den verwendeten Definitionen von Chemosensitivität und Chemoresistenz ab. Die Kriterien hierfür müssen bei jedem Test eindeutig gewählt werden. Dies erfordert aufwändige, aussagekräftige klinische Studien, welche für die meisten verfügbaren Chemosensitivitätsassays bisher kaum vorliegen.

3.2 Möglichkeiten und Limitierungen aktueller Ansätze zur Chemosensitivitäts-Analyse

Der Aufbau und Ablauf eines Chemosensitivitätstests beeinflussen gravierend das Testergebnis und dessen Genauigkeit. Grundsätzlich sind Unterschiede in den Messergebnissen der verschiedenen molekularen und Proliferations-Assays auf die technische Durchführung, besonders aber die verwendeten Marker zur Bestimmung von Sensitivität oder Resistenz zurückzuführen. Diese Faktoren müssen in der Dateninterpretation adäquat berücksichtigt werden.

Da bisher für keines der derzeit verfügbaren Testprinzipien, d.h. sowohl für molekulare als auch metabolische Chemosensitivitätsassays, keine eindeutigen Studienergebnisse vorliegen, lässt sich derzeit keine abschließende Aussage darüber treffen, welches Testprinzip eine größere Genauigkeit in der prädiktiven Aussage bietet. Hier sind weitere umfangreiche klinische Studien nötig.

3.2.1 Molekulare Testmethoden

Die rasanten Fortschritte im Bereich der DNA- und Protein-Microarray-Technik weisen, basierend auf bereits verfügbaren Daten, auf ein zukünftiges Potenzial für individuelle onkologische Diagnostik und personalisierte Therapie hin. Die Möglichkeit des Hochdurchsatz-Screenings erlaubt die Analyse einer Vielzahl noch nicht bekannter molekularer Marker. Diese ermöglichen eine weitere Unterteilung der genetisch heterogenen Subgruppen, die auch bei histologisch gleich klassifizierten Tumoren auftreten. Auf dieser Basis können zukünftig weitere, noch gezieltere Therapien entwickelt werden^{10,13,14,16,18,38,47,49,50,87}.

Gen- und Protein-Expressionsanalysen^{169-171,206,207} bieten die Möglichkeit, auf der Basis der Expression definierter Schlüsselenzyme Prognosen über den Krankheitsverlauf und das individuelle Rezidiv-Risiko, sowie prädiktive Aussagen über den Erfolg zielgerichteter molekularer Therapie-Regime zu treffen^{10,13,14,16,18,40,49,51,52,89}. Bisher haben diese Methoden jedoch noch nicht den Status des routinemäßigen Einsatzes in der klinischen Praxis erreicht.

Das Rezidiv-Risiko einer Brustkrebserkrankung, welches mit dem grundsätzlichen Nutzen einer Chemotherapie in Zusammenhang steht, lässt sich anhand der Expressionsstärke der proteolytischen Enzyme uPA und PAI-1 abschätzen^{12,47,89}. Diese sind verantwortlich für die Metastasierungsfähigkeit und Invasivität eines Tumors. Prognosen auf der Basis von Markern der Metastasierungsfähigkeit besitzen nachgewiesenermaßen eine hohe Vorhersagegenauigkeit und sind als Prognosemarker in der Onkologie akzeptiert². Analysemethoden wie bspw. der MammaPrint-Assay oder Oncotype DX-Test können derzeit nur bei bestimmten Gruppen von Brustkrebspatientinnen sinnvoll eingesetzt werden^{10,51}.

Schlüsselrollen für ein verstärktes Tumorwachstum spielen überaktive Hormon- und Wachstumsfaktor-Rezeptoren (HER2, Östrogen, Progesteron)^{14,19,49} und intrazelluläre Tyrosinkinase, die an Signalwegen beteiligt sind, an deren Ende das Induzieren der Zellproliferation und verstärkte metabolische Aktivität stehen (z.B. Abl, Src, Ras, Ki67, Rb, Myc, Akt, Bcl2, s. Abb. 1-5)^{13,16,38,40,50,53,54}. Genetische Expressionsanalysen (z.B. FEMTELLE-uPA/PAI-1-Test^{12,47,171}, OncotypeDX^{52,169} und Mammaprint-Assay^{10,51,170}) identifizieren diese individuell überaktiven proliferations- und metastasierungsfördernden Faktoren und ermöglichen einen gezielten Einsatz von Antihormontherapien und Tyrosinkinase-Inhibitoren^{15-19,40,49}.

Jedoch unterliegt der prädiktive Wert dieser Assays methodenbedingten, nicht zu unterschätzenden Limitierungen. Die Analyse der DNA- und Proteinexpression einer Zelle kann zwar einen Hinweis auf das Vorhandensein oder eine Überexpression bestimmter Zielmoleküle geben, jedoch lässt die reine Expression eines einzelnen Proteins nicht zwangsläufig auf eine bestimmte phänotypische Reaktion der Zelle schließen^{21,22,55,208}. Aufgrund des sehr komplexen, dynamischen und redundanten Zusammenspiels zwischen Proteinen intrazellulärer Signalwege kann selbst bei einem wirkstoffinduzierten Aktivitätsverlust eines Proteins die Signalgebung zur Proliferation aufrecht erhalten werden^{21,22}. Diese Resistenzmechanismen einer Zelle gegenüber Chemotherapeutika lassen sich mit Gen- und Proteinexpressions-Assays nicht identifizieren. Genexpressions-Analysen liefern weiterhin lediglich eine Momentaufnahme des aktuellen genotypischen Zustands einer Zelle. Es lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob die für den Therapieerfolg verantwortlichen Proteine über einen längeren Zeitraum exprimiert werden und Einfluss auf die Chemosensitivität haben^{21,22}. Außerdem können Gen- und Protein-Expressions-Analysen sowie Tests auf der Basis von Einzelzellsuspensionen (Abschnitt 1.7)

über die, für die Sensitivitätseigenschaften eines Tumors ausschlaggebenden Faktoren der Tumormikroumgebung keine Informationen liefern.

3.2.2 Metabolische Testmethoden

Metabolische Testmethoden, zu denen auch das in dieser Arbeit beschriebene sensorbasierte Testsystem gehört, bieten die Möglichkeit, Sensitivität und Resistenz von individuellem lebendem Tumorgewebe anhand von Veränderungen der metabolischen Aktivität als Reaktion auf eine Wirkstoffzugabe zu analysieren.

Ein großer Einfluss auf die Testaussage kann der Länge des Analyse-Zeitraums zukommen. Bei vielen Zytostatika, wie bspw. DOX, tritt aufgrund ihres Wirkmechanismus der zytostatische Effekt erst nach mehreren Tagen ein, da sie bevorzugt auf die Zellteilung wirken^{111,117}. Eine zu kurze Testdauer von Proliferationstests kann somit zu falsch negativen Ergebnissen führen, da im Testzeitraum nicht proliferierende, aber chemosensitive Tumorgewebeproben fälschlicherweise als resistent gegenüber dem Wirkstoff interpretiert werden. Auch in einer Probe möglicherweise vorhandene, wenig proliferierende Tumorstammzellen können somit nicht in die Aussage über Chemosensitivität oder Resistenz mit einbezogen werden. Dies begründet die relativ niedrige Vorhersagegenauigkeit der Chemosensitivität der bisher verfügbaren Assays^{116,154}.

Für die Untersuchung langsam auf den Zellmetabolismus wirkender Zytostatika und im Hinblick auf langsam proliferierende Tumorzellen sollte somit ein möglichst langer Zeitraum eines Chemosensitivitätstests gewählt werden. Jedoch ergeben sich auch hierbei Probleme bei der Interpretation der Chemosensibilität von explantierten Tumorgewebeproben: neben dem Vitalitätsverlust als Folge der Explantation, kann es zu Veränderungen der metabolischen und Proliferationsaktivität als Reaktion auf die *ex vivo* Gewebekulturbedingungen kommen^{204,209}. Eine verstärkte Proliferationsrate resultiert in häufigeren Mutationen Tumorzellen, die die Chemosensitivität gravierend beeinflussen und somit das Testergebnis verfälschen können²¹⁰. Um einerseits eine für den Wirkeintritt von Zytostatika ausreichende Zeitspanne zu gewährleisten, andererseits aber das Risiko der Ergebnisverfälschung durch Mutationen zu minimieren, muss der Zeitraum eines Chemosensitivitätstests sorgfältig ausgewählt und in die Dateninterpretation mit einbezogen werden.

Ein großes Problem bei der Interpretation von Wirkungseffekten bei metabolischen Chemosensitivitätsassays ist eine möglicherweise sehr große Differenz zwischen der exakt bekannten Wirkstoffkonzentration *in vitro* und der nur schwer abschätzbaren, tatsächlich erreichbaren individuellen Konzentration des Therapeutikums *in vivo*^{108,127}. Die effektiv *in vivo* erreichbare Wirkstoffdosis hängt von individuellen physiologischen Parametern ab wie Nierenfunktion, Leberfunktion, Herz-/Kreislauf-Situation und Tumorgewebeeigenschaften^{101,102}. Die im Blut-Plasma von Patienten maximal erreichbare DOX-Dosis liegt bei ca. 5 µM, allgemein jedoch bei 1-2 µM¹¹¹. Eine CAA-Konzentration von 40 µM kann im Plasma erreicht werden²¹¹. Da die Ausprägung zellulärer Effekte einer Zytostatika-Behandlung stark mit der eingesetzten Wirkstoffdosis korreliert¹¹¹, ist die Wahl der für den individuellen Chemosensitivitätstest geeigneten Wirkstoffkonzentration somit schwierig. Dies verringert die Vergleichbarkeit mit der *in vivo* Situation. Liegt die effektive therapeutische Dosis deutlich unter der im Test eingesetzten, liefert der Chemosensitivitätsassay möglicherweise ein falsch positives Ergebnis. Dies begründet, dass Sensitivitätstests eine höhere Fehlerquote aufweisen als einfache Chemoresistenztests.

3.3 Potenzial sensorbasierter metabolischer Testmethoden

In den letzten Jahren wurde verstärkt der Ansatz verfolgt, mithilfe sensorbasierter Systeme die metabolische Aktivität und Morphologie individueller Tumorgewebeproben anhand extrazellulärer Parameter zu untersuchen²⁴⁻²⁶. Hierbei werden im Gegensatz zu Gen- und Protein-Expressionstests nicht nur einzelne intrazelluläre Proliferations- oder Metabolismus-Marker bestimmt, sondern die aus den komplexen, intrazellulär ablaufenden Mechanismen resultierende Gesamtheit der phänotypischen Reaktionen *in vitro* analysiert. Chemosensitivität oder Resistenz wird anhand der wirkstoffinduzierten Veränderungen der Vitalität oder Morphologie von Tumorzellen definiert. Alle derzeit erhältlichen sensorbasierten Systeme (xCELLigence-System¹⁸⁶, ECIS-System¹⁸¹, Cytosensor Microphysiometer¹⁸⁴, CellKey-System¹⁸⁴, XF-Analyser¹⁹³, Bionas 2500 Discovery-System¹⁹⁵, IMOLA^{35,196}, IMR-System^{31,32}) sind bisher noch nicht ausreichend klinisch validiert und für die Routinediagnostik zugelassen.

Im Folgenden werden die Vor- und Nachteile von sensorbasierten Methoden anhand des in dieser Arbeit eingesetzten IMR-Systems analysiert und den derzeit verfügbaren sensorbasierten Assays gegenübergestellt.

Multiparametrische Analysen

Multiparametrische Messungen mit dem hier beschriebenen Messsystem ermöglichen eine direkte Korrelation der vier relevanten Parameter des Zellmetabolismus und der Morphologie untereinander, wodurch der Informationsgehalt und die Aussagekraft dieses Systems gegenüber herkömmlichen Chemosensitivitätsassays oder genetischer Analysen gravierend gesteigert wird.

Bei einigen im Handel erhältlichen sensorbasierten Analyse-Systemen wird jedoch lediglich ein einzelner Parameter analysiert und auf dieser Basis Aussagen über die metabolische Aktivität und Vitalität getroffen (xCELLigence-System^{186-188,190}, ECIS-System¹⁸¹⁻¹⁸³, CellKey-System^{184,191}).

Viele durch extrazelluläre Stimuli ausgelöste zelluläre Reaktionen manifestieren sich zunächst auf genetischer Ebene und im Zellmetabolismus. Erst nach einem längeren Zeitraum zeigen sie sich auch in der Morphologie oder dem Anheftverhalten von Zellen. Dies wird am Beispiel der Behandlung von MCF-7 Zellen mit den Zytostatika CAA und DOX deutlich (Abb. 2-20, Abb. 2-22). Es ist möglich, dass durch einen Wirkstoff die Zellmorphologie gar nicht beeinflusst wird, wie aus der in Abb. 2-27 dargestellten Messung, am Beispiel der Effekte von variierenden extrazellulären pH-Werten und des Effekts des NHE-1 Inhibitors Amilorid, ersichtlich wird. Es ist somit problematisch, auf der Grundlage nur eines Parameters auf die komplexen, in der Zelle ablaufenden metabolischen Prozesse und pharmakologischen Reaktionen zu schließen²¹. Hierdurch kann es zu Fehlinterpretationen der Testergebnisse kommen.

Markerfrei

Die markerfreie Bestimmung des Gehalts an Gelöstsauerstoff im Kulturmedium ermöglicht Rückschlüsse auf den zellulären Sauerstoffverbrauch und somit eine Abschätzung der mitochondrialen Aktivität. Veränderungen des Medien-pH-Werts erlauben Rückschlüsse auf die Ansäuerungsaktivität und somit eine Abschätzung der glykolytische Aktivität von Zellen und Geweben^{25,26}. Messungen der Zellimpedanz ermöglichen Aussagen über das Anheftungsverhalten von Zellen am Substrat. Die Zellmorphologie wird mit mikroskopischen Aufnahmen dokumentiert. Die Datenerfassung des nicht

invasiven sensorbasierten IMR-Messsystems wird nicht nach dem Prinzip der Endpunktmethode durchgeführt, sondern erfolgt für denselben Gewebeschnitt dynamisch über den gesamten Testzeitraum. Die kontinuierliche Datenaufzeichnung erlaubt Analysen der metabolischen Aktivität jeder einzelnen Probe mit hoher zeitlicher Auflösung vor, während und nach einer Wirkstoffzugabe^{27,176-179} (Abb. 3-2). Die Messung der relativen metabolischen Änderungen ermöglicht somit eine von der absoluten Zellzahl eines Gewebeschnitts unabhängige Analyse.

Echtzeitmessung

Erfassung und Analyse der Messdaten finden beim IMR-System in Echtzeit statt. Hierbei lassen sich sieben Messpunkte pro Well und 20 minütigem Pipettierzyklus sowie ein Foto aufzeichnen. Dank der Echtzeit-Datenanalyse kann der Anwender in den Verlauf der Messung jederzeit interaktiv eingreifen. Durch die hohe Datenrate sind dynamische Analysen schneller Veränderungen des Zellmetabolismus möglich. Die Genauigkeit der Messdaten und deren Interpretation wird durch die simultane Messung mehrerer zellulärer Parameter^{28,201} gravierend erhöht.

Automatisierung und Messzeitraum

Einige Publikationen demonstrieren das Potenzial von Chemosensitivitätstests anhand von Zelllinien²¹²⁻²¹⁴, primären Tumorzellsuspensionen^{23,27} oder Mammakarzinom-Gewebeschnitten^{24,26}. Bisher wurden jedoch nur wenige Messungen mit sensorbasierten Messsystemen an primären humanen Gewebeproben über einen Zeitraum von mehr als 24 Stunden veröffentlicht²⁶. Kurze Testzeiträume wurden einerseits wegen eingeschränkter Gewebe-Vitalität gewählt, andererseits wegen technischer Limitationen der Messmethode, wie bspw. Probleme bei der Versorgung mit Nährmedien (xCELLigence-System¹⁸⁶ und XF Analyser¹⁹³).

Aufgrund der in dieser Arbeit entwickelten und optimierten SOP für die Probenpräparation ließen sich die Überlebensdauer des Primärgewebes und damit der Messzeitraum im IMR-System auf vier bis fünf Tage verlängern²⁶. Durch Automatisierung der Abläufe und Verwendung mikrofluidischer Systeme lässt sich der Proben-Durchsatz erheblich steigern und gleichzeitig der Arbeits- und Kostenaufwand reduzieren²¹⁵. Die simultane Messung von 24 Wells mit dem IMR-System ermöglicht es, eine größere Anzahl Wirkstoffe an einer Probe parallel zu untersuchen und direkt miteinander zu vergleichen. Dies erhöht die statistische Signifikanz der Messergebnisse. Die bisher verfügbaren sensorbasierten metabolischen Assays mit Fluidiksystem erlauben hingegen maximal sechs bis acht parallele Messungen^{184,195,196}. Zur weiteren Optimierung des IMR-Systems ist ein Verfahren für parallele Untersuchungen von 96 Proben geplant.

Mithilfe des IMR-Systems können dank der dynamischen, mehrtägigen und multiparametrischen Messungen sowohl kurzfristige Effekte auf den Zellmetabolismus und die Morphologie erfasst, als auch komplexe längerfristige Wirkmechanismen von Medikamenten und Veränderungen der Apoptose- und Proliferationseigenschaften von Zellen und Geweben analysiert werden^{26,201,216}.

Problematisch bei allen metabolischen und Proliferationstests ist, dass Zellen sich mit der Zeit an veränderte Umgebungsbedingungen anpassen, und sich dadurch ihre ursprünglichen Sensitivitäts- und Resistenz-Eigenschaften verändern können. Im Gegensatz zu mikrofluidischen Systemen verändert sich bspw. bei dem XF Analyser¹⁹³ die Zusammensetzung des Kulturmediums im Verlauf der Messung unkalkulierbar, da dieses nicht komplett ausgetauscht werden kann.

3.3.1 Modifikationen der extrazellulären Bedingungen

Im Gegensatz zu Gen- und Protein-Expressionsanalysen bieten mikrofluidische, sensorbasierte Messsysteme die Möglichkeit, sich verändernde extrazelluläre Bedingungen zu simulieren. Die Zusammensetzung des Kulturmediums bezüglich des Sauerstoffgehalts und des pH-Werts, aber auch die Nährstoffverfügbarkeit können gezielt variiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden am Beispiel der MCF-7 Zelllinie die Effekte der in Tumoren häufig variierenden extrazellulären pH-Bedingungen auf den Sauerstoffverbrauch untersucht. Es zeigte sich eine zur extrazellulären Ansäuerung (pH 6,5 und pH 6,0) proportionale Abnahme des Sauerstoffverbrauchs, was auf eine Hemmung der mitochondrialen Aktivität als Folge einer intrazellulären Ansäuerung hindeutet. Jedoch resultiert der Wechsel des Medien-pH von 7,4 auf 7,0 in einer Zunahme des Sauerstoffverbrauchs der Zellen (Abb. 2-25). Möglicherweise ist dies, bedingt durch das Absinken des intrazellulären pH-Levels, auf einen gestiegenen Energiebedarf zur verstärkten Aktivierung und Expression von Na^+/H^+ -Antiportern und weiterer membrangebundener Ionen-Transportsysteme zurückzuführen²¹⁷. Eine Zugabe des NHE-1-Antiporter-Hemmers Amilorid demonstrierte die Abhängigkeit der Aktivität eines Wirkstoffes von dem extrazellulären pH-Milieu. Im Vergleich zu der deutlichen Hemmung des Sauerstoffverbrauchs in Bereichen von einem extrazellulären pH-Wert von 7,0 und höher, hat Amilorid bei extrazellulären pH-Werten von 6,5 und 6,0 keinen Effekt auf die Sauerstoffverbrauchsrate der Zellen (Abb. 2-27). Auch für die Wirksamkeit von Zytostatika wie bspw. DOX, Cyclophosphamid oder 5-FU wurde eine starke Abhängigkeit vom intra- und extrazellulären pH-Wert nachgewiesen^{108,218}. Dieser Aspekt wurde bisher bei Chemosensitivitätsanalysen nicht berücksichtigt.

3.4 Entwicklung eines sensorbasierten metabolischen Chemo-sensitivitätstests

3.4.1 Anforderungen an einen klinisch routinemäßig einsetzbaren Chemo-sensitivitätstest mit hohem prädiktiven Wert

Die in der Einleitung in Abschnitt 1.10 beschriebenen Faktoren, welche den prädiktiven Wert eines Chemosensitivitätstests determinieren, sowie die Anforderungen an die klinische Anwendbarkeit sind in Tabelle 3-1 zusammen gefasst. Diese Anforderungen wurden an den in dieser Arbeit zu entwickelnden Chemosensitivitätstest gestellt.

Tabelle 3-1: Anforderungen an einen klinisch routinemäßig einsetzbaren Chemosensitivitätstest mit hohem prädiktivem Wert

Prädiktiver Wert	Klinische Anwendbarkeit
möglichst genaue Übereinstimmung des Testergebnisses mit der in vivo Chemotherapie	leichte Bedienbarkeit
hohe Evaluierbarkeit (>90%)	Automatisierung
geeignete Testparameter zur Bestimmung von Chemosensitivität und -Resistenz	günstige Kosten-Nutzen-Relation
Standardisierung und Reproduzierbarkeit in verschiedenen Labors	zeitnahes Ergebnis
definierter Endpunkt der Messung	Verwendung kleiner Probenmengen, z.B. Feinnadel-Biopsate oder Reste der histopathologischen Proben
objektive und klar definierte Kriterien für die Analyse und Interpretation der Daten (Definition von Chemosensitivität und Resistenz)	Anwendbarkeit für verschiedene Tumortypen
ausreichende Anzahl an Replikaten zur statistischen Evaluierung	

3.4.2 Analyse von Gewebeschnitten

Um möglichst in vivo nahe Analyse-Bedingungen zu schaffen, wurde in dieser Arbeit entschieden, einen Chemosensitivitätstest auf der Basis von Gewebeschnitten zu entwickeln. Ein wesentlicher Vorteil der Verwendung von Gewebeschnitten für Chemosensitivitätstests gegenüber Zellsuspensionen besteht darin, dass Proben in ihrem ursprünglichen Zellverband belassen werden. Im Gegensatz zur Verwendung von Zellsuspensionen verbessern die erhalten bleibenden Zell-Zell-Interaktionen innerhalb des Gewebeverbands die Aussagegenauigkeit des Assays. Nicht-Tumor-Zellen wie tumorassoziierte Fibroblasten^{42,83} und Immunzellen^{84,85} besitzen, wie oben beschrieben, einen vergleichbaren Einfluss auf die Progression und Chemosensitivität eines Tumors wie die einzelnen Karzinomzellen selbst und können somit den Erfolg einer Tumor-Therapie wesentlich mitbestimmen^{42,83,84,86,88}.

Ein genereller Kritikpunkt an Messungen einzelner Gewebeschnitte ist, dass diese nur einzelne Bereiche innerhalb eines Tumors widerspiegeln im Gegensatz zu Zellsuspensionen, die ein Gemisch aus Zellen des gesamten Tumors darstellen. Es stellt sich somit die Frage, ob die Ergebnisse der Chemosensitivitätstests an einzelnen Gewebeschnitten auf den gesamten Tumor übertragbar sind und eine repräsentative prädiktive Aussage für in vivo Chemotherapien liefern.

Als Lösungsansatz werden bei dem hier vorgestellten metabolischen Analysesystem 24 Gewebeschnitte aus verschiedenen Bereichen einer Gewebeprobe untersucht und statistisch ausgewertet (Abschnitt 2.4). Die Heterogenität der Gewebeeigenschaften spiegelt sich sowohl in der Stärke der Vitalitätssignale verschiedener Gewebeschnitte als auch in deren unterschiedlichen metabolischen Reaktionen auf Wirkstoffzugaben wider^{69,82} (Abb. 2-14).

3.4.3 Entwicklung eines Präparations- und Messprotokolls

Anforderungen und Umsetzung

Ziel war es, einen Chemosensitivitätstest mit hohem prädiktiven Wert zu entwickeln, der möglichst viele der genannten Anforderungen erfüllt und die Probleme der bereits verfügbaren Assays (s. Abschnitte 1.7, 1.8 und 3.2) umgeht. Hierfür wurden eine Reihe konkreter Anforderungen an die Präparation vitaler Mammakarzinom-Gewebeproben und die Durchführung der metabolischen Messungen gestellt:

- Erhaltung der Vitalität und Qualität des Primärgewebes über einen Messzeitraum von mindestens drei bis vier Tagen. Unbehandelte Gewebeproben dürfen über den gesamten Testzeitraum nur geringfügig an Vitalität verlieren, da dies für die Standardisierbarkeit des Tests sowie die Vergleichbarkeit unterschiedlich behandelter Gewebeschnitte einer bzw. unterschiedlicher Proben erforderlich ist.
- Die Präparation muss gewebsschonend und dabei praktikabel in der Durchführung sein.
- Möglichst genaue Nachstellung der physiologischen in vivo Bedingungen für aussagekräftige Ergebnisse.
- Ausreichend große Anzahl an Replikaten für statistische Signifikanz-Tests.
- Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit des Präparations- und Messprotokolls.

Diese Anforderungen konnten in der entwickelten SOP (Abschnitt 4) größtenteils umgesetzt werden. Die hierbei relevantesten Arbeitsschritte lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Präparation humaner Mammakarzinom-Gewebeproben im Testlabor unmittelbar vor der Messung.
- Dank der Schneidetechnik mit einem Vibratom Erhaltung einer hohen Vitalität bei wenig zeitaufwändiger und schonender Präparation.
- Metabolische Messungen an Gewebeschnitten. Diese spiegeln die individuelle tumorspezifische in vivo Mikroumgebung von Karzinomzellen mit größtmöglicher Genauigkeit wider.
- Standardisierung und Vergleichbarkeit der Messungen durch reproduzierbare Schnittgröße und Schnittdicke. 250 µm dicke Schnitte mit einem Durchmesser von 5 mm erweisen sich für metabolische Messungen mit dem IMR-System als am geeignetsten. Diese Schnittdicke gewährleistet eine zur Versorgung aller Gewebezellen ausreichende Diffusion von Nährstoffen und O₂ in alle Gewebeschichten.
- Eine Konzentration von 5% FCS im Messmedium zeigte sich in dieser Arbeit als geeignet zum Erhalt der Vitalität von Primärgewebe. Serumersatz scheint weniger geeignet, patienteneigenes Serum konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert werden.
- Durchführung der Messungen über einen Zeitraum von mindestens drei Tagen.
- Medienwechsel im 20-Minuten-Rhythmus, Wirkstoffzugabe 24 Stunden nach Start der Messung über einen Zeitraum von 24 Stunden.

Die Herstellung von Gewebeschnitten mit einem Vibratom erfordert einen geringeren zeitlichen und methodischen Aufwand als die Präparation von Sphäroiden¹⁷⁴ und Zellsuspensionen^{219,220}. Ein weiterer wesentlicher Vorteil ist die nur geringe Beeinflussung der Probe durch äußere mechanische und enzymatische Faktoren. Mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten SOP zur Probenpräpara-

tion und des Messprotokolls konnte die Proben-Vitalität über einen Zeitraum von mehr als vier Tagen erhalten werden.

Probleme bei der Entwicklung des Präparations- und Messprotokolls

Durch das in dieser Arbeit entwickelte Präparationsprotokoll für Mammakarzinom-Gewebe kann zwar eine gute Qualität der Gewebeschnitte über einen mehrtägigen Messzeitraum erhalten werden, jedoch besteht Verbesserungsbedarf hinsichtlich der Praktikabilität und des Zeitaufwands bei der Herstellung von Gewebeschnitten:

- Der Zeitaufwand des Schneidevorgangs muss verringert werden. Derzeit sind alternative Schneidemethoden in Entwicklung.
- Das Einlegen der Gewebeschnitte in die Messplatte ist umständlich.
- Zur Befestigung des Gewebes auf dem Probenteller des Vibratoms sollte eine Alternative zu dem möglicherweise zellschädigenden Kleber gefunden werden.
- Feinnadel-Biopsiematerial kann für metabolische Messungen mit dem IMR-System nicht verwendet werden. Die Anzahl der gewonnenen Zellen ist auch bei Verwendung etwas größerer Kanülen zu gering, um detektierbare Signale zu erzielen. Hierzu sind Modifikationen des Testsystems nötig, bspw. eine Verringerung des Kulturvolumens.

Anfängliche Messungen, die im Rahmen der Entwicklung des Präparations- und Messprotokolls durchgeführt wurden, lieferten nach 24 Stunden nur eine geringe Anzahl vitaler Gewebeschnitte. Unbehandeltes Gewebe zeigte eine rasch abnehmende Vitalität über den Verlauf der Messung bis hin zum Absterben der Proben (Abb. 2-8, Abb. 2-9, Abb. 2-10). Bei diesen Vitalitätsverlusten konnte nicht ausreichend zwischen möglichen Transportschäden, Präparations- oder technischen Problemen (bspw. einer schlechten Qualität der optischen Sensorspots oder Fehler beim Pipettiervorgang) differenziert werden.

Manuell hergestellte Gewebeschnitte zeigten stark variierende Schnittdicken resultierend in stark schwankenden Zellzahlen und somit metabolischen Signalstärken in der IMR-Messung (Abb. 2-14). Schnitte mit Dicken von über ca. 350 µm verhindern den Durchfluss des Mediums durch die Kulturkammer. Auch ist die Diffusion von O₂ und Nährstoffen in innere Zellschichten bei diesen Schnittdicken nicht gewährleistet. Zu dünne Schnitte hingegen besitzen eine zu geringe Zellzahl, um eine ausreichende detektierbare Signalstärke zu generieren. Weiterhin ist bei Schnitten einer Dicke von <150 µm der Prozentsatz an Zellen vermutlich sehr hoch, die durch den Schneidevorgang beschädigt werden²²¹. Für metabolische Untersuchungen mit dem Testsystem erwiesen sich Durchmesser von 5 mm und Dicken von Gewebeschnitten von 200 bis 250 µm als am besten geeignet. Diese Schnittdicken gewährleisten die Diffusion von Nährstoffen, O₂ und Wirkstoffen auch in tieferliegende Gewebeschichten^{178,221-223}.

Das Aufliegen der Gewebeschnitte auf einem Nylonnetzchen ermöglicht den Medien austausch an den Sensoren, birgt aber die Gefahr, dass die direkt auf dem Netz aufliegende Gewebereiche nicht mit Kulturmedium versorgt werden und absterben könnten (Abb. 3-1). Dies könnte dazu führen, dass die untersuchten Gewebeschnitte sich in ihren Sensitivitäts- und Resistenzeigenschaften nicht in vivo entsprechend verhalten. Hier sind Optimierungen, bspw. durch ein verändertes Layout der Messplatte und somit ein Vermeiden der Netzchen, sinnvoll.



Abb. 3-1: Mammakarzinom-Gewebeschnitt in einem Well der Messplatte

Aufsicht auf ein Well mit eingelegtem Nylonnetz und Gewebeschnitt (250 µm Dicke). Das Nylonnetz verhindert den direkten Kontakt der Probe mit den Sensoren auf dem Plattenboden. Vergrößerung 20x.

Die Behandlung während des Vorgangs der Explantation und des Transports zum Testlabor spielen neben einem schonenden Präparations- und Messprotokoll eine gravierende Rolle bei der Erhaltung einer hohen Vitalität von Primärgewebe. Schon während der Explantation oder des Transports kann es zu Schäden der Proben kommen, die einen erheblichen Vitalitätsverlust zur Folge haben. Eine Rolle spielen können hierbei eine mögliche Austrocknung des Gewebes nach der Explantation, eine nicht ausreichend kühle Lagerung, ein ungeeignetes Transportmedium oder eine zu lange Transportdauer (>24 Stunden). Im Rahmen dieser Arbeit konnten der Ablauf der Probenentnahme in der Klinik und der Transport nicht lückenlos nachvollzogen werden und deshalb bei der Interpretation der Messergebnisse nicht berücksichtigt werden. Es ist daher erforderlich, zusätzlich zu der im Rahmen dieser Arbeit etablierten SOP für Präparation und Messung, den Explantationsablauf und Probentransport zu standardisieren und zu dokumentieren. Die derzeitige Transportdauer von bis zu 24 Stunden sollte im Hinblick auf die Probenqualität deutlich verkürzt werden.

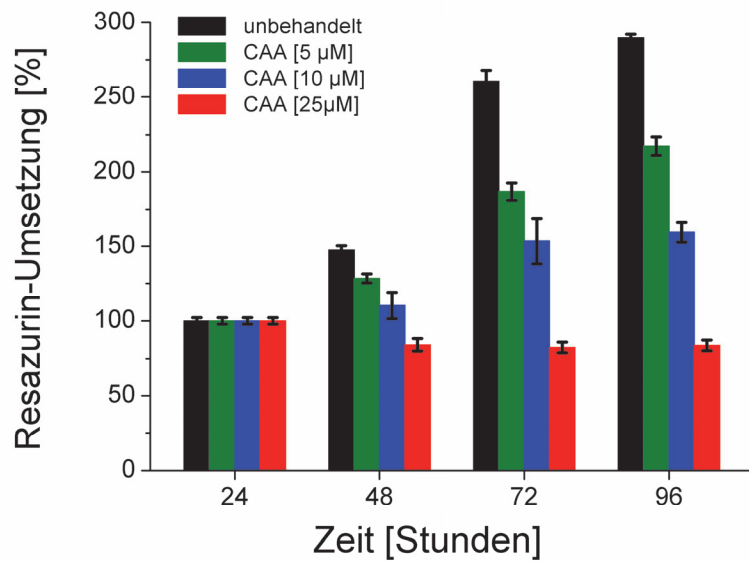
Mit der Definition und Festlegung einer SOP zur reproduzierbaren Herstellung von geeigneten Gewebeschnitten sowie den parallel durchgeführten technischen Optimierungen des Testsystems konnte die Anzahl der vitalen Schnitte pro Messung drastisch gesteigert und das Gewebe über einen Zeitraum von mehreren Tagen am Leben erhalten werden (Abb. 2-16, Abb. 2-10). Die parallelen Messungen von 24 Gewebeschnitten ermöglichen signifikante statistische Auswertungen. Der geringe Vitalitätsverlust der Gewebeschnitte erlaubt sensorbasierte metabolische Messungen über Zeiträume von mehr als vier Tagen.

3.5 Validierung der Aussagekraft des IMR-Systems

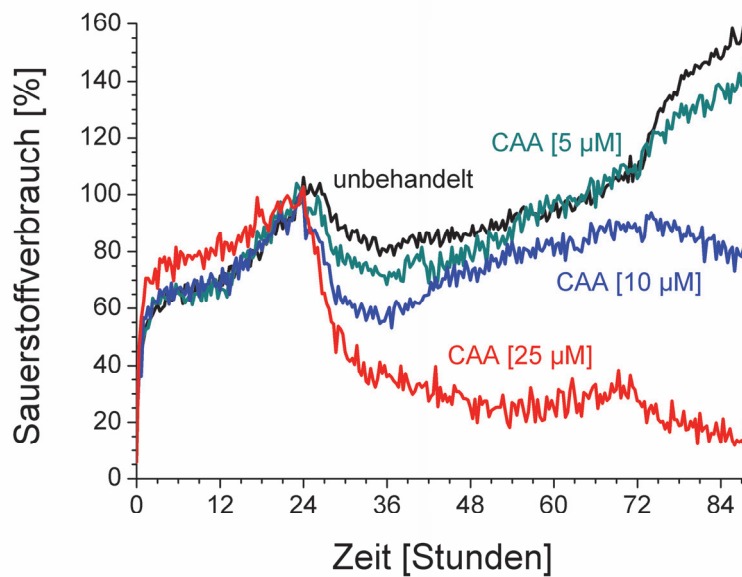
3.5.1 Metabolische Analysen mit herkömmlichen Methoden und mit dem IMR-System

Zur Validierung der Aussagegenauigkeit des IMR-Systems wurden mit der MCF-7 Zelllinie durchgeführte IMR-Messungen mit parallel und vergleichbar durchgeführten etablierten Endpunktassays verglichen. Als Vitalitätsparameter wurden bei den Messungen mit dem IMR-System der Sauerstoffverbrauch aus dem Kulturmedium, die Ansäuerung des Mediums und die Morphologie der Zellen betrachtet. Parallel wurden anhand etablierter Methoden die Vitalität (Resazurin-Test), die Proliferationsaktivität (Zellzahlbestimmung) und Morphologie (Fotoaufnahmen) der Zellen bestimmt. Die Ergebnisse zeigten im Vergleich zu den Messungen von Sauerstoffverbrauch, Ansäuerungsaktivität und Morphologie mit dem IMR-System prinzipiell vergleichbare dosisabhängige Effekte der Zytostatika CAA, DOX und 5-FU (Abb. 2-19, Abb. 2-20, Abb. 2-21, Abb. 2-22, Abb. 2-23, Abb. 2-24). Die Aussagen des IMR-Systems konnten somit anhand herkömmlicher etablierter Assays verifiziert werden.

Der direkte Vergleich demonstriert jedoch die Limitierungen in Informationsgehalt und Aussagekraft von Endpunktassays gegenüber sensorbasierten Methoden. In Abb. 3-2 sind Testergebnisse eines Resazurin-Tests und einer IMR-Messung gegenübergestellt. Endpunktanalysen erfordern für jeden Messzeitpunkt eine eigene Probe, wodurch eine sehr hohe Probenzahl benötigt wird. Da Schnitte aus einem individuellen humanen Tumor häufig eine sehr heterogene Gewebezusammensetzung aufweisen, kann deren metabolische Aktivität und Reaktion auf äußere Einflüsse wie Zytostatika-Behandlungen variieren^{39,70,101}. Dies verringert erheblich die Vergleichbarkeit der Messwerte der jeweiligen Zeitpunkte und somit die Aussagekraft des Endpunkttests. Über metabolische oder morphologische Veränderungen im Intervall zwischen den einzelnen Messpunkten können auf der Basis von Endpunktmethoden keine Rückschlüsse gezogen werden (Abb. 3-2a). Sensorbasierte Messsysteme hingegen ermöglichen basierend auf der nicht-invasiven Datenerfassung eine dynamische Analyse der metabolischen Aktivität eines Gewebeschnitts über den gesamten Testzeitraum mit hoher zeitlicher Auflösung^{26-28,176-179}. Dies erfasst eine Vielzahl von Informationen, die anhand Endpunktmethoden nicht erhalten werden können. Bspw. zeigt die in Abb. 3-2b dargestellte sensorbasierte Messung innerhalb der ersten 12 Stunden nach der Zugabe von CAA [25 µm] eine sehr starke, in den folgenden 12 Stunden jedoch moderate Verringerung des Sauerstoffverbrauchs von MCF-7 Zellen. Diese dynamischen Veränderungen können durch den alle 24 Stunden durchgeführten Resazurin-Test nicht dargestellt werden (Abb. 3-2a). Für eine bessere Kinetik müsste eine größere Anzahl an Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt werden.



a



b

Abb. 3-2: Limitierter Informationsgehalt von Endpunktmessungen im Vergleich zu sensorbasierten Methoden

Veränderungen der metabolischen Aktivität von MCF-7 Zellen als Folge einer CAA-Zugabe. (a) Vitalität gemessen durch den Resazurin-Test, (b) Gesamt-Sauerstoffverbrauch gemessen durch das IMR-System. Die IMR-Messung demonstriert dynamische, nicht linear verlaufende Veränderungen der metabolischen Aktivität als Folge einer Wirkstoffzugabe. Der Resazurin-Test lässt als Endpunktmethode keine Rückschlüsse auf metabolische Veränderungen der Proben im Intervall zwischen den Messpunkten zu. Da für jeden Messzeitpunkt eine eigene Probe benötigt wird, kann die Aussagekraft des Resazurin-Tests durch mögliche individuelle metabolische Aktivitäten verschiedener Proben herabgesetzt sein.

Im Gegensatz zu nicht-invasiven und markerfreien sensorbasierten Testsystemen erfordern Analysemethoden wie der Resazurin-Test die Zugabe von organischen oder reduzierenden Agentien zum Kulturmedium. Möglicherweise beeinflussen diese die metabolische Aktivität oder sind innerhalb eines nicht bestimmbareren Zeitraums toxisch für Zellen. Bei dem in dieser Arbeit als alternative Testmethode angewendeten Resazurin-Test werden laut Herstellerangabe, anhand der mitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität Rückschlüsse auf die Funktion der Mitochondrien gezogen. Hierbei ist jedoch nicht auszuschließen, ob nicht noch weitere, bisher nicht identifizierte mitochondriale und zytoplasmatische Enzyme an der Umsetzung des Farbstoffs beteiligt sind^{104,162}. Diese könnten die Regulation der mitochondrialen Atmung beeinflussen, von Resazurin jedoch nicht umgesetzt und somit durch die Messung nicht erfasst werden. Hierdurch kann die Aussage über die mitochondriale Aktivität verfälscht werden.

3.5.2 Validierung der Messergebnisse von Gewebeproben

Zur Validierung der mit dem IMR-System erhaltenen Ergebnisse von Mammakarzinom-Gewebeschnitten wurden diese mit identisch durchgeführten Messungen an der MCF-7 Zelllinie verglichen. Da für eine IMR-Messung 24 Gewebeschnitte mit Dicken von 250 µm und Durchmessern von mind. 5 mm benötigt werden, ist für eine Messung eine Gewebeprobe mit den Mindestmaßen von 0,7 cm x 0,7 cm x 6 cm bzw. zwei Proben mit den Maßen 0,7 cm x 0,7 cm x 3 cm erforderlich. Häufig war diese Gewebemenge aufgrund geringer Tumorgrößen jedoch nicht verfügbar. Deshalb waren parallele vergleichende Analysen mit bereits etablierten herkömmlichen Methoden (z.B. Resazurintest) nicht durchführbar, für die als Endpunktmethode eine weitaus größere Gewebemenge erforderlich gewesen wäre.

Metabolische Untersuchungen mit dem IMR-System an Tumorproben und Zelllinien lieferten nach Zugabe verschiedener Wirkstoffe gut übereinstimmende Ergebnisse. Es sind dosisabhängige Effekte auf die metabolische Aktivität der Zellen und der Gewebeschnitte zu beobachten (Abb. 2-20, Abb. 2-22, Abb. 2-24, Abb. 2-13). Die hemmende Wirkung von Zytostatika (CAA, DOX, 5-FU) auf die metabolische Aktivität von Tumorgewebeschnitten tritt im Vergleich zu den Zelllinien mit einer zeitlichen Verzögerung ein. Wie in Abb. 3-3 am Beispiel des Sauerstoffverbrauchs dargestellt, ist für einen ähnlich starken Wirkstoff-Effekt auf den Zellmetabolismus eine etwa doppelt so hohe Konzentration des Wirkstoffs im Vergleich zu Zelllinien erforderlich.

Bei Gewebeschnitten muss das Pharmakon durch mehrere Zellschichten diffundieren, um auf alle Gewebezellen einwirken zu können. Dies erklärt möglicherweise das verzögerte Auftreten der metabolischen Effekte. Desweiteren wird die Konzentration des aktiven Wirkstoffs gravierend durch die individuellen Eigenschaften des Tumorgewebes beeinflusst^{39,69,86,108,127}.

Im Gegensatz hierzu sind Einzelzellsuspensionen unmittelbar nach der Zugabe der Substanzen der gewünschten Konzentration ausgesetzt, resultierend in einer unmittelbaren Reaktion auf die Behandlung. Ein Vergleich mit einer früheren Studie mit einem ähnlichen sensorbasierten Testsystem zeigt bei Zugabe derselben CAA-Konzentration eine deutlich schnellere Abnahme des Sauerstoffverbrauchs als bei den in dieser Arbeit untersuchten Proben²³.

Da explantiertes Primärgewebe unter ex vivo-Bedingungen kontinuierlich an Vitalität zu verliert²⁰⁴, zeigt ein Teil der Experimente eine stetige leichte Abnahme der metabolischen Aktivität von un-

behandelten Gewebeschnitten über den Verlauf der Messung (Abb. 3-3). Um die Vitalitätsschwankungen einzelner Gewebeschnitte in das metabolische Testergebnis mit einzubeziehen, wurden möglichst viele Gewebeschnitte einer Probe derselben Behandlung unterzogen und die Ergebnisse statistisch ausgewertet.

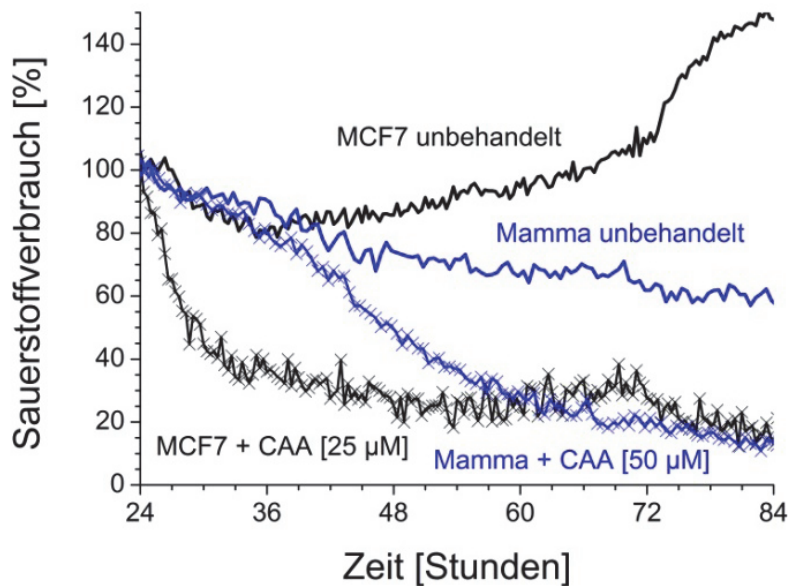


Abb. 3-3: Vergleichbare aber zeitlich verzögerte Wirkungseffekte auf Gewebeproben und MCF-7 Zellen

Dynamische Veränderungen des Sauerstoffverbrauchs von Gewebeschnitten einer Mammakarzinom-Probe (*blau*) und MCF-7 Zellen (*schwarz*) nach CAA-Zugabe. Unbehandelte Schnitte zeigen eine leicht abfallende, unbehandelte MCF-7 Zellen eine Zunahme der metabolischen Aktivität über den Messzeitraum. Die Zugabe von CAA (Gewebeschnitte: 50 µM, MCF-7 Zellen: 25 µM) erfolgt 24 Stunden nach dem Start der Messung über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Zytostatika-Behandlung resultiert in einer dosisabhängigen Abnahme (*Linie mit Kreuzen*) des Sauerstoffverbrauchs von Gewebe und Zelllinie. Trotz einer doppelt so hohen CAA-Konzentration tritt die hemmende Wirkung auf den Sauerstoffverbrauch des Gewebes im Vergleich zu der Zelllinie, bedingt durch die Diffusionsstrecke durch mehrere Gewebeschichten, mit Verzögerung ein. Angegeben sind die Stunden nach Testbeginn. Dargestellt sind Mittelwerte gleich behandelter Gewebeschnitte (n=5) und Zellkulturen (n=6). Die Daten wurden auf den Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe normiert.

3.6 Mehrtägige Chemosensitivitätstests an humanem Mammakarzinom

Die Möglichkeit von Wirkstoffanalysen über einen Zeitraum von mehreren Tagen wurde bereits in anderen Arbeitsgruppen an Zelllinien demonstriert, konnte jedoch bisher noch nicht für Gewebeproben etabliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, ein Präparations- und Messverfahren zu entwickeln welches es ermöglicht, die Vitalität von Tumorgewebeproben über 72 bis 96 Stunden auf einem hohen Niveau zu erhalten. Teilweise waren bis zu 132 Stunden Messdauer möglich. Wie aus einem Teil der Messungen hervorgeht, wird ein Zeitraum von 48 Stunden nach Beginn der Wirkstoffzugabe benötigt, um nicht nur sichtbare, sondern auch statistisch signifikante ($p < 0,05$) Hemmungen des Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerungsaktivität durch Zytostatika nachzuweisen (Abb. 2-13).

Markerfreie Langzeitmessungen der metabolischen Aktivität mit hoher zeitlicher Auflösung stellen einen markanten Fortschritt in der Erforschung pharmakologischer Wirkmechanismen dar, insbesondere im Bereich der klinischen Onkologie.

3.6.1 Nachweis von Chemosensitivität und Chemoresistenz individueller Mammakarzinom-Gewebeproben

Im Rahmen dieser Arbeit konnten individuelle metabolische Reaktionen von Gewebeproben mehrerer Patientinnen auf unterschiedliche Zytostatika nachgewiesen werden.

Bei einigen Proben konnte als Reaktion auf eine DOX-Behandlung eine Abnahme des Sauerstoffverbrauchs bis hin zum Absterben der behandelten Gewebeschnitte gezeigt werden (Abb. 2-14). Eine Probe reagierte mit einer sichtbaren, aber statistisch nur für den Sauerstoffverbrauch signifikanten Abnahme (Abb. 2-15), eine andere zeigte gar keine Veränderungen ihrer metabolischen Aktivität (Abb. 2-16).

Die mit CAA behandelten Mammakarzinom-Proben zeigten im Gegensatz zu DOX behandelten Proben eine schnell eintretende, direkt hemmende Wirkung sowohl auf den Sauerstoffverbrauch als auch mit Verzögerung auf die Ansäuerungsaktivität, resultierend im Absterben aller untersuchten Proben (Abb. 3-4, Abb. 2-15, Abb. 2-13, Abb. 2-16, Abb. 2-17).

Der unmittelbar eintretende Effekt von CAA ist auf eine Zunahme an *Reactive Oxygen Species* (ROS) und einen Abfall des mitochondrialen Membranpotenzials zurückzuführen^{25,214}. Der Wirkstoff hat somit einen unmittelbaren, zellzyklusunabhängigen Effekt auf die metabolische Aktivität der Tumorzellen¹¹²⁻¹¹⁴. Im Gegensatz zu den Wirkmechanismen von CAA wird vermutet, dass DOX in der verwendeten Konzentration von 5 μM hauptsächlich DNA-Schäden induziert, die die Zellproliferation verhindern und den Zelltod zur Folge haben, aber der Zellmetabolismus in dieser Konzentration erst mit Verzögerung beeinflusst wird. Obwohl die Zytotoxizität von DOX prinzipiell nicht Zellzyklus-spezifisch ist, zeigt der Wirkstoff eine verstärkte Aktivität während der späten S-Phase des Zellzyklus. Weitere zellschädigende Effekte scheinen erst ab höheren Konzentrationen einzutreten^{111,117}. Somit hat DOX einen stärkeren Effekt auf schnell proliferierendes Tumorgewebe als CAA, das einen unmittelbaren, zellzyklusunabhängigen Effekt aufweist. Der zeitlich unterschiedliche Wirkungseintritt von CAA und DOX konnte in dieser Arbeit konzentrationsunabhängig nachgewiesen werden. Die pharmakologischen Effekte manifestieren sich auch dann, wenn das Zytostatikum nach einer 24-stündigen Behandlung wieder abge-

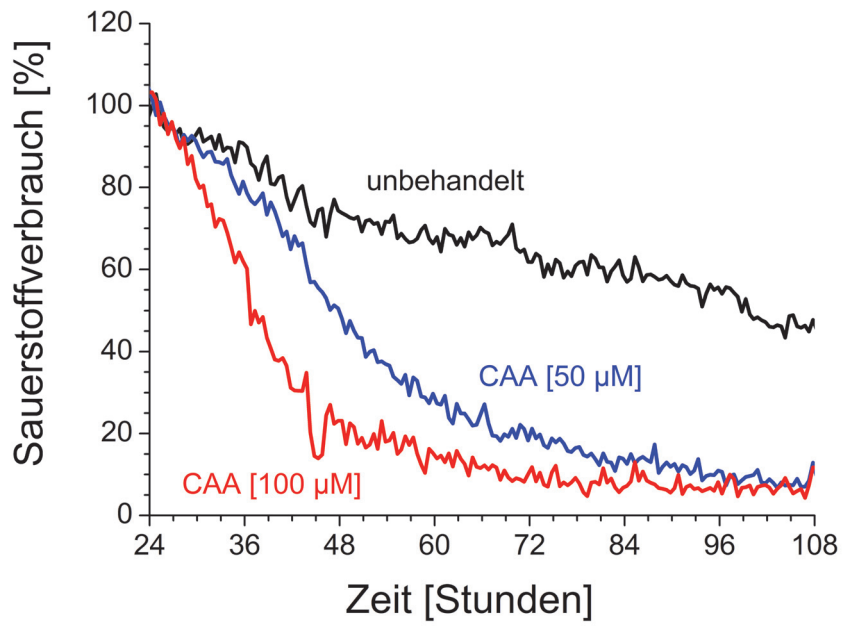
setzt wird. Die beobachteten metabolischen Effekte und ausgelösten zellulären Reaktionen scheinen bereits bei niedrigen Konzentrationen irreversibel zu sein. Wegen der nicht vollständig aufgeklärten Wirkmechanismen von Zytostatika erschwert die Vielzahl an unbekanntem Effekten eine valide Voraussage über die therapeutische Wirksamkeit und über mögliche Nebenwirkungen auf gesundes Gewebe.

Die ausgeprägte Reaktion aller mit CAA und einiger mit DOX behandelten Gewebeschnitte weist eine ausreichende Wirkstoff-Diffusion auch in tiefer gelegene Gewebeschichten nach. Somit liegen bei den Messungen, bei denen DOX keine Wirkung auf die Vitalität zeigte, vermutlich keine durch die Länge der Diffusionsstrecke methodisch bedingten Fehler vor.

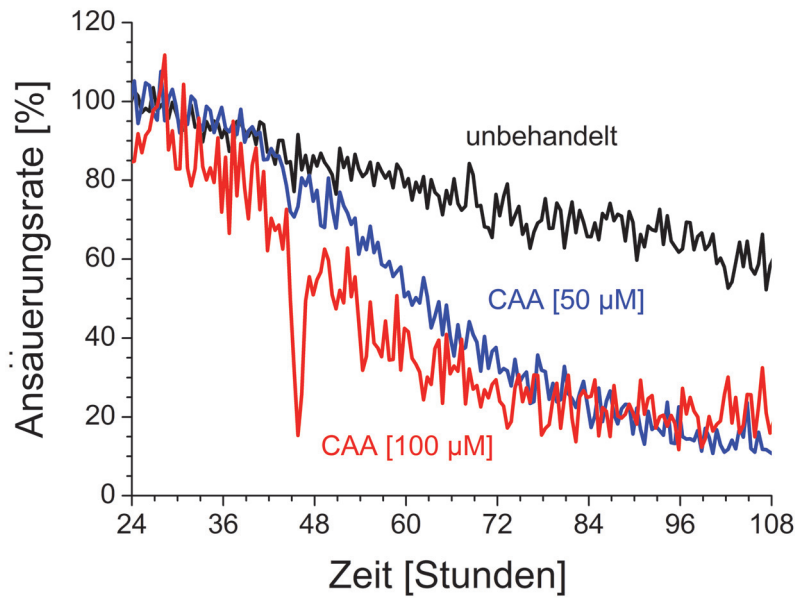
Die im Rahmen dieser Arbeit für Chemosensitivitätstests eingesetzten Konzentrationen von CAA [50 und 100 μM] und DOX [5 und 10 μM] entsprechen nicht genau den Wirkstoffdosen, die in der klinischen Behandlung tatsächlich auf die Tumorzellen einwirken^{111,211}. Wie bereits beschrieben, können individuelle physiologische Parameter, die die Wirkstoffkonzentration im Körper beeinflussen, nicht berücksichtigt werden. Jedoch war es nicht das Ziel dieser Arbeit, die in vivo Zytostatika-Konzentrationen möglichst genau nachzustellen. Vielmehr sollte nachgewiesen werden, dass Chemosensitivitätsmessungen mit dem IMR-System prinzipiell möglich sind. In folgenden Untersuchungen müssen sowohl die Zytostatika-Konzentrationen als auch der Zeitraum der Wirkstoffbehandlung an die in vivo Bedingungen angepasst werden.

3.6.2 Veränderung des metabolischen Profils durch CAA-Behandlung

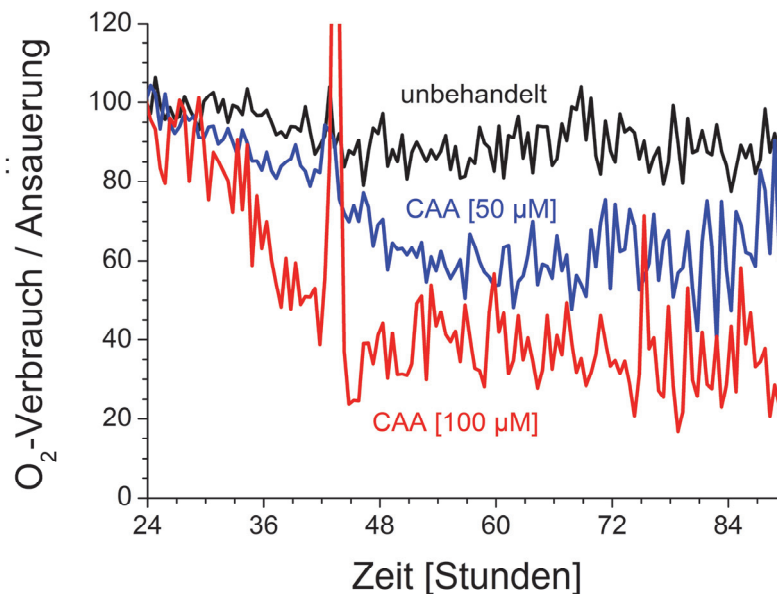
Aufgrund der multiparametrischen Messungen erlaubt das IMR-System, das Verhältnis des Sauerstoffverbrauchs zur Ansäuerungsaktivität zu analysieren. So lassen sich Veränderungen des metabolischen Profils (Quotient Sauerstoffverbrauch / Ansäuerungsaktivität) als Folge einer Behandlung mit CAA zeitaufgelöst darstellen. Unbehandelte Gewebeschnitte zeigen ein über den Verlauf der Messung konstant bleibendes Verhältnis dieser beiden Vitalitätsparameter. Als Folge einer CAA-Zugabe zeigt sich im Verlauf der Wirkstoffbehandlung eine deutliche, dosisabhängige Abnahme des metabolischen Profils (Abb. 3-4)²⁵. Dies lässt auf einen rapiden Funktionsverlust der Mitochondrien nach der Wirkstoffzugabe schließen, während die glykolytische Aktivität erst mit Verzögerung beeinträchtigt wird.



a



b



c

Abb. 3-4: Veränderungen des metabolischen Profils durch eine CAA-Behandlung

(a) Sauerstoffverbrauch und (b) Ansäuerungsaktivität von Gewebeschnitten einer Mammakarzinom-Probe nach CAA-Zugabe [50 oder 100 µM] ab Stunde 24 über einen Zeitraum von 24 Stunden. Es ist eine konzentrationsabhängige Hemmung der metabolischen Aktivität erkennbar. (c) Aus diesen Daten berechnetes metabolisches Profil als Quotient O₂ / pH über 90 Stunden. Unbehandelte Gewebeschnitte zeigen ein gleichbleibendes metabolisches Profil, CAA-behandelte Gewebeschnitte eine konzentrationsabhängige Verschiebung hin zu einem verminderten Sauerstoffverbrauch. Angegeben sind die Stunden nach Testbeginn. Die Daten wurden auf den Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe normiert. Dargestellt sind Mittelwerte gleichbehandelter Gewebeschnitte (n=3).

3.6.3 Definition von Chemosensitivität und Chemoresistenz

Zur Interpretation der metabolischen Messungen mit dem IMR-System wurden die Daten jeweils gleichbehandelter Gewebeschnitte einer Patientenprobe auf den Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe normiert und gemittelt. Es wurden zwei Kriterien für die Sensitivität von Proben gegenüber Wirkstoffen definiert:

- Signifikanter (p<0,05) Vitalitätsverlust während einer Zytostatika-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Proben desselben Tumors im Verlauf der Messung.
- Am Ende der Messperiode möglicherweise noch detektierbare Signale von Ansäuerungsaktivität und Sauerstoffverbrauch liegen unter 20% des Ausgangssignals.

Zur Definition von „Zelltod“ als eindeutiger Parameter für die Chemosensitivität einer Gewebeprobe ist eine markante Abnahme beider metabolischen Parameter (Sauerstoffverbrauch und Ansäuerungsaktivität) ausschlaggebend. Es kann jedoch vorkommen, dass bei multiparametrischen Messungen nur ein Parameter eine signifikante Reaktion auf eine Wirkstoffzugabe zeigt. Für zukünftige klinische Anwendung des IMR-Systems stellt sich somit die Frage, wie solche nicht eindeutigen Messergebnisse zu interpretieren sind.

Das Ziel geplanter weiterführender Studien ist es, anhand einer größeren Datenbasis objektive und eindeutige Kriterien für Chemosensitivität oder Resistenz von Tumorgewebeproben zu definieren.

Aufgrund der Messung mehrerer Replikate derselben Gewebeprobe bietet sich die Möglichkeit, die metabolische Aktivität einzelner Gewebeschnitte vergleichend zu analysieren und deren Relevanz für das Testergebnis zu bestimmen. Weiterhin wäre bei der Interpretation multiparametrischer Messungen eine stärkere Gewichtung eines Parameters möglich. In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass die Sauerstoffverbrauchsrate tendenziell schneller abnimmt als die Ansäuerungsaktivität (z.B. Abb. 2-15). Es ist bekannt, dass in Abhängigkeit vom Wirkmechanismus viele Zytostatika zunächst die Mitochondrien schädigen, bevor sie die Proliferationsaktivität beeinträchtigen¹¹⁴. Tumorzellen können jedoch auch bei einer beeinträchtigten Funktion der Mitochondrien überleben⁶⁴. Aus diesem Grund wäre bei der Definition von Zellvitalität eine größere Gewichtung der Ansäuerungsaktivität sinnvoll, da diese Hinweise auf die Stärke der glykolytischen Aktivität gibt.

Eine weitere, übliche Methode der Interpretation unklarer Testergebnisse ist die Klassifizierung der Chemosensibilität einer Probe als „intermediär“. Dies wird derzeit bspw. beim Mammaprint und Oncotype DX-Test angewendet^{169,170}.

3.7 Einsatzmöglichkeiten des IMR-Systems im Bereich Forschung und Entwicklung

Neben der Möglichkeit der Chemosensitivitäts- und Resistenz-Testung im Vorfeld einer Chemotherapie bieten sensorbasierte metabolische Testsysteme in der pharmakologischen und Grundlagenforschung eine Reihe weiterer Anwendungsmöglichkeiten^{224,225}.

Beim Wirkstoff-Screening können heutzutage mithilfe von Hochdurchsatz-Verfahren in kurzer Zeit eine Vielzahl von Molekülaktivitäten vollautomatisch analysiert werden. Das IMR-Messsystem würde hierbei die Möglichkeit bieten, die durch molekulare Hochdurchsatz-Screenings identifizierten Wirkstoffkandidaten innerhalb kurzer Zeit kostengünstig auf ihren phänotypischen Effekt auf Zellen und Gewebe zu untersuchen. Derzeit sind solche Analysen nur im Rahmen zeitaufwändiger Tierversuche und klinischer Studien möglich.

Als Beispiel für einen pharmakologischen Wirkstofftest mit dem IMR-System wurden in dieser Arbeit die metabolischen Effekte des kaliumsparenden Diuretikums Amilorid untersucht. Neben der dosisabhängigen Hemmung des Sauerstoffverbrauchs war ein deutlicher Einfluss des extrazellulären pH-Werts auf die Stärke des metabolischen Wirkeffekts nachweisbar (Abb. 2-27). Es ist somit möglich, metabolische und morphologische Effekte verschiedener Medikamente im Kontext eines variierenden extrazellulären Milieus zu analysieren. Effekte diverser intra- oder extrazellulär agierender Medikamente wie bspw. Antikörper oder Zytostatika könnten zukünftig mit nur geringem Aufwand analysiert und validiert werden.

Weitere Einsatzgebiete des Testsystems könnten sich in der regenerativen Medizin ergeben, um zu transplantierte Organe auf ihre Qualität hin zu untersuchen. Nicht zuletzt bieten zellbasierte Assays die Möglichkeit, Toxizität und Risiken neu entwickelter Produkte ohne Tierversuche zu prüfen.

3.8 Perspektiven der personalisierten Medizin in der Onkologie

In den vergangenen zwei Jahrzehnten gelang trotz intensiver Forschung und Neuentwicklungen von Medikamenten keine zufriedenstellende Verbesserung der onkologischen Therapien. Die enorme Heterogenität zwischen verschiedenen Tumoren des gleichen Typs, aber auch die Heterogenität der Sensitivitäts- und Resistenzeigenschaften innerhalb desselben Tumors führen dazu, dass Patienten in unterschiedlicher Weise auf das gleiche Medikament ansprechen^{5,6}. Da die kostenintensive Entwicklung immer neuer pharmazeutischer Wirkstoffe nicht den gewünschten Erfolg bringt, gewinnt die Personalisierung von vorhandenen Behandlungsstrategien zunehmend an Bedeutung. Das Ziel prädiktiver Chemosensitivitäts-Analysen im Vorfeld einer systemischen Tumortherapie ist es, eine individuelle Behandlungsstrategie mit dem potenziell wirksamsten Medikament bzw. einer Medikamenten-Kombination gezielt auswählen zu können. Ein aussagekräftiges Testergebnis würde die Möglichkeit bieten, ineffiziente sowie körperlich und psychisch belastende Chemotherapien und deren Spätfolgen für den Patienten weitgehend zu vermeiden und eine Steigerung der Lebensqualität und Lebenserwartung zu erzielen. Angesichts der derzeitigen Kosten für eine Chemotherapie bis in den fünfstelligen Euro-Bereich sowie der Behandlung der Nebenwirkungen ist die Entwicklung und der Einsatz aussagekräftiger Chemosensitivitätstests schon aus ökonomischen Gründen sinnvoll²²⁶.

Ein allgemeiner Kritikpunkt an allen derzeit erhältlichen Chemosensitivitätsassays ist jedoch das Verhältnis des finanziellen Aufwands zu dem bisher nicht eindeutig durch klinische Studien nachgewiesenen Nutzen für den Patienten^{11,227}. In den meisten Fällen übernehmen Krankenkassen deshalb die Testkosten noch nicht. Allein der FEMTELLE- uPA/PAI-1-Test^{12,47,171} wurde bisher in die Leitlinien zur „Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms“ der AWMF, der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. sowie der Deutschen Krebshilfe e.V. vom Juli 2012 aufgenommen².

Der finanzielle Aufwand eines Gen-Expressions-Tests beläuft sich auf ca. 1000 – 3000 €. Da die Messungen und Datenauswertungen bei dem in dieser Arbeit vorgestellten Testsystem weitgehend automatisiert stattfinden, sind die Personalkosten im Vergleich zu anderen Chemosensitivitätstests erheblich niedriger. Unter der Annahme von ca. 50 Tests pro Gerät und Jahr ergeben sich unter Berücksichtigung der Anschaffungs-, Personal- und Wartungskosten Gesamtkosten von ca. 800 € pro Patient.

3.9 Ausblick

Mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Analysesystem sind prinzipiell Chemosensitivitäts-Messungen für alle Tumortypen und Erkrankungsstadien möglich. Obwohl die mit diesem Verfahren erhaltenen Messergebnisse von Gewebeschnitten aus Mammakarzinom-Explantaten prinzipiell ein großes Potenzial für erfolgreiche prädiktive Chemosensitivitätstests versprechen, sind Optimierungen des Systems für einen effizienten klinischen Einsatz nötig. Derzeit unterliegen die Analysen mit dem Messsystem der großen Limitierung, nur für einen Bruchteil der Patienten anwendbar zu sein. Voraussetzung für einen Test ist, dass der Tumor einerseits operabel sein muss, andererseits eine gewisse Mindestgröße aufweisen muss, um überhaupt für eine Chemosensitivitäts-Analyse in Frage zu kommen.

Ein weitaus größeres Potenzial für einen klinischen Einsatz würde somit ein Messsystem bieten, das die Analyse von Biopsiegewebe (typischer Durchmesser 1,2 mm) ermöglicht. Nadelbiopsien werden sehr häufig im Rahmen einer Diagnose bei verschiedenen Typen solider Tumoren, unterschiedlichen Tumorlokalisationen sowie bei Metastasen entnommen und histopathologisch analysiert. Durch ein gezielt auf die Analyse von Biopsiegewebe abgestimmtes Testverfahren würden sich Einsatzmöglichkeiten sowohl bei der neoadjuvanten als auch bei der adjuvanten und palliativen Therapieplanung ergeben. Weiterhin bietet die Analyse von Gewebeproben im Rahmen eines neoadjuvanten Settings die Möglichkeit, vergleichsweise zeitnahe Ergebnisse aus vergleichenden, prospektiven Studien zu erhalten und den Nutzen des Systems zu validieren. Zur Analyse von Nadelbiopsaten mit dem in dieser Arbeit vorgestellten IMR-System müssen jedoch einerseits die Präparationstechnik auf eine geringere Menge an Tumormaterial angepasst, andererseits die Messplatte mit der Sensorik und Fluidik miniaturisiert werden.

Durch eine Miniaturisierung wäre es weiterhin möglich, eine größere Anzahl an Wells auf einer Multiwell-Platte unterzubringen. Hierdurch kann eine größere Anzahl an Proben eines Tumors parallel analysiert werden, wodurch die statistische Genauigkeit der Messergebnisse erhöht und somit die prädiktive Aussage über Chemosensibilität von Tumorgewebeproben verbessert wird.

Eine weitere Herausforderung stellt die Integration der Präparations- und Testabläufe in die klinischen Routineabläufe dar. Diese müssen so einfach und reproduzierbar wie möglich gehalten werden und sollten mit möglichst wenig Personalaufwand verbunden sein. Beispielsweise sind effizientere Methoden zur Schnittherstellung erforderlich, die im Gegensatz zum Schneiden mit einem Vibratom, optimal in die klinischen Abläufe integrierbar sind.

Da aber vor allem die Kombination verschiedener zellulärer Parameter bei der Interpretation die prädiktive Aussagekraft eines Chemosensitivitätstest drastisch steigert, bringt die parallele Analyse von Tumorgewebeproben durch metabolische und molekulare Methoden einen erheblich größeren klinischen Nutzen.

Zusammenfassend betrachtet, könnte das IMR-System unter Berücksichtigung des voraussichtlich breiten Anwendungsgebiets, einen großen Nutzen bei vergleichsweise geringen Kosten nicht nur in der personalisierten Medizin bieten. Hierzu ist jedoch, wie bei allen derzeit verfügbaren Testsystemen, die klinische Validierung der prädiktiven Genauigkeit der Chemosensitivität von humanem Tumorgewebe anhand prospektiver, randomisierter Studien erforderlich.

4 Standard Operating Procedure (SOP)

Im folgenden Abschnitt ist die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte SOP „Präparation von lebendem humanem Mammakarzinom-Gewebe für metabolische Messungen mit dem Intelligent Microplate Reader (IMR)-Testsystem“ dargestellt.

**Präparation von lebendem humanem
Mammakarzinom-Gewebe für metabolische
Messungen mit dem Intelligent Microplate
Reader (IMR)-Testsystem**

Standardarbeitsanweisung

4 Standard Operating Procedure (SOP)

Die folgende Arbeitsanweisung beschreibt die Arbeitsschritte zur Präparation von geeigneten Gewebeschnitten einer humanen Mammakarzinom-Gewebeprobe für metabolische Chemosensitivitäts-Messungen mit dem Intelligent Microplate Reader (IMR).

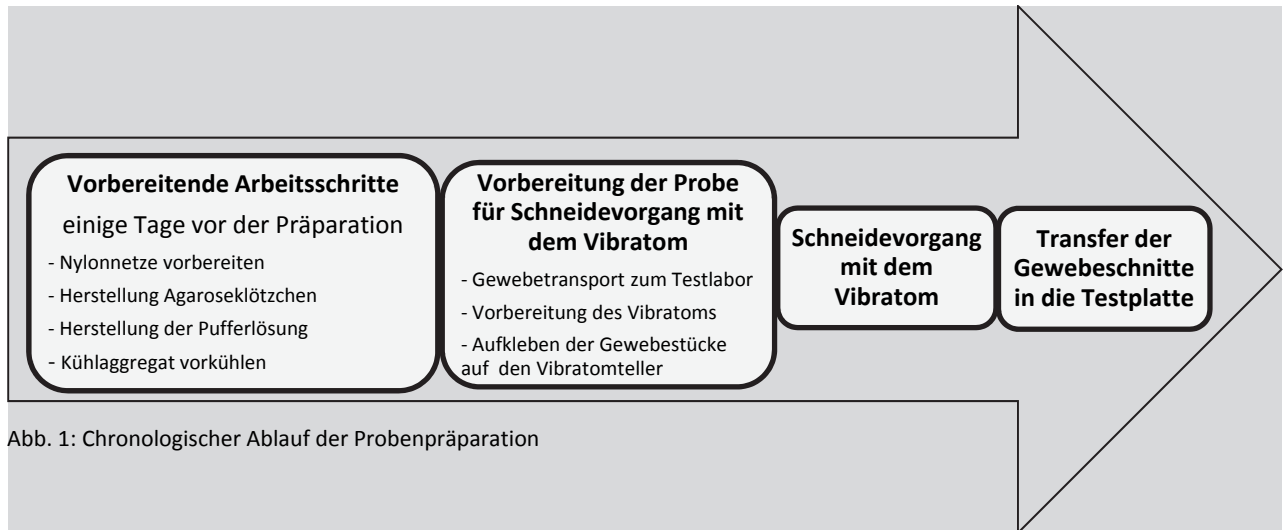
1.) Hinweise und Maßnahmen



Von den verwendeten Gewebeproben und Substanzen kann eine biologische oder chemische Gefährdung für das Personal und die Umwelt ausgehen. Es ist darauf zu achten, dass Personen mit direktem Kontakt zum Mess- und Arbeitsbereich entsprechende Vorsichtsmaßnahmen ergreifen.

- Bei allen Arbeiten an Zell- und Gewebekulturen ist geeignete Schutzkleidung zu tragen (Laborkittel, Schutzhandschuhe, geschlossene Laborschuhe und Gesichtsschutz).
- Offene Arbeiten an Zell- und Gewebekulturen, sowie an Materialien die später mit Zell- oder Gewebekulturen in Kontakt kommen, müssen innerhalb einer Sterilwerkbank durchgeführt werden.
- Alle Formen eines Transportes von sterilem Material durch unsterile oder potentiell unsterile Bereiche müssen in geeigneten Transportboxen durchgeführt werden.
- Alle Arbeitsbereiche und –Flächen sind vor und nach dem Gebrauch zu reinigen und zu desinfizieren.
- Arbeitsräume dürfen nur von zugelassenem geschultem Personal betreten werden.
- Personal, das Kontakt zu humanen Probenmaterial hat, sollte in geeigneter Weise gegen humane Pathogene geimpft sein.
- Verwendete Proben und Materialien müssen eindeutig gekennzeichnet und vor dem Zugriff Unbefugter geschützt sein.
- Aus den Vorarbeiten und Messungen entstandene Abfälle müssen ihres Gefährdungspotentials entsprechend fachgerecht entsorgt werden.

2.) Chronologische Beschreibung der Arbeitsschritte



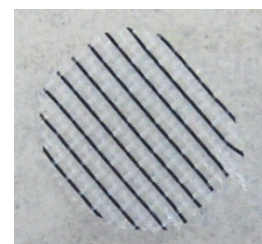
Vorbereitende Arbeitsschritte

Die vorbereitenden Arbeitsschritte können einige Tage vor der Gewebepräparation durchgeführt werden. Es ist auf eine kühle und sterile Lagerung der Agarose-Klötzchen, des Schneidepuffers und des Kühlaggregats zu achten.

Nylonnetze vorbereiten

Um den direkten Kontakt der Gewebeschnitte mit der Well-Oberfläche und den Sensorspots zu vermeiden, werden runde Nylonnetzchen in die Wells der Messplatte gelegt und die Schnitte darauf platziert.

- Benötigt werden 24 Netzchen (Abb. 2) aus Nylongewebe. Diese werden manuell durch Ausschneiden aus der Meterware hergestellt, der Durchmesser soll 6.0 mm betragen.
- Die Nylonnetzchen müssen vor Gebrauch sterilisiert werden (z.B. Autoklav).



Herstellung Agaroseklötzchen

Die Gewebeprobe wird während des Schneidevorgangs im Vibratom von drei Seiten durch ein u-förmiges Agaroseklötzchen stabilisiert.

- Eine Agarose-Lösung (3% Agarose in Phosphat-gepufferter isotonischer Kochsalzlösung, PBS) wird auf 100° Celsius erhitzt und die heiße Lösung in steriler Umgebung in eine Petrischale gegossen.
- Nach dem Gelieren wird mit einem Skalpell ein U-förmiges Stück ausgeschnitten oder mithilfe einer entsprechenden Form ausgestochen (Abb. 3).
- Die Größe der Ausbuchtung des U muss hierbei der Größe der zu schneidenden Probe entsprechen (0.5 x 0.5 cm)
- Vorbereitete Agarose-Stücke können bis zur Verwendung steril im Kühlschrank gelagert werden.



Abb. 3: U-förmiges Agarosestück zur Stabilisierung der Gewebeprobe während des Schneidevorgangs.

Kühlaggregat vorkühlen

- Das Kühlaggregat für die Pufferwanne über Nacht bei - 20 °C vorkühlen.

Herstellung der Pufferlösung

Der Schneidevorgang im Vibratom wird in einer gekühlten Pufferlösung durchgeführt, um Schäden an der Probe zu vermeiden (Temperatur und Austrocknen).

- Den für das Schneiden der Gewebeproben mit dem Vibratom benötigten „Schneidepuffer“ steril herstellen: Phosphat-gepufferte isotonische Kochsalzlösung (PBS) + $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, + 25 mM Glukose. Benötigt werden ca. 500 ml. Der Schneidepuffer wird vorgekühlt verwendet (Kühlschrank).

Herstellung Kulturmedium

Die Herstellung des Kulturmediums erfolgt möglichst frisch.

- Das für den Proben transport benötigte „Kulturmedium“ steril herstellen: DME-Medium Base (ohne Phenolrot) + 5% FCS, + 4.5g/l D-Glucose, + 4mM L-Glutamin, +50 µg/ml Gentamycin, gepuffert mit 20 mM HEPES. Medium bis zum Gebrauch gekühlt lagern (Kühlschrank).

Vorbereitung der Probe für das Schneiden mit dem Vibratom



Alle Präparationsschritte des Gewebes müssen unter möglichst sterilen Bedingungen durchgeführt werden!

Schutzkleidung mit Mundschutz, Schutzbrille und Handschuhe beim Arbeiten am Vibratom verwenden!

Gewebetransport zum Testlabor

Zum Erhalt der Probenqualität (Vitalität) muss die Gewebeprobe stets befeuchtet sein und gekühlt transportiert werden.

- Es muss auf eine standardisierte, möglichst sterile Entnahme der Proben im OP geachtet werden.
- Die Transportdauer von der Klinik ins Testlabor sollte möglichst kurz gehalten und ein Transport von mehr als 24 Stunden vermieden werden.
- Gewebeproben werden in sterilen 50- ml Zentrifugen-Röhrchen transportiert, die komplett mit sterilem DME-„Kulturmedium“ aufgefüllt werden.
- Die Proben werden in einer mit Kühlelementen gekühlten Styropor-Box versendet.

Vorbereitung des Vibratoms

- Vibratom nach Herstelleranleitung in Betrieb nehmen (hier verwendet: Mikrotom HYRAX V 50 Fa. Zeiss).
- Das Vibratom sollte in einer möglichst sterilen Umgebung betrieben werden (z.B. Laminar Flow) und alle Bestandteile, die mit den Gewebeproben oder dem Schneidepuffer in Kontakt kommen, müssen vor Gebrauch mit 70 % Ethanol desinfiziert werden (Rasierklingen, Pinzetten, Probenhalter, Pufferwanne usw.).
- Das vorgekühlte Kühlaggregat in Pufferwanne einlegen und Pufferwanne mit vorgekühltem Schneidepuffer (Phosphatgepufferte isotonischer Kochsalzlösung (PBS) + Ca^{2+} / Mg^{2+} und 25 mM Glukose) befüllen.

Aufkleben der Gewebestücke auf den Vibratomteller



Bei allen Arbeitsschritten besonders darauf achten, dass die Gewebeprobe stets mit Kulturmedium benetzt ist und nicht trocken wird!

Alle Arbeitsschritte sollen möglichst zügig und steril durchgeführt werden.

- Als Kleber wird z.B. Loctite 406 verwendet, dabei darauf achten, dass die Klebeflächen nicht nass, sondern nur leicht feucht sind.
- Das vorbereitete U-förmige Agarose-Stück wird mittig auf die Probenhalterung des Vibratoms geklebt (Abb. 4).
- Gewebeprobe aus dem Transportgefäß in eine mit Kulturmedium gefüllte Petrischale überführen.
- Probe manuell mit einer sterilen chirurgischen Klinge in einen Würfel mit einer Kantenlänge von ca. 0.5 cm schneiden oder mit geeigneter Gewebestanze ausstanzen.
- Klebefläche der Probe kurz auf einem sterilen Tuch abtupfen und auf die Probenhalterung in die Ausbuchtung des U-förmigen Agarose-Stücks kleben; hierbei darauf achten, dass die Probe die Seiten des Agarosestücks berührt, dies verhindert ein mögliches Verrutschen der Probe beim Schneidevorgang .
- Einsetzen der Probenhalterung in die mit Schneidpuffergefüllte Pufferwanne, hierbei die Probe in Richtung der Vibratom-Klinge orientieren.

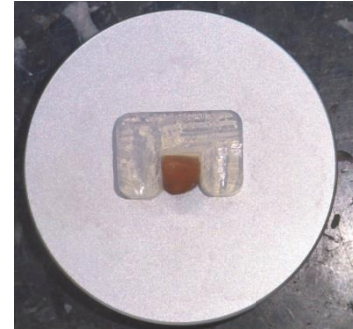


Abb. 4: U-förmiges Agarosestückchen und Gewebeprobe auf dem Vibratomteller aufgeklebt.

Schneidevorgang mit dem Vibratom



Alle Arbeitsschritte sollen möglichst zügig und möglichst steril durchgeführt werden!

Hersteller-Anleitung des Vibratoms beachten.

Schnitteinstellungen

- die Schnitteinstellungen müssen entsprechend der Konsistenz der Probe und der gewünschten Schnittdicke angepasst werden; Tabelle 1 zeigt geeignete Schnitteinstellungen am Vibratom für Schnitte mit 200-300 μm von Gewebeproben mit festerer Konsistenz.
- jeden Schnitt mit einer sterilen Pinzette unmittelbar nach dem Schneidevorgang (Abb. 5) entnehmen und in eine mit gekühltem, HEPES- gepufferten Kulturmedium gefüllte 24-Well-Platte überführen (auf diese Weise ist eine spätere Zuordnung der Position der Gewebeschnitte zu der ursprünglichen Position in der Gewebeprobe möglich).

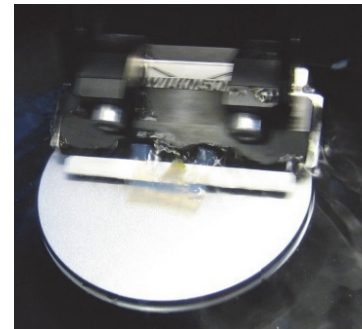


Abb. 5: Schneidevorgang mit dem Vibratom. Auf der Klinge befindet sich ein Gewebeschnitt. Die Unschärfe resultiert aus den seitlichen Bewegungen der Klinge.

Tabelle 1: Schnitteinstellungen des Vibratoms für die Herstellung von Mammakarzinom-Gewebeschnitten

Winkel der Klinge	2°
Frequenz	80-85 Hz
Amplitude	1-1.2 mm
Geschwindigkeit	0.3-0.6 mm/sec
Schnittdicke	200-250 μm

Transfer der Gewebeschnitte in die Testplatte



Besonders darauf achten, dass der Schnitt nach Zugabe des Mediums nicht aufschwimmt oder sich zusammenrollt!

- Jeden Schnitt in einer mit Medium gefüllten Petrischale vorsichtig mit der Hilfe von zwei Pinzetten auf ein steriles, auf die Größe eines Wells der IMR-Messplatte zugeschnittenes Nylonnetz schieben und möglichst mittig platzieren.
- Nylonnetz mit darauf liegendem Schnitt mithilfe einer Pinzette in ein Well der Testplatte überführen (Abb. 6), hierbei werden die Schnitte ihrer Position in der 24-Platte den entsprechenden Wells in der Messplatte zugeordnet. Das Nylonnetz verhindert den direkten Kontakt des Schnitts mit dem Boden des Wells.
- Unmittelbar nach dem Einlegen eines Schnitts 500 µl Kulturmedium in das Well zugeben; hierbei darauf achten, dass der Schnitt nicht aufschwimmt und somit seine Position im Well verändern könnte.
- Auf diese Weise mit allen weiteren Gewebeschnitten verfahren.

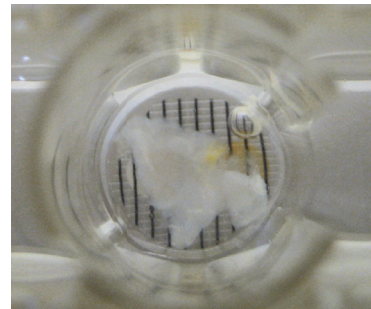


Abb. 6: Mammakarzinom-Gewebeschnitt auf einem Nylon-Netzchen im Kulturbereich der Messplatte

Deckel der Testplatte aufsetzen



Besonders darauf achten, dass nach dem Deckelaufsetzen keine Luftblasen in den Wells vorhanden sind!

- Die Testplatte so positionieren, dass die Kontaktleiste nach vorne (zum Anwender) zeigt (Abb. 7).
- Den Deckel mit den 24 Verdrängungskörpern nach unten auf die Testplatte aufsetzen.
- Die schräge Kante des Deckels stimmt mit der schrägen Kante der Testplatte überein.
- Wenn die 24 Verdrängungskörper des Deckels genau über den Kulturbereichen der Testplatte stehen, sinkt der Deckel leicht nach unten. Nun die Testplatte von unten auf Luftblasen kontrollieren.
- Falls Luftblasen erkennbar sind, Deckel nochmals vorsichtig herausheben und wieder einsetzen
- Den Deckel fest auf die Platte aufdrücken.
- Start der Messung im IMR-System laut SOP „Metabolische Chemosensitivitätstests an Gewebeproben mit dem IMR-System“.

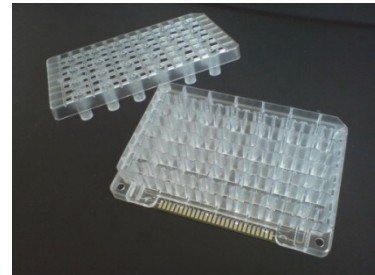


Abb 7: Aufsetzen des Deckels nach dem Transfer der Gewebeschnitte in die Multiwell-Platte

3.) Liste benötigter Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Die angegebenen Bezugsquellen für viele der benötigten Geräte, Materialien, Reagenzien und Medien sind als Beispiele anzusehen. Sie können unter Umständen durch gleichwertige Produkte anderer Anbieter ersetzt werden.

A Geräte:

Bezeichnung	Hersteller
• Feinwaage	z.B. Sartorius AG, Göttingen
• Wasserbad, 37 °C	z.B. Isothemp 210, Fisher Scientific, Schwerte
• HYRAX V50 Mikrotom mit vibrierender Klinge	z.B. Carl Zeiss Mikrolmaging GmbH, Jena
• Elektrische Heizplatte	z.B. IKAMAG RCT, Janke & Kunkel, Staufen i. Br.
• Inversmikroskop CK2	z.B. Olympus Optical Co., Japan
• Manuelle oder elektronische Pipetten, für Volumina im Bereich bis 10 µl, 200 µl, 1000 µl	z.B. Eppendorf AG, Hamburg

B Verbrauchsmaterial:

Bezeichnung	Produkt-Nr., Hersteller
• Pipettenspitzen, Volumenbereiche bis 10 µl, 200 µl, 1000 µl	z.B. Eppendorf AG, Hamburg
• Serologische Pipette 10 ml	z.B. 94010 TPP AG, Trasadingen, Schweiz
• Serologische Pipette 25 ml	z.B. 94024 TPP AG, Trasadingen, Schweiz
• Zentrifugenröhrchen 15 ml	z.B. 91015 TPP AG, Trasadingen, Schweiz
• Zentrifugenröhrchen 50 ml	z.B. 91051 TPP AG, Trasadingen, Schweiz
• Nylon-Siebgewebe	z.B. PA-245/45/CF Franz Eckert GmbH, Waldkirch
• Edelstahl-Pinzette, fein	z.B. 232-2191 VWR International GmbH, Darmstadt
• PMP-Pinzette	z.B. 232-1911 VWR International GmbH, Darmstadt
• Rasierklingen	z.B. Feather, Carbonstahl
• Fusselfreie, sterile Papiertücher	z.B. Kimberly-Clark GmbH, Koblenz
• Klebstoff	z.B. Loctite 406, Henkel AG
• Sterilfilter	z.B. 180C5 Sartorius StedimBiotech S.A., AubagneCedex, France

4 Standard Operating Procedure (SOP)

C Reagenzien:

Bezeichnung

- D-Glukose
- Natriumhydrogencarbonat
- DME-Medium, Base (D5030)
- Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
- Ethanol vergällt
- Fötale Kälberserum
- Gentamycin 50 mg/ml
- L-Glutamin 200mM
- Natriumchlorid
- Agarose

Produkt-Nr. Hersteller

- z.B. 1083370250 Merck KGaA, Darmstadt
- z.B. 1063290500 Merck KGaA, Darmstadt
- z.B. D5030 SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA
- z.B. D5030 SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA

- z.B. K928.2 Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- z.B. 12133C Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- z.B. G1272 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- z.B. G7513 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- z.B. 1064041000 Merck KGaA, Darmstadt
- z.B. A6013 SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA

D Medien:

Bezeichnung

- Kulturmedium

- Schneidepuffer

Zusammensetzung

- DME-Medium, Base (D5030) + 5% FCS, + 4.5 g/l D-Glucose + 4 mM L-Glutamin, + 50 µg/ml Gentamycin)

- Phosphat-gepufferte isotonischer Kochsalzlösung (PBS) + $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ + 25 mM Glukose

5 Anhang

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Labormaterial, Zelllinien und Gewebe

Tabelle 5-1: Chemikalien und Lösungen

Chemikalien und Lösungen	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich GmbH (H 4034) , Deutschland
5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amiloride (EIPA)	Sigma-Aldrich GmbH (A 3085), Deutschland
5-Fluoruracil (5-FU)	Sigma-Aldrich GmbH (F6627), Deutschland
Accutase	PAA Laboratories GmbH (L11-007), Österreich
Agarose, low gelling temperature	Sigma-Aldrich GmbH (A9414), Deutschland
Alginat	Sigma-Aldrich GmbH (A2033) , Deutschland
Amiloridehydrochloridehydrate (Amilorid)	Sigma-Aldrich GmbH (A 7410), Deutschland
Calciumchlorid (CaCl ₂)	MERCK KGaA (102382), Deutschland
Chloracetaldehyd (CAA)	Sigma-Aldrich GmbH (31.727-6), Deutschland
Collagenase / Dispase	Roche GmbH (10269638001), Deutschland
Doxorubicin (DOX)	Sigma-Aldrich GmbH (D1515), Deutschland
Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM 5030)	Sigma-Aldrich GmbH (D5030), Deutschland
Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM D5648)	Sigma-Aldrich GmbH (D5648), Deutschland
Ethanol 70%	VWR Prolab GmbH, Deutschland
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma-Aldrich GmbH (F7524), Deutschland
Fructose (D-Fructose 1,6-Diphosphate)	Sigma-Aldrich GmbH (F0752), Deutschland
Gentamycin (50 mg/ml)	Sigma-Aldrich GmbH (G1397), Deutschland
Glucose wasserfrei	MERCK KGaA (108337), Deutschland
L-Glutamin 200 mM	Sigma-Aldrich GmbH (G 7513), Deutschland

5 Anhang

Loctite 406	Henkel AG & Co. KGaA, Deutschland
Morpholin-ethansulfonsäure Hydrat (MES)	Sigma-Aldrich GmbH (M8250), Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	MERCK KGaA (6404), Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	MERCK KGaA (106329), Deutschland
Natriumhydrogenphosphat(di-)Dihydrat (NaH ₂ PO ₄)	MERCK KGaA (6580), Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	MERCK KGaA (106498), Deutschland
Panexin	PAN-Biotech GmbH, Deutschland
Phenolrot	MERCK KGaA (7241), Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7,4	Sigma-Aldrich GmbH (P-5368), Deutschland
Piperazine-N,N'-bis(ethanesulfonic acid) (PIPES)	Sigma-Aldrich GmbH (P6757), Deutschland
Resazurinsodiumsalt (Resazurin)	Sigma-Aldrich GmbH (R 7017), Deutschland
Salzsäure (HCl)	MERCK KGaA (1.00321), Deutschland
Sucrose	SERVA Electrophoresis GmbH (35579), Deutschland
TC10™ Trypan Blue Dye	BIO-RAD GmbH (145-0021), Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH (4855), Deutschland
Triton-X-100 (100%)	Sigma-Aldrich GmbH (T 9284), Deutschland
Trypan Blue	Sigma-Aldrich GmbH (T 6146), Deutschland
Trypsin	Roche GmbH (840-7075IH), Deutschland

Tabelle 5-2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Deckgläser (20 x 20 mm)	Menzel GmbH, Deutschland
Deepwell-Platte (24 Well)	Ritter GmbH (43001-0066), Deutschland
Einmalhandschuhe Gentle Skin	Rösner-Mautby Meditrade GmbH (1221R), Deutschland
Filteraufsatz rapid Filtermax 500 (0,2 µm PES)	TPP AG (99505), Schweiz
Intelligente Multiwellplatte (iMWP, 24 Well)	Erwin Quarder Systemtechnik GmbH, Deutschland
Loctite 406	Henkel AG & Co. KGaA, Deutschland
Multiwellplatten (6 Well, 24 Well)	TPP AG (92006, 92024), Schweiz
Mundschutz	Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Deutschland
Nylonnetz (PA-475/56)	Franz Eckert GmbH, Deutschland
Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Deutschland
Parafilm	NeoLab Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Deutschland
Pasteur-Pipetten (Glas, 150 mm)	VWR International GmbH, Deutschland
Petrischale (60,1 cm ² , 147 cm ²)	TPP AG (93100, 93150), Schweiz
Pipettenspitzen (10, 100, 250, 1000 µl)	Eppendorf AG, Deutschland
Pipettenspitzen für IMR-Roboterkopf (250 µl)	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
Rasierklinge Wilkinson Sword	Wilkinson Sword GmbH (4501021287), Deutschland
Safe-Lock Tubes (1,5 ml, 2ml)	Eppendorf AG (0030123.328), Deutschland
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	TPP AG, Schweiz
Surgical Disposable Scalpel	Aesculap AG (5518059), Deutschland
TC10™ Counting Slides	BIO-RAD Laboratories GmbH, Deutschland
Wischtücher KIMTECH SCIENCE	Kimberly-Clark GmbH (7216), Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm ²)	TPP AG (290025), Schweiz
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	TPP AG (91015, 91051), Schweiz

Tabelle 5-3: Geräte

Geräte	Hersteller
Analysewaage (Kern 440-35N)	KERN & SOHN GmbH, Deutschland
Digitalkamera NIKON 5400	Nikon Corporation, Japan
FLUOstar Galaxy	BMG LABTECH GmbH, Deutschland
Gewebestanze	Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, TU München, Deutschland
Handmikrotom	Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, TU München, Deutschland
Inkubator (37 °C, 10% CO ₂)	Binder, Deutschland
Intelligent Microplate Reader (IMR)	Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, TU München; HP Medizintechnik GmbH, Deutschland
Inversmikroskop CK2	OL Olympus Optical Co., Japan
Magnetrührer mit Heizplatte (RCT classic IKAMAG safety control)	VWR International GmbH, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Carl Roth GmbH, Deutschland
pH-Meter inoLab 720	WTW GmbH, Deutschland
Pipetten (10, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf AG, Deutschland
Pipettenspitzen Premium Tips	Biozym GmbH, Deutschland
Pipettierhilfe Pipetus	HIRSCHMANN Laborgeräte GmbH & Co. KG, Deutschland
Pipettierkopf für IMR-System	Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, TU München; HP Medizintechnik GmbH, Deutschland
Semimikrowaage Genius Sar	Sartorius AG, Deutschland
Sterilbank Hera Safe	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
TC10™ Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Varioklav Dampfsterilisator	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Verdunstungsschutz für Deepwell-Platte (24 Well)	Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, TU München, Deutschland
Vibratom (HYRAX V 50)	Carl Zeiss Microlmaging GmbH, Deutschland
Wasserbad (Isotemp 200)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland
Zellkultur-Inkubator	BINDER GmbH, Deutschland
Zentrifuge (Multifuge 3 S-R)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Deutschland

Tabelle 5-4: Software

Software	Hersteller
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation, USA
Origin 7.5G	OriginLab Corporation, USA
iMWP Data Viewer 1.3	HP Medizintechnik GmbH, Deutschland
IMROS (IMR Operating System)	SHZ Softwarehaus Zuleger GmbH, Deutschland

Tabelle 5-5: Zelllinien und Mammakarzinom-Gewebe

Zellen und Gewebe	Herkunft	Kennzeichen
MCF-7 Zelllinie	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), ACC 115	Gewonnen aus dem Pleuraerguss eines Adenokarzinoms der Brust, adherent, Östrogen-Rezeptor positiv ²⁰⁵
humanes Mammakarzinom-Gewebe	Institut für diagnostische Histopathologie und Zytologie Hamburg (Prof. Dr. med. A. Niendorf) ²⁰²	Mammakarzinom-Gewebe, anonymisiert

Tabelle 5-6: Zusammensetzung Basismedien *Dulbeccos Modified Eagles Medium D5648* und *D5030* (Sigma-Aldrich GmbH)

	D5648 [powder] g/l	D5030 [powder] g/l
Inorganic Salts		
CaCl ₂ * 2H ₂ O	0,2	0,2
Fe(NO ₃) ₃ * 9H ₂ O	0,0001	0,0001
MgSO ₄	0,09767	0,09767
KCl	0,4	0,4
NaHCO ₃	-	-
NaCl	6,4	6,4
NaH ₂ PO ₄	0,109	0,109
Amino Acids		
L-Alanyl-L-Glutamin	-	-
L-Arginine * HCL	0,084	0,084
L-Cysteine * 2HCl	0,0626	0,0626
L-Glutamine	0,584	-
Glycine	0,03	0,03
L-Histidine * HCl * H ₂ O	0,042	0,042
L-Isoleucine	0,105	0,105
L-Leucine	0,105	0,105
L-Lysine * HCl	0,146	0,146
L-Methionine	0,03	0,03
L-Phenylalanine	0,066	0,066
L-Serine	0,042	0,042
L-Threonine	0,095	0,095
L-Tryptophan	0,016	0,016
L-Tyrosine * 2Na * 2H ₂ O	0,10379	0,10379
L-Valine	0,094	0,094
Vitamins		
Choline Chloride	0,004	0,004
Folic Acid	0,004	0,004
myo-Inositol	0,0072	0,0072
Niacinamide	0,004	0,004
D-Pantothenic Acid * ½Ca	0,004	0,004
Pyridoxal * HCl	0,004	0,004
Pyridoxine * HCl	-	-
Riboflavin	0,0004	0,0004
Thiamine * HCl	0,004	0,004
Other		
D-Glucose	4,5	-
HEPES	-	-
Phenol Red * Na	0,0159	-
Pyruvic Acid * Na	-	-
ADD		
D-Glucose	-	4,5
L-Glutamine	-	0,584
NaHCO ₃	3,7	3,7

Tabelle 5-7: Zusammensetzung Zellkultur-, Transport- und Messmedium

Kulturmedium	DMEM D5648 + 3,9 g/l NaHCO ₃ + 5 % FCS
Transportmedium	DMEM D5030 + 25 mM D-Glucose + 50 µg/ml Gentamycin + 4 mM L-Glutamin + 25 mM HEPES + 5% FCS
Messmedium	DMEM D5030 + 25 mM D-Glucose + 50 µg/ml Gentamycin + 4 mM L-Glutamin + 5 % FCS
gepuffertes Messmedium	DMEM D5030 + 25 mM D-Glucose + 50 µg/ml Gentamycin + 4 mM L-Glutamin + 5 % FCS + 10 mM HEPES (pH 7,4 u. 7,0) oder MES (pH 6,5 und 6,0)

5.1.2 Zellkultur

Die adhärente Zelllinie MCF-7²⁰⁵ (Östrogen-Rezeptor positiv) (Tabelle 5-5) wurde in Kulturmedium (DMEM D5648 mit Phenolrot, ohne Antibiotika, supplementiert mit 3,9 g/l NaHCO₃ und 5 % FCS) bei 37 °C im CO₂ (10 %) begasten Inkubator kultiviert. Hierfür wurden 25 mm² Kulturflaschen und ein Volumen von 5 ml Kulturmedium verwendet. Bei Erreichen einer Konfluenz des Monolayers von ca. 90 % wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen zwei Mal mit Accutase gewaschen und in 1 ml Accutase 10 min lang im Inkubator (37 °C, CO₂) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert, in einer Neubauer Zählkammer gezählt und in der gewünschten Konzentration in neue Kulturflaschen oder Testplatten ausgesät.

5.1.3 Präparation von Gewebeproben

Frisch explantierte, anonymisierte humane Mammakarzinom-Gewebeproben wurden im Rahmen des vom BMBF geförderten „AHA“-Projekts („Automatisierte High Content Analyseplattform zur Entwicklung individualisierter Therapiestrategien“, BMBF Projekt 0315114 A, 03/2009-08/2011)³⁴ vom Institut für diagnostische Histopathologie und Zytologie (Prof. Dr. med. A. Niendorf, Hamburg)²⁰² zur Verfügung gestellt. Der Probentransport erfolgte gekühlt in einem 5 ml Zentrifugenröhrchen in Transportmedium (DMEM D 5030, supplementiert mit 25 mM D-Glucose, 50 µg/ml Gentamycin, 4 mM L-Glutamin, 25 mM HEPES und 5% FCS). Die maximale Transportdauer betrug 24 Stunden. Zur reproduzierbaren Herstellung von Gewebeschnitten wurde das Vibratom HYRAX V50 (Carl Zeiss GmbH²⁰³) verwendet.

Alle Arbeitsschritte der Probenpräparation wurden unter sterilen Bedingungen und in gekühlten Medien durchgeführt. Die Präparation erfolgte zügig und möglichst schonend für das Gewebe. Um ein Austrocknen zu vermeiden wurde streng darauf geachtet, dass die Proben bei jedem Präparationsschritt mit ausreichend Flüssigkeit benetzt waren.

Enzymatische Disaggregation von Gewebe

Chemosensitivitätstests können sowohl an Zellsuspensionen als auch an Gewebeschnitten durchgeführt werden. Zur mechanischen und enzymatischen Herstellung von Zellsuspensionen wurden die Gewebeproben zerkleinert und eine oder zwei Stunden lang bei 37 °C in der Verdauung unter leichtem Schütteln inkubiert (Tabelle 5-8). Alle 20 min wurden bereits abgelöste Zellen entnommen, mit PBS (Ca²⁺- und Mg²⁺- frei) gewaschen und in Kulturmedium überführt. Anschließend wurde eine Trypan-Blau-Färbung durchgeführt, um die Anzahl an lebenden Zellen abzuschätzen.

Tabelle 5-8: Zusammensetzung der Verdauung

PBS (Ca²⁺ und Mg²⁺ frei)

Collagenase / Dispase (1 mg/ml)

DNase 1 µg/µl,

Glukose 2 mg/ml

Herstellung von Gewebeschnitten per Hand, Gewebestanze und Handmikrotom

Die manuelle Präparation von Gewebeschnitten wurde mit einer chirurgischen Klinge durchgeführt. Die Dicke der Gewebeschnitte wurde hierbei abgeschätzt, Ziel war eine Schnittdicke von 250 µm.

Als weitere Methode der Präparation wurde eine Gewebestanze verwendet (Abb. 2-2a), mit der eine Probe aus dem Gewebe ausgestanzt und anschließend mit der gewünschten Schnittdicke aus der Spritze gedrückt wurde. Die Gewebeschnitte wurden mit einer chirurgischen Klinge abgeschnitten.

Weiterhin wurde ein Handmikrotom getestet. Durch eine Stellschraube wurde das Herausdrücken in 100 µm Schritten reguliert. Die große Auflagefläche sollte ein präziseres Abschneiden eines Gewebeschnitts ermöglichen (Abb. 2-2b).

Herstellung von Gewebeschnitten mit dem Vibratom

Schneidevorgang:

Um die gewünschte Schnittdicke der Gewebeproben (250 µm) reproduzierbar erzeugen zu können, wurde ein Vibratom mit vibrierender Klinge (Mikrotom HYRAX V50, Carl Zeiss GmbH²⁰³) verwendet (Abb. 2-3). Nach Empfehlung der Herstellerfirma wurden die Tumorproben mit handelsüblichem Alleskleber mittig auf den Probenteller aufgeklebt. Dieser wurde in die Pufferwanne eingesetzt, wobei die Probe komplett in den Schneidepuffer eingetaucht sein muss. Als Schneidepuffer wurde gekühltes PBS versetzt mit 25 mM Glukose verwendet. Der Schneidevorgang wurde nach Angaben der Herstellerfirma durchgeführt²⁰³, die Schnitteinstellungen mussten hierbei an die Konsistenz des Mammakarzinom-Gewebes angepasst werden (Tabelle 2-1). Die hergestellten Gewebeschnitte mit Schnittdicken von 250 µm wurden unmittelbar nach jedem einzelnen Schneidevorgang aus der Pufferwanne entnommen und in jeweils ein Well einer mit gekühltem Messmedium gefüllten 24-Well-Platte überführt. Dies ermöglicht die Zuordnung der mit dem IMR-System gemessenen metabolischen Signale der Gewebeschnitte zu ihrer ursprünglichen Position in der Gewebeprobe. Das Einlegen der Gewebeschnitte in die IMR-Messplatte und der Ablauf einer IMR-Messung an Gewebe-Proben werden in Abschnitt 2.1.4 und 2.3.1 beschrieben.

Da bei jedem Schneidevorgang das Risiko besteht, dass weiche Gewebeproben durch die Klinge nicht geschnitten, sondern nach hinten weggedrückt werden, wurden neben dem direkten Festkleben der Probe auf den Probenteller alternative Möglichkeiten untersucht, um die Probe während des Schneidevorgangs zu stabilisieren. Diese werden im Folgenden beschrieben.

Stabilisierung der Probe durch Einbetten in Agarose:

Zur Einbettung in Agarose wurde die Gewebeprobe auf einen Würfel mit einer Kantenlänge von 5 mm zugeschnitten und in einer kleinen Petrischale komplett in Agarose (3% in PBS) eingegossen. Hieraus wurde ein Würfel mit der Kantenlänge von ca. 1 cm hergestellt. In diesem war die Probe komplett eingebettet. Der Würfel wurde anschließend auf den Vibratom-Teller geklebt und mit dem Vibratom geschnitten.

Stabilisierung der Probe durch Einbetten in Alginat:

Zum Einbetten einer Gewebeprobe in Alginat (Tabelle 5-9) wurde die Probe zunächst auf eine Größe von 5 x 5 mm zugeschnitten und 10 min in 200 ml *Alginat-Puffer 1* unter Rühren inkubiert. 400 µl *Alginat-Puffer 2* wurden in eine kleine Petrischale pipettiert, die Probe darin platziert und mit 800 µl *Alginat-Puffer 2* bedeckt. Es wurden 3 ml *Ca²⁺-Puffer 1* um den *Alginat-Puffer 2* pipettiert und nach 30 Sekunden mit *Ca²⁺-Puffer 1* komplett bedeckt. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten wurde die eingebettete Probe in 200 ml *Ca²⁺-Puffer 2* überführt und 10 Minuten unter Rühren inkubiert. Im Anschluß wurde die eingebettete Probe in Pyramidenform geschnitten und auf den Probenhalter des Vibratoms aufgeklebt. Der Schneidevorgang fand im *Schneidepuffer* statt.

Tabelle 5-9: Zusammensetzung Alginat-Puffer

Alginat-Puffer 1	PBS 1 % Alginat 25 mM Glukose 138 mM NaCl pH 6,9
Alginat-Puffer 2	PBS 2 % Alginat 25 mM Glukose 138 mM NaCl pH 6,9
Ca²⁺-Puffer 1	PBS 500 mM CaCl ₂ 25 mM Glukose 138 mM NaCl pH 6,9
Ca²⁺-Puffer 2	PBS 150 mM CaCl ₂ 25 mM Glukose 138 mM NaCl pH 6,9
Schneidepuffer	PBS 25 mM Glukose pH 6,9

Stabilisierung der Probe durch Abstützen mit einem u-förmigen Agaroseklötzchen:

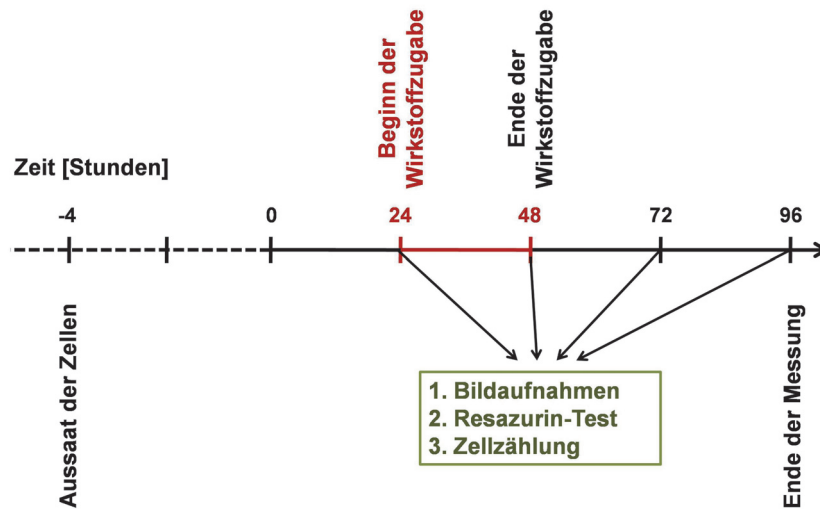
Zur Stabilisierung der Probe beim Schneidevorgang wurde ein Agarose-Klötzchen eingesetzt. Hierfür wurde eine 3 % Agarose-Lösung (in PBS) ca. 6 mm hoch in eine Petrischale gegossen, gelieren gelassen und ein u-förmiges Agarose-Klötzchen ausgeschnitten. Die Öffnung der Schenkel des „u“ musste hierbei der Größe der zu schneidenden Probe entsprechen (Würfel mit Kantenlänge von 5 mm). Vorbereitete Agarose-Klötzchen können im Kühlschrank gelagert werden.

Zum Schneiden mit dem Vibratom wurde ein u-förmiges Agarose-Klötzchen mittig auf dem Probenhalter des Vibratoms aufgeklebt (Loctite 406, Henkel AG). Anschließend wurde die erhaltene Mammakarzinom-Gewebeprobe manuell mit einer chirurgischen Klinge auf einen Würfel mit einer Kantenlänge von 5 mm zurechtgeschnitten. Dies entspricht dem für die IMR-Messung erforderlichen Durchmesser der Gewebeschnitte. Die Klebefläche der Probe wurde kurz auf einem Tuch trocken getupft und die Probe auf den Probenhalter geklebt, sodass sie durch das Agaroseklötzchen von drei Seiten abgestützt wurde. Im Anschluss wurde der Probenhalter mit der Öffnung des u-förmigen Agaroseklötzchens zur Vibratom-Klinge hingewandt in das Vibratom eingesetzt (Abb. 2-4). Als Schneidepuffer wurde gekühltes PBS versetzt mit 25 mM Glukose verwendet (Tabelle 5-9).

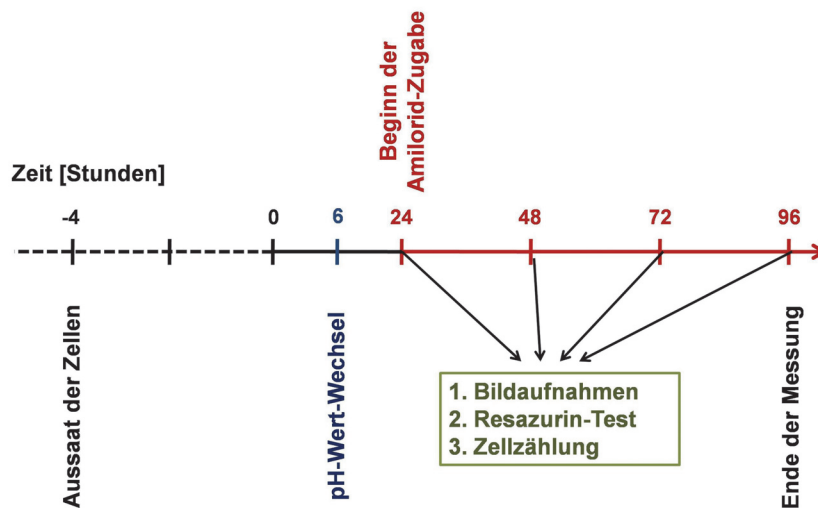
5.1.4 Durchführung Lichtmikroskopie, Resazurintest und Zellzahlbestimmung

Die Chemosensitivitätstests an herkömmlichen Methoden wurden nach dem prinzipiell gleichen Ablauf wie bei einer IMR-Messung (Abschnitt 5.1.5) durchgeführt. Zur Vorbereitung des Resazurintests¹⁰⁴, der Zellzählung und der Lichtmikroskopie wurden pro Well einer 24-Well-Platte jeweils 500 µl mit einer Gesamtzellzahl von 3×10^4 ausgesät. Die Messungen wurden zu jedem Messzeitpunkt hintereinander an den jeweils selben Wells durchgeführt. Der zeitliche Verlauf eines Experiments ist in Abb. 5-1 dargestellt. Für jede Testbedingung wurden drei gleich zu behandelnde Wells vorgesehen. Da die verwendeten Assays Endpunktmethoden sind und alle 24 Stunden Messungen durchgeführt wurden, wurden für ein 96 stündiges Experiment vier Platten angelegt. Der Austausch des Zellkulturmediums erfolgte alle 24 Stunden. Die Zellen wurden über den gesamten Verlauf der Messung in Kulturmedium bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 10 % CO₂ inkubiert. Alle 24 Stunden wurden die Messdaten erfasst. Nach Aufnahme der lichtmikroskopischen Bilder mit einem Inversmikroskop wurde ein Resazurin-Test mit dem *FLUOstar Galaxy* und im Anschluss eine Zellzählung mit dem *TC10™ automated cell counter* durchgeführt. Zur Untersuchung von Zytostatika-Effekten erfolgte die Wirkstoffzugabe 24 Stunden nach der Aussaat für einen Zeitraum von 24 Stunden. Der detaillierte zeitliche Ablauf der Experimente ist in Abb. 5-1a dargestellt.

Für die Untersuchung des Einflusses des extrazellulären pH-Wertes auf Amilorid-Effekte wurden die Zellen in Messmedium mit Puffer (DMEM D5030 supplementiert mit 25 mM D-Glucose, 4 mM L-Glutamin, 5 % FCS und 10 mM HEPES, ohne Gentamicin) mit einem pH-Wert von 7,4 ausgesät. 6 Stunden nach der Aussaat wurde das Medium gegen Messmedium mit Puffer mit pH-Werten von 7,0, 6,5 oder 6,0 ausgetauscht. Die Amilorid-Zugabe erfolgte 30 Stunden nach der Aussaat über den weiteren Verlauf der Messung. Die Kultivierung während der Experimente bei unterschiedlichen Medien-pH-Werten erfolgte bei 37° C in einem CO₂-freien Inkubator (Abb. 5-1b). Zur Auswertung der Experimente wurden alle Daten auf den Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe zu Stunde 24 normiert.



a



b

Abb. 5-1: Schematischer Ablauf von Resazurin-Test, Zellzählung und Mikroskopie mit Zytostatika-Zugabe oder Medien-pH-Wert-Wechsel und Amiloridzugabe

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf von Resazurin-Test, Zellzählung und Mikroskopie an Zelllinien. Die Zellen werden 28 Stunden vor der Wirkstoffzugabe ausgesät. Alle 24 Stunden werden anhand je einer Messplatte die Analysen durchgeführt. Nach Aufnahme der lichtmikroskopischen Bilder mit einem Inversmikroskop wird ein Resazurin-Test und im Anschluss eine Zellzählung durchgeführt. Die Messung wird nach einem Zeitraum von 96 Stunden beendet. (a) Messung mit Zytostatika-Behandlung ab Stunde 24 über einen Zeitraum von 24 Stunden. (b) Messung mit einem pH-Wert-Wechsel des Mediums nach 6 Stunden und Amilorid-Zugabe zu Stunde 24. Die Amilorid-Behandlung wird bis zum Ende der Messungen durchgeführt.

Lichtmikroskopie

Zur Bestimmung der morphologischen Veränderungen von Zellen als Folge von Wirkstoffzugaben wurde ein inverses Lichtmikroskop (Vergrößerung 100-fach) verwendet. Die Bilder wurden unmittelbar vor der Resazurin-Zugabe aufgenommen.

Resazurin-Test

Vitale Zellen reduzieren Resazurin zu Resorufin und Dihydroresorufin. In der Zelle wird Resazurin vermutlich durch die Aktivität mitochondrialer Enzyme in seine reduzierte Form umgewandelt, da es Elektronen von NADPH, FADH, FMNH, NADH und von Cytochromen aufnimmt. Dies resultiert in der Farbänderung von der blauen oxidierten Form des Farbstoffs in eine fluoreszierende rote Form. Jedoch sind nicht alle zellulären Mechanismen bekannt, die Resazurin umsetzen könnten¹⁰⁴. In dieser Arbeit wurde der Resazurin-Test zur Vitalitätsbestimmung herangezogen. Die zur Vitalität der Zellen proportionale Stärke des Fluoreszenz-Signals wurde in dieser Arbeit bei einer Anregungswellenlänge von 540 nm und einer Emissions-Wellenlänge von 590 nm gemessen. Diese ist proportional zur Vitalität von Zellen.

Zur Durchführung des Assays wurden die zu untersuchenden Wells (Medienvolumen je 500 µl) mit 10 µl Resazurin (1 g/l) pro Well versetzt und nach 2 stündiger Inkubationszeit die Fluoreszenz-Intensität mit dem Fluoreszenz-Microplate Reader *FluostarGalaxy* ausgelesen. Zur Datenanalyse wurden Referenzwerte von zellfreiem Medium von den Mittelwerten jeweils gleich behandelte Wells abgezogen.

Zellzahlbestimmung

Die im Rahmen des Resazurin-Tests zu analysierenden 24-Well-Platten wurden mit dem *TC10™ automated cell counter* gezählt. Hierfür wurden nach Entnahme des Kulturmediums die adherenten Zellkulturen zwei Mal mit 200 µl Accutase-Lösung gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Accutase-Lösung zu den Kulturen hinzu gegeben und 10 min lang im Inkubator inkubiert. Nach Vereinzeln der Zellen wurden 100 µl Zellkulturmedium zugegeben. 10 µl der Zellsuspension wurden in die speziellen Slides des *TC10™ automated cell counter* pipettiert und ausgezählt. Hierbei wurde die Zellzahl von jedem Well 3 Mal bestimmt.

5.1.5 Messungen mit dem IMR-System

Versuchsablauf einer Messung an Zelllinien

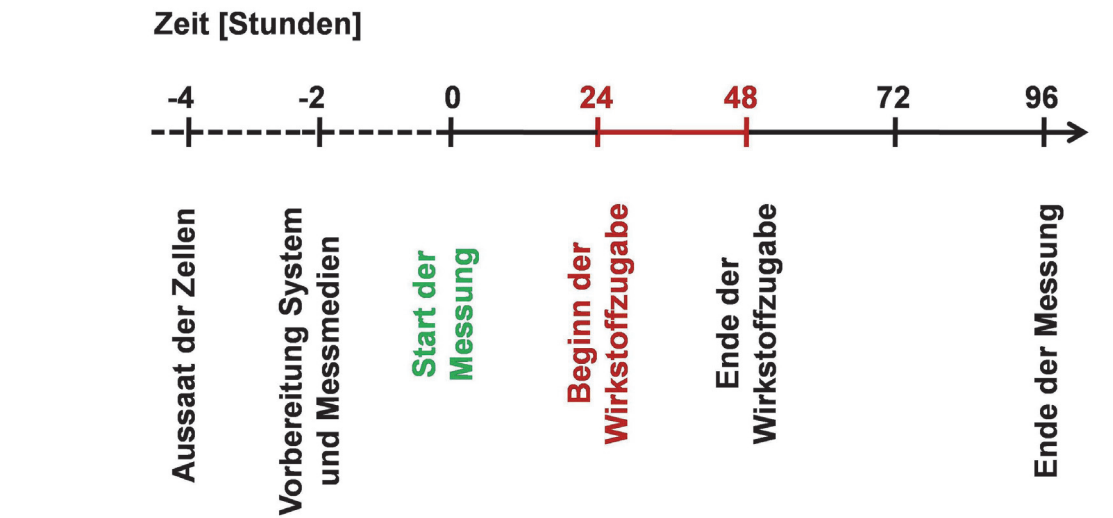
Vier Stunden vor geplantem Messbeginn wurden $5 \cdot 10^4$ MCF-7 Zellen pro Well in 200 μ l Kulturmedium in den Zellkulturbereich einer intelligenten Multiwellplatte (iMWP) ausgesät und für 2 Stunden bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 10 % CO₂ inkubiert. Dies ermöglicht die Adhäsion der Zellen an der Well-Oberfläche. Anschließend wurden die Wells auf ein Medien-Volumen von 500 μ l aufgefüllt und weitere zwei Stunden inkubiert. Das Aufsetzen des Deckels erfolgte langsam unter Vermeidung von Luftblasenbildung. Nach Einsetzen der Platte in das Messsystem wurde die Messung über die IMROS-Software gestartet. Der Start der Messung im IMR-System wurde als Stunde 0 definiert.

Mindestens zwei Stunden vor Beginn einer Messung mit dem IMR-System wurden unter sterilen Bedingungen der Roboterkopf mit Spitzen bestückt und im IMR-System montiert, der Inkubator eingeschaltet (37 °C) und das frisch hergestellte, in 24 Well-Deepwell-Platten abgefüllte Messmedium (DMEM D5030 supplementiert mit 25 mM D-Glucose, 50 μ g/ml Gentamycin, 4 mM L-Glutamin und 5 % FCS) (Tabelle 5-6) zum Vorwärmen hineingestellt. Um die optischen Messungen von Sauerstoffgehalt und pH-Wert des Mediums zu ermöglichen, enthält das Messmedium standardmäßig kein Phenolrot und möglichst keinem Puffer.

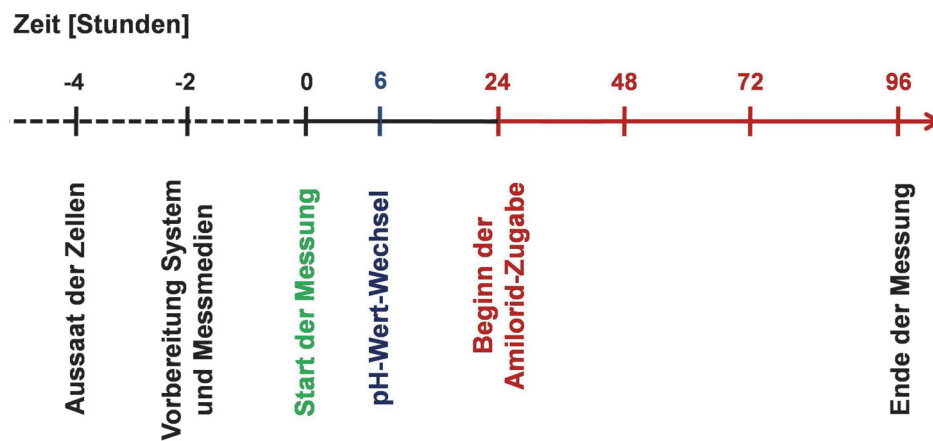
Das Standard-Messprotokoll für Zelllinien sieht einen Medienaustausch von 100 μ l in 20 minütigem Rhythmus und eine Datenaufzeichnung mit dem Mikroskop von sieben Messpunkten pro 20 minütigem Zyklus für jeden metabolischen Parameter und jedes Well vor. Bildaufnahmen erfolgen alle 20 Minuten. Die Zytostatika-Zugabe erfolgt 24 Stunden nach dem Start der Messung über einen Zeitraum von 24 Stunden (Abb. 5-2a).

Amilorid wurde 24 Stunden nach dem Start der Messung über die gesamte Messdauer zugegeben (Abb. 5-2b). Alle 24 Stunden erfolgt ein Wechsel des Pipettierroboters auf ein frisches Medien-Vorratsgefäß.

Sollte ein pH-Wert-Wechsel des Mediums erfolgen, wurde sechs Stunden nach Start der Messung auf ein neues Medien-Vorratsgefäß gewechselt. In diesem befand sich gepuffertes Messmedium (DMEM D5030 supplementiert mit 25 mM D-Glucose, 50 μ g/ml Gentamycin, 4 mM L-Glutamin, 5 % FCS und 10 mM HEPES (pH 7,4 und 7,0) oder MES (pH 6,5 und 6,0) mit den gewünschten pH-Werten (Abb. 5-2b).



a



b

Abb. 5-2: Schematische Abläufe für IMR-Messungen an Zelllinien mit Zytostatika-Zugabe oder Medien-pH-Wert-Wechsel und Amilorid-Zugabe

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf von Messungen mit dem IMR-System an Zelllinien. Der Start der Messung mit dem IMR-System wird als Stunde 0 definiert. Vier Stunden vor geplantem Messbeginn erfolgt die Aussaat der Zellen in die Messplatte. Zwei Stunden vor Messbeginn werden die erforderlichen Vorbereitungen des Messsystems getroffen. (a) Messung mit Zytostatika-Behandlung ab Stunde 24 über einen Zeitraum von 24 Stunden. (b) Messung mit einem pH-Wert-Wechsel des Mediums nach 6 Stunden und Amilorid-Zugabe zu Stunde 24. Die Amilorid-Behandlung wird bis zum Ende der Messungen durchgeführt.

Versuchsablauf einer IMR-Messung an humanem Mammakarzinom-Gewebe

Im Vorfeld der Präparation von Mammakarzinom-Gewebeproben wurden alle Vorbereitungen getroffen, um einen unmittelbaren Start der IMR-Messung nach Herstellung der Gewebeschnitte zu ermöglichen. Unter sterilen Bedingungen wurde der Roboterkopf mit Spitzen bestückt und im IMR-Systems montiert, der Inkubator eingeschaltet (37 °C) und das frisch hergestellte, in 24 Well-Deepwell-Platten abgefüllte Messmedium (DMEM D5030 supplementiert mit 25 mM D-Glucose, 50 µg/ml Gentamycin, 4 mM L-Glutamin und 5% FCS) zum Vorwärmen für 2 Stunden hineingestellt. Um die optischen Messungen von Sauerstoffgehalt und pH-Wert des Mediums zu ermöglichen, enthält das Messmedium standardmäßig kein Phenolrot und möglichst wenig Puffer.

Die Präparation von Gewebeschnitten erfolgte anschließend. Es wurden hierfür verschiedene, in Abschnitt 5.1.3) beschriebene Methoden getestet und im Rahmen dieser Arbeit eine Standardarbeitsanweisung (Abschnitt 4) definiert. IMR-Messungen an Zellsuspensionen wurden nicht durchgeführt.

Einlegen der Gewebeschnitte in die Messplatte:

Zum Einlegen in die intelligente Multiwellplatte wurden die frisch präparierten Gewebeschnitte auf einem runden Nylonnetz (Durchmesser 6 mm) platziert, auf den Boden der Wells gelegt (Abb. 5-3) und die Wells sofort mit 500 µl Messmedium aufgefüllt. Nach Aufsetzen des Deckels unter Vermeidung von Luftblasenbildung wurde die Platte in das Messsystem eingesetzt und die Messung über die IMROS-Software gestartet. Der Start der Messung wird als Stunde 0 definiert.

Messprotokoll:

Das Standard-Messprotokoll für humanes Mammakarzinom-Gewebe sieht einen Medienaustausch von 100 µl in 20 minütigem Rhythmus und eine Datenaufzeichnung mit dem Mikroskop von sieben Messpunkten pro 20 minütigem Zyklus für jeden Parameter und jedes Well vor. Fotoaufnahmen erfolgen alle 20 Minuten. Die Zytostatika-Zugabe erfolgt 24 Stunden nach dem Start der Messung über einen Zeitraum von 24 Stunden. Alle 24 Stunden erfolgt ein Wechsel des Pipettierroboters auf ein frisches Medien-Vorratsgefäß. Der zeitliche Versuchsablauf einer IMR-Messung an humanem Mammakarzinom-Gewebe ist in Abb. 5-4 dargestellt.

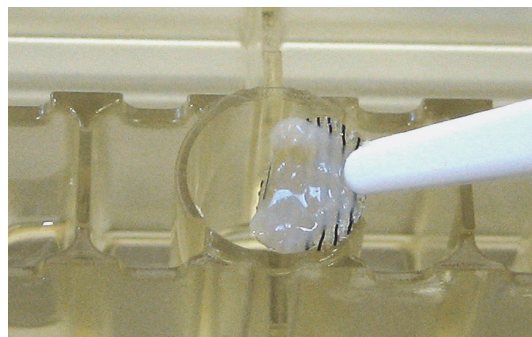


Abb. 5-3: Einlegen der Gewebeschnitte in die Messplatte

Zum Einlegen in die intelligente Multiwellplatte werden die Gewebeschnitte auf einem runden Nylonnetz (Durchmesser 6 mm) platziert, auf den Boden der Wells gelegt und die Wells sofort mit 500 µl Messmedium aufgefüllt.

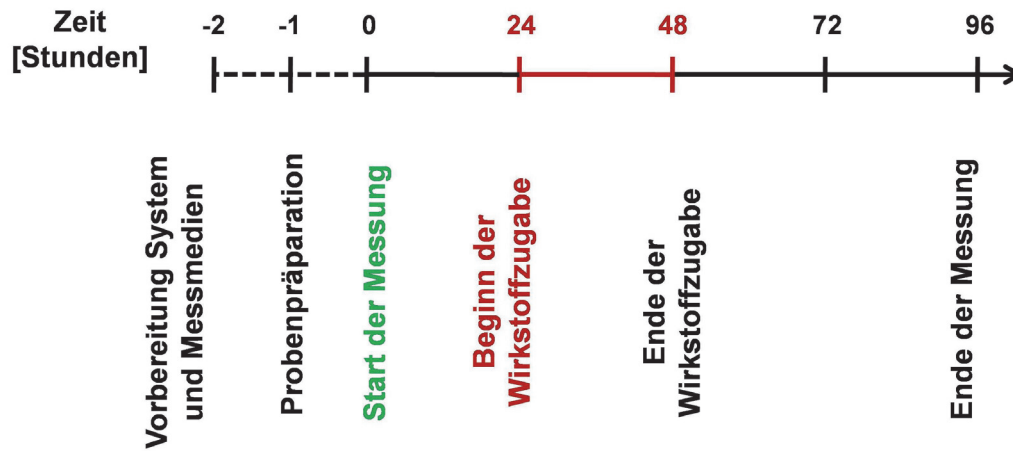


Abb. 5-4: Schematischer Ablauf einer IMR-Messung an Mammakarzinom-Gewebeproben

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf von Messungen mit dem IMR-System an Mammakarzinom-Gewebeproben. Der Start der Messung mit dem IMR-System wird als Stunde 0 definiert. Vor der Probenpräparation werden die erforderlichen Vorbereitungen des Messsystems getroffen. Die Zytostatika-Behandlung beginnt ab Stunde 24 über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Messung wird nach einem Zeitraum von 96 bis 120 Stunden beendet.

5.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Anteil der einzelnen Tumorarten an den Krebsneuerkrankungen in Deutschland	3
Abb. 1-2: Kosten der pharmazeutischen Forschung im Vergleich zur Sterberate von Krebspatienten.....	4
Abb. 1-3: Sensorbasierte Messungen des extrazellulären pH-Werts und der Gelöstsauerstoff-Konzentration	7
Abb. 1-4: Kennzeichen einer Tumorzelle.....	8
Abb. 1-5: Intrazelluläre Signalweiterleitung bei Zellteilung und Apoptose	10
Abb. 1-6: Glykolytische und mitochondriale Aktivität und der Einfluss des Hypoxie Induzierten Faktor (HIF)	12
Abb. 1-7: Heterogenität der phänotypischen Eigenschaften innerhalb des selben und unterschiedlicher Tumore	15
Abb. 1-8: Immunhistochemische Untersuchung der HER2-Expression.....	21
Abb. 1-9: Differential Staining Cytotoxicity-Assay (DiSC-Assay)	22
Abb. 1-10: Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Kolon-Epithelzelle	23
Abb. 1-11: PET-CT eines Brustkrebs-Rezidivs.....	24
Abb. 1-12: Magnetresonanztomographie (MRT) von Gehirn-Tumoren	25
Abb. 1-13: Colony forming-Assay	26
Abb. 1-14: Oncotype DX.....	29
Abb. 1-15: MammaPrint.....	31
Abb. 1-16: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Tumorzell-Sphäroids	32
Abb. 1-17: Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)	34
Abb. 1-18: CellKey-System.....	34
Abb. 1-19: xCELLigence.....	35
Abb. 1-20: Cytosensor Microphysiometer.....	36
Abb. 1-21: XFAlyser	37
Abb. 1-22: Intelligent Mobile Lab (IMOLA).....	39
Abb. 1-23: Intelligent Microplate Reader (IMR).....	40
Abb. 1-24: 24-Well Sensorplatte und Fluidiksystem des IMR-Systems	41
Abb. 1-25: Berechnung der metabolischen Raten aus den Messdaten des IMR-Systems.....	43
Abb. 2-1: Übersicht über die getesteten Präparationsmöglichkeiten für Mammakarzinom-Gewebe	46
Abb. 2-2: Gewebestanze und Handmikrotom zur Herstellung von Gewebeschnitten.....	47
Abb. 2-3: Schneiden von Mammakarzinom-Gewebe mit einem Vibratom.....	48
Abb. 2-4: Stabilisierung der Gewebeprobe durch Agarose-Klötzchen beim Schneidevorgang	49
Abb. 2-5: Mammakarzinom-Gewebeschnitt in einem Well der Messplatte.....	50
Abb. 2-6: Präparationsablauf für die Herstellung von Mammakarzinom-Gewebeschnitten	51
Abb. 2-7: Serumgehalt des Kulturmediums	53
Abb. 2-8: Signalstärke manuell präparierter Gewebeschnitte.....	55
Abb. 2-9: Metabolische Aktivität von humanem Mammakarzinom-Gewebe von anfänglichen Messungen	56

Abb. 2-10: Übersicht über alle durchgeführten IMR-Messungen an humanen Mammakarzinom-Gewebeschnitten	57
Abb. 2-11: Schematischer Ablauf einer metabolischen Messung an Mammakarzinom-Gewebeprobe	59
Abb. 2-12: Typische Verläufe metabolischer Messungen an Zelllinien und primärem Tumorgewebe	61
Abb. 2-13: Konzentrationsabhängige CAA-Effekte auf Sauerstoffverbrauch und Ansäuerungsaktivität einer Mammakarzinom-Gewebeprobe	64
Abb. 2-14: DOX induzierte Hemmung des Sauerstoffverbrauchs einer Mammakarzinom-Gewebeprobe	65
Abb. 2-15: DOX induzierte geringe Hemmung des Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerungsrate einer Mammakarzinom-Probe	67
Abb. 2-16: Nicht signifikante DOX induzierte Hemmung des Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerungs-rate einer Mammakarzinom-Probe	69
Abb. 2-17: Nicht signifikante 5-FU induzierte Hemmung des Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerungs-rate einer Mammakarzinom-Probe	70
Abb. 2-18: Übersicht der verwendeten Testmethoden und Testparameter von Messungen an MCF-7 Zellen und Mammakarzinom-Gewebe	71
Abb. 2-19: CAA-Effekte auf Vitalität, Zellzahl und der Morphologie der MCF-7 Zelllinie gemessen mit herkömmlichen Methoden	74
Abb. 2-20: Dynamische CAA-Effekte auf Metabolismus und Morphologie der MCF-7 Zelllinie gemessen mit dem IMR-System	77
Abb. 2-21: DOX-Effekte auf Vitalität, Zellzahl und der Morphologie der MCF-7 Zelllinie gemessen mit Standardmethoden	81
Abb. 2-22: Dynamische DOX-Effekte auf Metabolismus und Morphologie der MCF-7 Zelllinie gemessen mit dem IMR-System	83
Abb. 2-23: 5-FU-Effekte auf Vitalität, Zellzahl und der Morphologie der MCF-7 Zelllinie gemessen mit Standardmethoden	86
Abb. 2-24: Dynamische 5-FU-Effekte auf Metabolismus und Morphologie von MCF-7 Zellen gemessen mit dem IMR-System	88
Abb. 2-25: Einfluss des extrazellulären pH-Wertes auf den Sauerstoffverbrauch von MCF-7 Zellen	91
Abb. 2-26: Konzentrationsabhängige Amilorid-Effekte auf den Sauerstoffverbrauch von MCF-7 Zellen	92
Abb. 2-27: pH-Wert abhängige Amilorid-Effekte auf den Sauerstoffverbrauch von MCF-7 Zellen	95
Abb. 3-1: Mammakarzinom-Gewebeschnitt in einem Well der Messplatte	107
Abb. 3-2: Limitierter Informationsgehalt von Endpunktmessungen im Vergleich zu sensorbasierten Methoden	109
Abb. 3-3: Vergleichbare aber zeitlich verzögerte Wirkungseffekte auf Gewebeprobe und MCF-7 Zellen	111
Abb. 3-4: Veränderungen des metabolischen Profils durch eine CAA-Behandlung	115
Abb. 5-1: Schematischer Ablauf von Resazurin-Test, Zellzählung und Mikroskopie mit Zytostatika-Zugabe oder Medien-pH-Wert-Wechsel und Amiloridzugabe	xiii
Abb. 5-2: Schematische Abläufe für IMR-Messungen an Zelllinien mit Zytostatika-Zugabe oder Medien-pH-Wert-Wechsel und Amilorid-Zugabe	xvi
Abb. 5-3: Einlegen der Gewebeschnitte in die Messplatte	xvii

Abb. 5-4: Schematischer Ablauf einer IMR-Messung an Mammakarzinom-Gewebeproben xviii

5.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Schnitteinstellungen des Vibratoms für die Herstellung von Mammakarzinom-Gewebeschnitten.....	50
Tabelle 3-1: Anforderungen an einen klinisch routinemäßig einsetzbaren Chemosensitivitätstest mit hohem prädiktivem Wert.....	104
Tabelle 5-1: Chemikalien und Lösungen	i
Tabelle 5-2: Verbrauchsmaterialien.....	iii
Tabelle 5-3: Geräte.....	iv
Tabelle 5-4: Software	v
Tabelle 5-5: Zelllinien und Mammakarzinom-Gewebe.....	v
Tabelle 5-6: Zusammensetzung Basismedien <i>Dulbeccos Modified Eagles Medium</i> D5648 und D5030 (Sigma-Aldrich GmbH).....	vi
Tabelle 5-7: Zusammensetzung Zellkultur-, Transport- und Messmedium.....	vii
Tabelle 5-8: Zusammensetzung der Verdaulösung	viii
Tabelle 5-9: Zusammensetzung Alginat-Puffer.....	xi

5.4 Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
Abl	Abelson Murine Leukemia Virus
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AHA-Projekt	„Automatisierte High Content Analyseplattform zur Entwicklung individualisierter Therapiestrategien“, BMBF Projekt 0315114 A, 03/2009-08/2011 Projekt 0315114 A, 03/2009-08/2011
ATP-TCA	ATP-Tumor-Chemosensitivitätssav
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Forschung
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl2	B-cell lymphoma-2 protein
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BRCA1	Breast Cancer 1 protein
CAA	Chloracetaldehyd
cDNA	complementary DNA
CTR-Assay	Chemo-Therapie-Resistenz-Assay
DiSC Assay	Differential Staining Cytotoxicity-Assay
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DOX	Doxorubicin
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECIS	Electric Cell-Substrate Impedance Sensing
EDR-Assay	Extreme-Drug-Resistance-Assay
EIPA	5-(N-Ethyl-N-isopropyl)amiloride
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent-Assay
ER	Östrogen Rezeptor
ESMO	European Society for Medical Oncology
F&E	Forschung und Entwicklung
FCPA	Fluorescent Cytoprint-Assay
FCS	fötales Kälberserum
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FDG	18-Fluordeoxyglucose
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GluT	Glukosetransporter
HER2	Humanen Epidermalen Wachstumsfaktors
HIF	Hypoxia Induced Factor
HTCA	Tumor Clonogenic-Assay
IMOLA	Intelligent Mobile Lab
IMR	Intelligent Microplate Reader
IMROS	IMR Operating System
iMWP	Intelligente Multiwell-Platte

MMP	Matrix-Metalloproteasen
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
Myc	abgeleitet von der Krankheit Myelocytomatose
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NHE-1	Na ⁺ /H ⁺ -Antiporter 1
PAI-1, PAI-2	Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren Typ-1, Typ-2
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pHe	extrazelluläre pH-Wert
pHi	intrazellulären pH-Wert
PIPES	piperazine-N,N'-bis(ethanesulfonic acid)
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PR	Progesteron Rezeptor
P21	Protein 21
P53	Protein 53
Ras	Rat Sarcoma Virus
Rb	Retinoblastoma protein
Resazurin	7-hydroxy-10-oxido-phenoxazin-10-ium-3-one
ROS	Reactive Oxygen Species
Shh	Signalweg benannt nach seinem Liganden Hedgehog
SOP	Standard Operating Procedure
Src	Akronym aus <i>cellular</i> und <i>sarcoma</i>
TGF	Transforming growth factor
uPA	Plasminogen-Aktivator vom Urokinasetyp
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Wnt	Wingless und Int-1

5.5 Eigene Publikationen

Vorträge

Kleinhans R.: „Markerfreie, personalisierte Chemosensitivitätsmessungen an humanen Gewebeproben mit einem automatisierten multiparametrischen Messsystem“, Entwicklerforum Electronics goes medical, München, 10.-11. Oktober 2012

Kleinhans R., Demmel F., Becker B., Schwarzenberger T., Brischwein M., Wolf P., Wolf B.: *„Real-time screening of the chemosensitivity of human tumor slices to chemotherapeutical drug treatment“*, BMT 2011, 45. DGBMT Jahrestagung, Freiburg, 27.- 30. September 2011.

Kleinhans R., Demmel F., Becker B., Schwarzenberger T., Brischwein M., Otto A., Wolf P., Wolf B.: *„Real-time screening of the chemosensitivity of human tumor slices to chemotherapeutical drug treatment“*, 33. Annual meeting of the DGZ, Regensburg 10.-13.03.2010

Veröffentlichungen in gedruckter Form

Wolf, P., Kleinhans, R., Schwarzenberger, T., Pfister, C., Brischwein, M., Wolf, B.: *„Automated Platform for Sensor-Based Monitoring and Controlled Assays of Living Cells and Tissues“*. Biosensors & Bioelectronics (2013), 50, 111-117

Kleinhans, R., Brischwein, M., Wang, P., Becker, B., Demmel, F., Schwarzenberger, T., Zottmann, M., Niendorf, A., Wolf, B.: *„Sensor-Based Cell and Tissue Screening for Personalized Cancer Chemotherapy“*, Medical and Biological Engineering and Computing (2012), 50, 117–126.

Schwarzenberger, T., Wolf, P., Brischwein, M., Kleinhans, R., Demmel, F., Lechner, A., Becker, B., Wolf, B.: *„Impedance sensor technology for cell-based assays in the framework of a high-content screening system“*, Physiological Measurement (2011), 32(7), 977-993.

Becker, B., Wolf, P., Brischwein, M., Grothe, H., Zottmann, M., Kleinhans, R., Herz, H., Wolf, B.: *„Großer Lauschgriff auf lebende Zellen“*. Laborpraxis (2010), 48-50

Wolf, B., Grothe, H., Brischwein, B., Clauss, J., Scholz, A., Schmidhuber, M., Becker, B., Becker, S., Kleinhans, R., Wiest, J., Spittler, T., Friedrich, P.: *„From Sensor Arrays to Intelligent Therapeutic Systems“*, Medical Technology in Bavaria, 2010, S. 24-31

Zolghadr K, Mortusewicz O, Rothbauer U, Kleinhans R, Goehler H, Wanker EE, Cardoso MC, Leonhardt H.: *„A fluorescent two-hybrid assay for direct visualization of protein interactions in living cells“*, Mol Cell Proteomics. (2008), 7(11):2279-87

Veröffentlichungen auf Fachtagungen

Kleinhans R., Demmel F., Wang P., Brischwein M., Wolf P., Schwarzenberger T., Niendorf, A., Grothe, H., Wolf B.: *„Personalized chemosensitivity testing (pCST) on human tumor tissue using a sensor-based technology“*, Jahrestagung des Arbeitskreis Mikrosysteme für Biotechnologie und Lifesciences e. V. (BioMST), 19.-21. Juni 2012, Ilmenau

Kleinhans R., Demmel F., Wang P., Brischwein M., Wolf P., Schwarzenberger T., Niendorf, A., Wolf B.: „*Sensor-based screening of chemosensitivity on human tumor slices*“, 35th Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, Dresden, 21-24 March 2012

Wirths, W., Kleinhans, R., Brischwein, M., Wiest, J., Wolf, B.: „*Data processing of multiparametric free live cell monitoring systems*“, 35th Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, Dresden, 21-24 March 2012

Regina Kleinhans „*Markerfreie, personalisierte Chemosensitivitätsmessungen an humanen Gewebeproben mit einem automatisierten multiparametrischen Messsystem*“, Entwicklerforum Electronics goesmedical, München, 10.-11. Oktober 2012

Kleinhans, R., Demmel, F., Becker, B., Schwarzenberger, T., Brischwein, B., Wolf, P., Wolf, B.: „*Real-time screening of the chemosensitivity of human tumor slices to chemotherapeutic drug treatment*“, Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering, Band 56, Heft s1, Seiten 1–6, ISSN 0013-5585, DOI: 10.1515/BMT.2011.834, September 2011.

Wiest J., Brischwein M., Otto A.M., Zottmann M., Kleinhans R., Schmidhuber M., Grothe H., Wolf B.: „*Metabolomics for cellomics – tools and applications*“, Metabolomics and more, Freising / Germany, Conference Proceedings, 10.-12.03.2010, pp. 131f

Schwarzenberger, T., Demmel, F., Becker, B., Zottmann, M., Wolf, P., Kleinhans, R., Brischwein, M., Otto, A., Wolf, B.: „*Bioimpedance microelectronics in a 24-microwell plate with metabolicsensors for testing chemosensitivity of tumor cells and tissues*“. Journal of Physics, Conference Series: International Conference on Electrical Bioimpedance, Gainesville, 4.-8. April 2010

Kleinhans R., Demmel F., Becker B., Schwarzenberger T., Brischwein M., Otto A., Wolf P., Wolf B.: „*Real-time screening of the chemosensitivity of human tumor slices to chemotherapeutic drug treatment*“. European Journal of Cell Biology, S.55, Vol. 89S1, Suppl. 60, ISSN 0171-9335, Elsevier, 33. Annual meeting of the DGZ, Regensburg, März 2010

Zottmann M., Becker B., Demmel F., Kleinhans R., Brischwein M., Wolf B.: „*A cellular metabolic assay for toxicity testing using a novel automated multiparametric test system*“. European Journal of Cell Biology, S.55, Vol. 89 S1, Suppl. 60, ISSN 0171-9335, Elsevier, 33. Annual meeting of the DGZ, Regensburg 2010

Brückl M., Kleinhans R., Wiest J., Otto A.M., Wolf B.: „*A multiparametric sensor chip-based test system for real-time monitoring of cell metabolism and drug response*.“ European Journal of Cell Biology Vol. 87, Sup. 58, ISSN 0170-9335, Elsevier, 31. Annual meeting of the DGZ, Marburg (12.3. – 15.3. 2008)

5.6 Literaturverzeichnis

- 1 Robert_Koch_Institut & Gesellschaft_der_epidemiologischen_Krebsregister_in_Deutschland_e.V. ^Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends, 2010).
- 2 Deutsche_Krebsgesellschaft_e.V._und_Deutsche_Krebshilfe_e.V. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. (<http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/>, 2012).
- 3 Morgan, G., Ward, R. & Barton, M. The contribution of cytotoxic chemotherapy to 5-year survival in adult malignancies. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 16, 549-560 (2004).
- 4 Ribeiro, J. T., Macedo, L. T., Curigliano, G. *et al.* Cytotoxic drugs for patients with breast cancer in the era of targeted treatment: back to the future? *Ann Oncol*, doi:mdr382 [pii] 10.1093/annonc/mdr382.
- 5 McAlpine, J. N., Eisenkop, S. M. & Spirtos, N. M. Tumor heterogeneity in ovarian cancer as demonstrated by in vitro chemoresistance assays. *Gynecol Oncol* 110, 360-364, doi:10.1016/j.ygyno.2008.05.019 (2008).
- 6 Abel, U. Chemotherapy of advanced epithelial cancer--a critical review. *Biomed Pharmacother* 46, 439-452 (1992).
- 7 Pharmaceutical_Research_and_Manufacturers_of_America. R&D PhRMA Member Companies: 1975–2011. *PhRMA 2012 Profile* (2012).
- 8 National_Cancer_Institute. US Mortality Files. *SEER Cancer Statistic Review* (2012).
- 9 Kirkwood, J. M., Tarhini, A., Sparano, J. A. *et al.* Comparative clinical benefits of systemic adjuvant therapy for paradigm solid tumors. *Cancer Treat Rev* 39, 27-43, doi:10.1016/j.ctrv.2012.03.007 (2013).
- 10 Cavallaro, S., Paratore, S., de Snoo, F. *et al.* Genomic analysis: toward a new approach in breast cancer management. *Crit Rev Oncol Hematol* 81, 207-223, doi:10.1016/j.critrevonc.2011.03.006 (2012).
- 11 Engstrom, M. J., Opdahl, S., Hagen, A. I. *et al.* Molecular subtypes, histopathological grade and survival in a historic cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 140, 463-473, doi:10.1007/s10549-013-2647-2 (2013).
- 12 Janicke, F., Prechtel, A., Thomssen, C. *et al.* Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst* 93, 913-920 (2001).
- 13 Kim, H. S., Park, I., Cho, H. J. *et al.* Analysis of the potent prognostic factors in luminal-type breast cancer. *Journal of breast cancer* 15, 401-406, doi:10.4048/jbc.2012.15.4.401 (2012).
- 14 Arranz, E. E., Vara, J. A., Gamez-Pozo, A. *et al.* Gene signatures in breast cancer: current and future uses. *Translational oncology* 5, 398-403 (2012).
- 15 Bild, A. H., Yao, G., Chang, J. T. *et al.* Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature* 439, 353-357, doi:10.1038/nature04296 (2006).
- 16 Porporato, P. E., Dhup, S., Dadhich, R. K. *et al.* Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Front Pharmacol* 2, 49, doi:10.3389/fphar.2011.00049.
- 17 Sampson, V. B., Gorlick, R., Kamara, D. *et al.* A review of targeted therapies evaluated by the pediatric preclinical testing program for osteosarcoma. *Frontiers in oncology* 3, 132, doi:10.3389/fonc.2013.00132 (2013).
- 18 Arteaga, C. L. & Baselga, J. Tyrosine kinase inhibitors: why does the current process of clinical development not apply to them? *Cancer Cell* 5, 525-531, doi:10.1016/j.ccr.2004.05.028 (2004).
- 19 Untch, M. J., Christian; Thomssen, Christoph; Nitz, Ulrike; Minckwitz, Gunter von; Kaufmann, Manfred. in *Deutsches Ärzteblatt* Vol. 103(50): A-3406 / B-2961 / C-2841 (2006).
- 20 Dang, C. V., Hamaker, M., Sun, P. *et al.* Therapeutic targeting of cancer cell metabolism. *J Mol Med (Berl)* 89, 205-212, doi:10.1007/s00109-011-0730-x.
- 21 Dumont, J. E., Pecasse, F. & Maenhaut, C. Crosstalk and specificity in signalling. Are we crosstalking ourselves into general confusion? *Cell Signal* 13, 457-463, doi:S0898-6568(01)00168-1 [pii] (2001).
- 22 Bray, D. Intracellular signalling as a parallel distributed process. *Journal of theoretical biology* 143, 215-231 (1990).
- 23 Otto, A. M., Brischwein, M., Niendorf, A. *et al.* Microphysiological testing for chemosensitivity of living tumor cells with multiparametric microsensor chips. *Cancer Detect Prev* 27, 291-296, doi:S0361090X0300093X [pii] (2003).
- 24 Mestres, P., Morguet, A., Schmidt, W. *et al.* A new method to assess drug sensitivity on breast tumor acute slices preparation. *Ann N Y Acad Sci* 1091, 460-469 (2006).
- 25 Henning, T., Brischwein, M., Baumann, W. *et al.* Approach to a multiparametric sensor-chip-based tumor chemosensitivity assay. *Anticancer Drugs* 12, 21-32 (2001).
- 26 Kleinhans, R., Brischwein, M., Wang, P. *et al.* Sensor-based cell and tissue screening for personalized cancer chemotherapy. *Med Biol Eng Comput* 50, 117-126, doi:10.1007/s11517-011-0855-7 (2012).
- 27 Metzger, R., Deglmann, C. J., Hoerrlein, S. *et al.* Towards in-vitro prediction of an in-vivo cytostatic response of human tumor cells with a fast chemosensitivity assay. *Toxicology* 166, 97-108, doi:S0300-483X(01)00440-1 [pii] (2001).

-
- 28 Wolf, P., Brischwein, M., Kleinhans, R. *et al.* Automated platform for sensor-based monitoring and controlled assays of living cells and tissues. *Biosens Bioelectron* 50C, 111-117, doi:10.1016/j.bios.2013.06.031 (2013).
- 29 Lob, V., Geisler, T., Brischwein, M. *et al.* Automated live cell screening system based on a 24-well-microplate with integrated micro fluidics. *Med Biol Eng Comput* 45, 1023-1028, doi:10.1007/s11517-007-0260-4 (2007).
- 30 Wolf, B., Brischwein, M., Lob, V. *et al.* Cellular signaling: aspects for tumor diagnosis and therapy. *Biomed Tech (Berl)* 52, 164-168, doi:10.1515/BMT.2007.030 (2007).
- 31 Heinz_Nixdorf-Lehrstuhl_für_Medizinische_Elektronik_(TU_München). <http://www.lme.ei.tum.de/>. (2013).
- 32 HP_Medizintechnik_GmbH. <http://www.hp-med.com/>. (2013).
- 33 Erwin_Quarder_Systemtechnik_GmbH. <http://www.quarder.de/>. (2013).
- 34 Automatisierte_High_Content_Analyseplattform_zur_Entwicklung_individualisierter_Therapiestrategien_(AHA). *BMBF_Projekt_0315114 A* (03/2009-08/2011).
- 35 Wiest, J., Stadthagen, T., Schmidhuber, M. *et al.* Intelligent Mobile Lab for Metabolics in Environmental Monitoring. *Analytical Letters* 39 (8) (2006).
- 36 Musgrove, E., Seaman, M. & Hedley, D. Relationship between cytoplasmic pH and proliferation during exponential growth and cellular quiescence. *Exp Cell Res* 172, 65-75 (1987).
- 37 Lowe, S. W., Cepero, E. & Evan, G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432, 307-315, doi:10.1038/nature03098 (2004).
- 38 Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26, 1324-1337, doi:10.1038/sj.onc.1210220 (2007).
- 39 Bissell, M. J. & Hines, W. C. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med* 17, 320-329, doi:10.1038/nm.2328 (2011).
- 40 Welcsh, P. L. & King, M. C. BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet* 10, 705-713 (2001).
- 41 Alberts, B. J., A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molekularbiologie der Zelle. Wiley-VCH., Wenching* 4. Auflage (2004).
- 42 Bhowmick, N. A., Neilson, E. G. & Moses, H. L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332-337, doi:10.1038/nature03096 (2004).
- 43 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70, doi:S0092-8674(00)81683-9 [pii] (2000).
- 44 Cheng, C. F., Fan, J., Fedesco, M. *et al.* Transforming growth factor alpha (TGFalpha)-stimulated secretion of HSP90alpha: using the receptor LRP-1/CD91 to promote human skin cell migration against a TGFbeta-rich environment during wound healing. *Mol Cell Biol* 28, 3344-3358, doi:10.1128/MCB.01287-07 (2008).
- 45 Bissell, M. J. & Radisky, D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 1, 46-54, doi:10.1038/35094059 (2001).
- 46 Deshpande, A., Sicinski, P. & Hinds, P. W. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 24, 2909-2915, doi:10.1038/sj.onc.1208618 (2005).
- 47 Duffy, M. J., O'Grady, P., Devaney, D. *et al.* Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. Preliminary report. *Cancer* 62, 531-533 (1988).
- 48 Hanahan, D. & Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364 (1996).
- 49 Badowska-Kozakiewicz, A. M., Sobol, M., Patera, J. *et al.* Immunohistochemical evaluation of human epidermal growth factor receptor 2 and estrogen and progesterone receptors in invasive breast cancer in women. *Archives of medical science : AMS* 9, 466-471, doi:10.5114/aoms.2012.31010 (2013).
- 50 van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J. *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415, 530-536, doi:10.1038/415530a (2002).
- 51 Glas, A. M., Floore, A., Delahaye, L. J. *et al.* Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test. *BMC genomics* 7, 278, doi:10.1186/1471-2164-7-278 (2006).
- 52 Paik, S., Shak, S., Tang, G. *et al.* A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 351, 2817-2826 (2004).
- 53 Plas, D. R. & Thompson, C. B. Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene* 24, 7435-7442, doi:10.1038/sj.onc.1209097 (2005).
- 54 Gordan, J. D., Bertout, J. A., Hu, C. J. *et al.* HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell* 11, 335-347, doi:10.1016/j.ccr.2007.02.006 (2007).
- 55 Knippers, R. *Molekulare Genetik. 8. Auflage* (2001).
- 56 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- 57 Kaelin, W. G., Jr. & Thompson, C. B. Q&A: Cancer: clues from cell metabolism. *Nature* 465, 562-564.
- 58 Eggleston, L. V. & Krebs, H. A. Regulation of the pentose phosphate cycle. *Biochem J* 138, 425-435 (1974).

- 59 Heiden, M. V. & Lewis, C. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 324(5930), 1029–1033. (2009).
- 60 Green, D. R. & Reed, J. C. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312 (1998).
- 61 Hsu, P. P. & Sabatini, D. M. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 134, 703-707 (2008).
- 62 Kroemer, G. & Pouyssegur, J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 13, 472-482 (2008).
- 63 Montcourrier, P., Silver, I., Farnoud, R. *et al.* Breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu by a dual mechanism. *Clin Exp Metastasis* 15, 382-392 (1997).
- 64 Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314 (1956).
- 65 Wenger, J. B., Chun, S. Y., Dang, D. T. *et al.* Combination therapy targeting cancer metabolism. *Med Hypotheses* 76, 169-172, doi:10.1016/j.mehy.2010.09.008 (2011).
- 66 Tong, X., Zhao, F. & Thompson, C. B. The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells. *Current opinion in genetics & development* 19, 32-37, doi:10.1016/j.gde.2009.01.002 (2009).
- 67 Gatenby, R. A. & Gillies, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4, 891-899, doi:10.1038/nrc1478 (2004).
- 68 Bertout, J. A., Patel, S. A. & Simon, M. C. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 967-975 (2008).
- 69 Vaupel, P., Okunieff, P. & Neuringer, L. J. Blood flow, tissue oxygenation, pH distribution, and energy metabolism of murine mammary adenocarcinomas during growth. *Adv Exp Med Biol* 248, 835-845 (1989).
- 70 Marusyk, A., Almendro, V. & Polyak, K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer* 12, 323-334, doi:10.1038/nrc3261 (2012).
- 71 Semenza, G. L. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Semin Cancer Biol* 19, 12-16 (2009).
- 72 Ebbesen, P., Pettersen, E. O., Gorr, T. A. *et al.* Taking advantage of tumor cell adaptations to hypoxia for developing new tumor markers and treatment strategies. *J Enzyme Inhib Med Chem* 24 Suppl 1, 1-39 (2009).
- 73 Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5510-5514 (1995).
- 74 Salceda, S. & Caro, J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272, 22642-22647 (1997).
- 75 Liu, L. & Simon, M. C. Regulation of transcription and translation by hypoxia. *Cancer Biol Ther* 3, 492-497 (2004).
- 76 Hu, C. J., Wang, L. Y., Chodosh, L. A. *et al.* Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* 23, 9361-9374 (2003).
- 77 Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L. *et al.* HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 3, 187-197, doi:10.1016/j.cmet.2006.01.012 (2006).
- 78 Kim, J. W. & Dang, C. V. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res* 66, 8927-8930, doi:66/18/8927 [pii] 10.1158/0008-5472.CAN-06-1501 (2006).
- 79 Brown, J. M. Tumor hypoxia in cancer therapy. *Methods Enzymol* 435, 297-321 (2007).
- 80 Dellian, M., Helmlinger, G., Yuan, F. *et al.* Fluorescence ratio imaging of interstitial pH in solid tumours: effect of glucose on spatial and temporal gradients. *Br J Cancer* 74, 1206-1215 (1996).
- 81 Cross, M. & Dexter, T. M. Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell* 64, 271-280 (1991).
- 82 Onozuka, H., Tsuchihara, K. & Esumi, H. Hypoglycemic/hypoxic condition in vitro mimicking the tumor microenvironment markedly reduced the efficacy of anticancer drugs. *Cancer science* 102, 975-982, doi:10.1111/j.1349-7006.2011.01880.x (2011).
- 83 Camps, J. L., Chang, S. M., Hsu, T. C. *et al.* Fibroblast-mediated acceleration of human epithelial tumor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 75-79 (1990).
- 84 Loeffler, D. A., Juneau, P. L. & Masseran, S. Influence of tumour physico-chemical conditions on interleukin-2-stimulated lymphocyte proliferation. *Br J Cancer* 66, 619-622 (1992).
- 85 Martinez-Outschoorn, U. E., Whitaker-Menezes, D., Lin, Z. *et al.* Cytokine production and inflammation drive autophagy in the tumor microenvironment: role of stromal caveolin-1 as a key regulator. *Cell cycle* 10, 1784-1793 (2011).
- 86 Sonnenberg, M., van der Kuip, H., Haubeis, S. *et al.* Highly variable response to cytotoxic chemotherapy in carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) from lung and breast. *BMC Cancer* 8, 364, doi:10.1186/1471-2407-8-364 (2008).
- 87 Hehlhans, S., Eke, I. & Cordes, N. An essential role of integrin-linked kinase in the cellular radiosensitivity of normal fibroblasts during the process of cell adhesion and spreading. *International journal of radiation biology* 83, 769-779, doi:10.1080/09553000701694327 (2007).

-
- 88 Hehlhans, S., Haase, M. & Cordes, N. Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim Biophys Acta* 1775, 163-180, doi:10.1016/j.bbcan.2006.09.001 (2007).
- 89 Cianfrocca, M. & Goldstein, L. J. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist* 9, 606-616, doi:10.1634/theoncologist.9-6-606 (2004).
- 90 Brown, J. M. & Giaccia, A. J. The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res* 58, 1408-1416 (1998).
- 91 Ceccarini, C. & Eagle, H. pH as a determinant of cellular growth and contact inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 229-233 (1971).
- 92 Cardone, R. A., Casavola, V. & Reshkin, S. J. The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer* 5, 786-795 (2005).
- 93 Reshkin, S. J., Bellizzi, A., Caldeira, S. *et al.* Na⁺/H⁺ exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J* 14, 2185-2197 (2000).
- 94 Binggeli, R. & Weinstein, R. C. Membrane potentials and sodium channels: hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions. Vol. 123 (1986).
- 95 Slepkov, E. R., Rainey, J. K., Sykes, B. D. *et al.* Structural and functional analysis of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Biochem J* 401, 623-633, doi:10.1042/BJ20061062 (2007).
- 96 Putney, L. K., Denker, S. P. & Barber, D. L. The changing face of the Na⁺/H⁺ exchanger, NHE1: structure, regulation, and cellular actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 527-552, doi:10.1146/annurev.pharmtox.42.092001.14380142/1/527 [pii] (2002).
- 97 Wong, P., Kleemann, H. W. & Tannock, I. F. Cytostatic potential of novel agents that inhibit the regulation of intracellular pH. *Br J Cancer* 87, 238-245, doi:10.1038/sj.bjc.6600424 (2002).
- 98 Gottlieb, R. A., Nordberg, J., Skowronski, E. *et al.* Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 654-658 (1996).
- 99 Harguindey, S., Orive, G., Luis Pedraz, J. *et al.* The role of pH dynamics and the Na⁺/H⁺ antiporter in the etiopathogenesis and treatment of cancer. Two faces of the same coin—one single nature. *Biochim Biophys Acta* 1756, 1-24 (2005).
- 100 DeNardo, D. G. & Coussens, L. M. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 9, 212 (2007).
- 101 Hazlehurst, L. A., Landowski, T. H. & Dalton, W. S. Role of the tumor microenvironment in mediating de novo resistance to drugs and physiological mediators of cell death. *Oncogene* 22, 7396-7402, doi:10.1038/sj.onc.1206943 (2003).
- 102 Raghunand, N. & Gillies, R. J. pH and drug resistance in tumors. *Drug Resist Updat* 3, 39-47 (2000).
- 103 de Fries, R. & Mitsuhashi, M. Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: comparison of alamarBlue assay to 3H-thymidine incorporation assay. *Journal of clinical laboratory analysis* 9, 89-95 (1995).
- 104 O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. *et al.* Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European journal of biochemistry / FEBS* 267, 5421-5426 (2000).
- 105 Wolf, B., Kraus, M., Brischwein, M. *et al.* Biofunctional hybrid structures-cell-silicon hybrids for applications in biomedicine and bioinformatics. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 46, 215-225 (1998).
- 106 Brischwein, M., Motrescu, E. R., Cabala, E. *et al.* Functional cellular assays with multiparametric silicon sensor chips. *Lab Chip* 3, 234-240, doi:10.1039/b308888j (2003).
- 107 Owicki, J. C. & Parce, J. W. Biosensors based on the energy metabolism of living cells: the physical chemistry and cell biology of extracellular acidification. *Biosens Bioelectron* 7, 255-272 (1992).
- 108 Mahoney, B. P., Raghunand, N., Baggett, B. *et al.* Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents in vitro. *Biochem Pharmacol* 66, 1207-1218 (2003).
- 109 Skipper, H. E., Bennett, L. L., Jr. & Langham, W. H. Over-all tracer studies with C14 labeled nitrogen mustard in normal and leukemic mice. *Cancer* 4, 1025-1027 (1951).
- 110 Skipper, H. E. Perspectives in Cancer Chemotherapy: Therapeutic Design. *Cancer research* 24, 1295-1302 (1964).
- 111 Gewirtz, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57, 727-741, doi:S0006295298003074 [pii] (1999).
- 112 Visarius, T. M., Stucki, J. W. & Lauterburg, B. H. Stimulation of respiration by methylene blue in rat liver mitochondria. *FEBS Lett* 412, 157-160 (1997).
- 113 Spengler, S. J. & Singer, B. Formation of interstrand cross-links in chloroacetaldehyde-treated DNA demonstrated by ethidium bromide fluorescence. *Cancer Res* 48, 4804-4806 (1988).
- 114 Sood, C. & O'Brien, P. J. Molecular mechanisms of chloroacetaldehyde-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 46, 1621-1626, doi:0006-2952(93)90332-Q [pii] (1993).

- 115 Painter, R. B. Inhibition of DNA replicon initiation by 4-nitroquinoline 1-oxide, adriamycin, and ethyleneimine. *Cancer Res* 38, 4445-4449 (1978).
- 116 Momparler, R. L., Karon, M., Siegel, S. E. *et al.* Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. *Cancer Res* 36, 2891-2895 (1976).
- 117 Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E. *et al.* Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56, 185-229 (2004).
- 118 Thorn, C. F., Marsh, S., Carrillo, M. W. *et al.* PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. *Pharmacogenetics and genomics* 21, 237-242, doi:10.1097/FPC.0b013e32833c6107 (2011).
- 119 Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3, 330-338, doi:10.1038/nrc1074 (2003).
- 120 Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G., Davies, C., Godwin, J. *et al.* Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 378, 771-784, doi:10.1016/S0140-6736(11)60993-8 (2011).
- 121 Harguindey, S., Arranz, J. L., Wahl, M. L. *et al.* Proton transport inhibitors as potentially selective anticancer drugs. *Anticancer Res* 29, 2127-2136 (2009).
- 122 Yun, C. H., Tse, C. M., Nath, S. *et al.* Structure/function studies of mammalian Na-H exchangers--an update. *J Physiol* 482, 1S-6S (1995).
- 123 McCarty, M. F. & Whitaker, J. Manipulating tumor acidification as a cancer treatment strategy. *Altern Med Rev* 15, 264-272.
- 124 Maidorn, R. P., Cragoe, E. J., Jr. & Tannock, I. F. Therapeutic potential of analogues of amiloride: inhibition of the regulation of intracellular pH as a possible mechanism of tumour selective therapy. *Br J Cancer* 67, 297-303 (1993).
- 125 Gonzalez-Angulo, A. M., Morales-Vasquez, F. & Hortobagyi, G. N. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol* 608, 1-22 (2007).
- 126 Brown, J. M. Tumor microenvironment and the response to anticancer therapy. *Cancer Biol Ther* 1, 453-458, doi:072902103 [pii] (2002).
- 127 Lankelma, J., Dekker, H., Luque, F. R. *et al.* Doxorubicin gradients in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 5, 1703-1707 (1999).
- 128 Riordan, J. R. & Ling, V. Genetic and biochemical characterization of multidrug resistance. *Pharmacol Ther* 28, 51-75 (1985).
- 129 Schoenlein, P. V. Molecular cytogenetics of multiple drug resistance. *Cytotechnology* 12, 63-89 (1993).
- 130 Shackney, S. E., McCormack, G. W. & Cuchural, G. J., Jr. Growth rate patterns of solid tumors and their relation to responsiveness to therapy: an analytical review. *Ann Intern Med* 89, 107-121 (1978).
- 131 Abel, E. V. & Simeone, D. M. Biology and clinical applications of pancreatic cancer stem cells. *Gastroenterology* 144, 1241-1248, doi:10.1053/j.gastro.2013.01.072 (2013).
- 132 Wei, X., Wang, J., He, J. *et al.* Biological characteristics of CD133(+) cancer stem cells derived from human laryngeal carcinoma cell line. *International journal of clinical and experimental medicine* 7, 2453-2462 (2014).
- 133 Moeller, B. J., Dreher, M. R., Rabbani, Z. N. *et al.* Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. *Cancer Cell* 8, 99-110, doi:10.1016/j.ccr.2005.06.016 (2005).
- 134 Fruehauf, J. P. In vitro assay-assisted treatment selection for women with breast or ovarian cancer. *Endocr Relat Cancer* 9, 171-182 (2002).
- 135 Teicher, B. A. In vivo/ex vivo and in situ assays used in cancer research: a brief review. *Toxicol Pathol* 37, 114-122 (2009).
- 136 Samson, D. J., Seidenfeld, J., Ziegler, K. *et al.* Chemotherapy sensitivity and resistance assays: a systematic review. *J Clin Oncol* 22, 3618-3630 (2004).
- 137 Mattern, J. & Volm, M. Clinical relevance of predictive tests for cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev* 9, 267-298 (1982).
- 138 Siolas, D. & Hannon, G. J. Patient-derived tumor xenografts: transforming clinical samples into mouse models. *Cancer Res* 73, 5315-5319, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1069 (2013).
- 139 Mattern, J., Jager, S., Sonka, J. *et al.* Growth of human bronchial carcinomas in nude mice. *Br J Cancer* 51, 195-200 (1985).
- 140 Aamdal, S., Fodstad, O., Nesland, J. M. *et al.* Characteristics of human tumour xenografts transplanted under the renal capsule of immunocompetent mice. *Br J Cancer* 51, 347-356 (1985).
- 141 Bailey, M. J., Jones, A. J., Shorthouse, A. J. *et al.* Limitations of the human tumour xenograft system in individual patient drug sensitivity testing. *Br J Cancer* 50, 721-724 (1984).
- 142 Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, D. K. e. V. u. D. K. e. V. Leitlinienprogramm Onkologie | S3-Leitlinie Brustkrebs |. (2012).

-
- 143 Goldhirsch, A., Ingle, J. N., Gelber, R. D. *et al.* Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 20, 1319-1329, doi:10.1093/annonc/mdp322 (2009).
- 144 Weisenthal_Cancer_Group. DISC (Differential Staining Cytotoxicity) assay. <http://weisenthalcancer.com/Technology.html> (2013).
- 145 Bird, M. C., Godwin, V. A., Antrobus, J. H. *et al.* Comparison of in vitro drug sensitivity by the differential staining cytotoxicity (DiSC) and colony-forming assays. *Br J Cancer* 55, 429-431 (1987).
- 146 Bourke, S., Mason, H. S., Borok, Z. *et al.* Development of a lung slice preparation for recording ion channel activity in alveolar epithelial type I cells. *Respir Res* 6, 40, doi:10.1186/1465-9921-6-40 (2005).
- 147 Wolf, B., Thompson, J. & Schwinde, A. An ultrastructural morphometric analysis of normal human mammary tissue and human breast cancer. *Anticancer Res* 5, 211-219 (1985).
- 148 Wolf, B., Dinger, V., Weiler, C. *et al.* Drug targeting and metabolic investigations of cryoprepared tumor cells with analytical electron energy loss spectroscopy. *Tumour Biol* 17, 234-250 (1996).
- 149 Saitou, M., Isonishi, S., Hamada, T. *et al.* Mitochondrial ultrastructure-associated chemotherapy response in ovarian cancer. *Oncol Rep* 21, 199-204 (2009).
- 150 Mankoff, D. A., Eary, J. F., Link, J. M. *et al.* Tumor-specific positron emission tomography imaging in patients: [¹⁸F] fluorodeoxyglucose and beyond. *Clin Cancer Res* 13, 3460-3469, doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0074 (2007).
- 151 Murakami, R., Kumita, S., Yoshida, T. *et al.* FDG-PET/CT in the diagnosis of recurrent breast cancer. *Acta radiologica* 53, 12-16, doi:10.1258/ar.2011.110245 (2012).
- 152 Naoe, H., Kaku, E., Ido, Y. *et al.* Brain metastasis from gastrointestinal stromal tumor: a case report and review of the literature. *Case reports in gastroenterology* 5, 583-589, doi:10.1159/000333403 (2011).
- 153 Hamburger, A. & Salmon, S. E. Primary bioassay of human myeloma stem cells. *J Clin Invest* 60, 846-854, doi:10.1172/JCI108839 (1977).
- 154 O'Meara, A. T. & Sevin, B. U. Predictive value of the ATP chemosensitivity assay in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 83, 334-342, doi:10.1006/gyno.2001.6395 (2001).
- 155 Spyridonidis, A., Bernhardt, W., Behringer, D. *et al.* Proliferation and survival of mammary carcinoma cells are influenced by culture conditions used for ex vivo expansion of CD34(+) blood progenitor cells. *Blood* 93, 746-755 (1999).
- 156 TherapySelect_GmbH. <http://www.therapysselect.de/home.htm> (2013).
- 157 Sondak, V. K., Bertelsen, C. A., Tanigawa, N. *et al.* Clinical correlations with chemosensitivities measured in a rapid thymidine incorporation assay. *Cancer Res* 44, 1725-1728 (1984).
- 158 EXIQON_Diagnostics. <http://www.exiqon.com> (2013).
- 159 Xu, J. M., Song, S. T., Tang, Z. M. *et al.* Evaluation of in vitro chemosensitivity of antitumor drugs using the MTT assay in fresh human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 49, 251-259 (1998).
- 160 Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63 (1983).
- 161 Al-Nasiry, S., Geusens, N., Hanssens, M. *et al.* The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum Reprod* 22, 1304-1309, doi:10.1093/humrep/dem011 (2007).
- 162 Zalata, A. A., Lammertijn, N., Christophe, A. *et al.* The correlates and alleged biochemical background of the resazurin reduction test in semen. *International journal of andrology* 21, 289-294 (1998).
- 163 Kawada, K., Yonei, T., Ueoka, H. *et al.* Comparison of chemosensitivity tests: clonogenic assay versus MTT assay. *Acta medica Okayama* 56, 129-134 (2002).
- 164 Andreotti, P. E., Cree, I. A., Kurbacher, C. M. *et al.* Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Res* 55, 5276-5282 (1995).
- 165 Konecny, G., Crohns, C., Pegram, M. *et al.* Correlation of drug response with the ATP tumorchemosensitivity assay in primary FIGO stage III ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 77, 258-263 (2000).
- 166 CellTrend_GmbH. Proliferations-Assays. <http://www.celltrend.de> (2013).
- 167 L.a.n.c.e_Laborgemeinschaft_für_angewandte_Neoplasieforschung_und_Cytostatika-Evaluation. Cell Search Test. <http://www.lance.de> (2013).
- 168 DCS_Innovative_Diagnostik-Systeme_GmbH. SartoriTest. <http://www.dcs-diagnostics.de> (2013).
- 169 GenomicHealth. Oncotype DX. <http://www.genomichealth.com/> (2013).
- 170 Agendia. MammaPrint. www.agendia.com.
- 171 American_Diagnostica_GmbH. Femtelle. <http://www.femtelle.de/> (2013).
- 172 Sutherland, R. M., Sordat, B., Bamat, J. *et al.* Oxygenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma. *Cancer Res* 46, 5320-5329 (1986).

- 173 Dufau, I., Frongia, C., Sicard, F. *et al.* Multicellular tumor spheroid model to evaluate spatio-temporal dynamics effect of chemotherapeutics: application to the gemcitabine/CHK1 inhibitor combination in pancreatic cancer. *BMC cancer* 12, 15, doi:10.1186/1471-2407-12-15 (2012).
- 174 Ho, W. Y., Yeap, S. K., Ho, C. L. *et al.* Development of multicellular tumor spheroid (MCTS) culture from breast cancer cell and a high throughput screening method using the MTT assay. *PLoS One* 7, e44640, doi:10.1371/journal.pone.0044640 (2012).
- 175 Spherotec_GmbH. SpheroTest. www.spherotec.com (2013).
- 176 Ekelund, S., Nygren, P. & Larsson, R. Microphysiometry: new technology for evaluation of anticancer drug activity in human tumor cells in vitro. *Anticancer Drugs* 9, 531-538 (1998).
- 177 Hafner, F. Cytosensor Microphysiometer: technology and recent applications. *Biosens Bioelectron* 15, 149-158 (2000).
- 178 Mestres, P. & Morguet, A. The Bionas technology for anticancer drug screening. *Expert opinion on drug discovery* 4, 785-797 (2009).
- 179 Wu, M., Neilson, A., Swift, A. L. *et al.* Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C125-136 (2007).
- 180 Xiao, C., Lachance, B., Sunahara, G. *et al.* Assessment of cytotoxicity using electric cell-substrate impedance sensing: concentration and time response function approach. *Anal Chem* 74, 5748-5753 (2002).
- 181 Applied_BioPhysics. Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS). <http://www.biophysics.com> (2013).
- 182 RädlerR, U. & Wegener, J. Impedanzbasiertes Screening adhärenter Zellen. *BIOspektrum* 05.09, 535-537.
- 183 Keese, C. R., Wegener, J., Walker, S. R. *et al.* Electrical wound-healing assay for cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1554-1559, doi:10.1073/pnas.0307588100 (2004).
- 184 Molecular_Devices. CellKey. <http://www.moleculardevices.com/> (2013).
- 185 ACEA_Biosciences. <http://www.aceabio.com> (2013).
- 186 Roche_Applied_Science. xCelligence. <http://www.roche.com/> (2013).
- 187 Obr, A., Roselova, P., Grebenova, D. *et al.* Real-time monitoring of hematopoietic cell interaction with fibronectin fragment: the effect of histone deacetylase inhibitors. *Cell adhesion & migration* 7, 275-282, doi:10.4161/cam.24531 (2013).
- 188 Mandel, K., Seidl, D., Rades, D. *et al.* Characterization of spontaneous and TGF-beta-induced cell motility of primary human normal and neoplastic mammary cells in vitro using novel real-time technology. *PLoS one* 8, e56591, doi:10.1371/journal.pone.0056591 (2013).
- 189 Dreesen, O., Chojnowski, A., Ong, P. F. *et al.* Lamin B1 fluctuations have differential effects on cellular proliferation and senescence. *J Cell Biol* 200, 605-617, doi:10.1083/jcb.201206121 (2013).
- 190 Rammah, M., Dandachi, F., Salman, R. *et al.* In vitro cytotoxicity and mutagenicity of mainstream waterpipe smoke and its functional consequences on alveolar type II derived cells. *Toxicol Lett* 211, 220-231, doi:10.1016/j.toxlet.2012.04.003 (2012).
- 191 McConnell, H. M., Owicki, J. C., Parce, J. W. *et al.* The cytosensor microphysiometer: biological applications of silicon technology. *Science* 257, 1906-1912 (1992).
- 192 Institute_for_In_Vitro_Sciences. Cytosensor Microphysiometer Assay. <http://www.iivs.org/scientific-services/laboratory-services/ocular-irritation/cytosensor/>.
- 193 SeahorseBioscience. <http://www.seahorsebio.com/>. (2012).
- 194 Ferrick, D. A., Neilson, A. & Beeson, C. Advances in measuring cellular bioenergetics using extracellular flux. *Drug Discov Today* 13, 268-274, doi:10.1016/j.drudis.2007.12.008 (2008).
- 195 Bionas_GmbH. <http://www.bionas-discovery.com>. (2013).
- 196 cellasys_GmbH. <http://www.cellasys.com/>. (2013).
- 197 Lehmann, M., Brischwein, M., Baumann, W. *et al.* Vorrichtung zur Durchführung von Untersuchungen an Zellkulturen. DE 19920811 A1 (2000).
- 198 Sieben, U. & Wolf, B. Vorrichtung zur Durchführung von Untersuchungen an Zellproben und dergleichen. EP 0938383 B1 (2000).
- 199 Baumann, W., Dumbs, A., Sieben, U. *et al.* Objektträger für Mikroskop EP 0760095 B1 (1998).
- 200 Sieben, U. & Wolf, B. Meßeinrichtung DE19704237 A1 (1998).
- 201 Schwarzenberger, T., Wolf, P., Brischwein, M. *et al.* Impedance sensor technology for cell-based assays in the framework of a high-content screening system. *Physiol Meas* 32, 977-993.
- 202 Institut_für_diagnostische_Histopathologie_und_Zytologie. Prof. Dr. med. A. Niendorf. *Lornsenstraße* 4, 22767_Hamburg (2011).
- 203 Zeiss_MicroImaging_GmbH, C. Hyrax V50. <http://www.zeiss.de>, Germany (2013).

-
- 204 Vaira, V., Fedele, G., Pyne, S. *et al.* Preclinical model of organotypic culture for pharmacodynamic profiling of human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 8352-8356.
- 205 Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A. *et al.* A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51, 1409-1416 (1973).
- 206 Abernethy, G., Otter, D., Arnold, K. *et al.* Determination of immunoglobulin G in bovine colostrum and milk powders, and in dietary supplements of bovine origin by protein G affinity liquid chromatography: collaborative study. *J AOAC Int* 93, 622-627.
- 207 Alborzinia, H., Can, S., Holenya, P. *et al.* Real-time monitoring of cisplatin-induced cell death. *PLoS One* 6, e19714, doi:10.1371/journal.pone.0019714 (2011).
- 208 Cree, I. A. Designing personalised cancer treatments. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 172, 405-409, doi:10.1016/j.jconrel.2013.07.007 (2013).
- 209 Barendsen, G. W., Janse, H. C., Deys, B. F. *et al.* Comparison of growth characteristics of experimental tumours and derived cell cultures. *Cell and tissue kinetics* 10, 469-475 (1977).
- 210 Berry, R. J., Laing, A. H. & Wells, J. Fresh explant culture of human tumours in vitro and the assessment of sensitivity to cytotoxic chemotherapy. *Br J Cancer* 31, 218-227 (1975).
- 211 Petersen, L. Wirkspiegel des Ifofamidmetaboliten Chloroacetaldehyd im Verhältnis zu den Thiolen Cystein, Glutathion und Mesna im Blut und in menschlichen Tumoren bei der Nacktmaus. *Inauguraldissertation* (2003).
- 212 Otto, A. M., Brischwein, M., Motrescu, E. *et al.* Analysis of drug action on tumor cell metabolism using electronic sensor chips. *Arch Pharm (Weinheim)* 337, 682-686, doi:10.1002/ardp.200400915 (2004).
- 213 Ceriotti, L., Kob, A., Drechsler, S. *et al.* Online monitoring of BALB/3T3 metabolism and adhesion with multiparametric chip-based system. *Anal Biochem* 371, 92-104 (2007).
- 214 Motrescu, E. R., Otto, A. M., Brischwein, M. *et al.* Dynamic analysis of metabolic effects of chloroacetaldehyde and cytochalasin B on tumor cells using bioelectronic sensor chips. *J Cancer Res Clin Oncol* 131, 683-691, doi:10.1007/s00432-005-0015-2 (2005).
- 215 Walker, G. M., Zeringue, H. C. & Beebe, D. J. Microenvironment design considerations for cellular scale studies. *Lab Chip* 4, 91-97, doi:10.1039/b311214d (2004).
- 216 Wolf, P., Hartl, F., Brischwein, M. *et al.* Determination of dynamic doxorubicin-EC50 value in an automated high-content workstation for cellular assays. *Toxicol In Vitro* 25, 1889-1894, doi:10.1016/j.tiv.2011.05.031 (2011).
- 217 Kunzelmann, K. Ion channels and cancer. *J Membr Biol* 205, 159-173, doi:10.1007/s00232-005-0781-4 (2005).
- 218 Gerweck, L. E., Kozin, S. V. & Stocks, S. J. The pH partition theory predicts the accumulation and toxicity of doxorubicin in normal and low-pH-adapted cells. *Br J Cancer* 79, 838-842, doi:10.1038/sj.bjc.6690134 (1999).
- 219 Barendsen, G. W. Analysis of tumour responses by excision and in vitro assay of cellular clonogenic capacity. *The British journal of cancer. Supplement* 4, 209-216 (1980).
- 220 Hofer, K. G., Warters, R. L., Rolfes, T. H. *et al.* Viability of tumor cells in mechanically and enzymatically prepared tissue suspensions. *Eur J Cancer* 10, 49-55 (1974).
- 221 de Kanter, R., Monshouwer, M., Meijer, D. K. *et al.* Precision-cut organ slices as a tool to study toxicity and metabolism of xenobiotics with special reference to non-hepatic tissues. *Current drug metabolism* 3, 39-59 (2002).
- 222 van Geer, M. A., Kuhlmann, K. F., Bakker, C. T. *et al.* Ex-vivo evaluation of gene therapy vectors in human pancreatic (cancer) tissue slices. *World J Gastroenterol* 15, 1359-1366 (2009).
- 223 van der Kuip, H., Murdter, T. E., Sonnenberg, M. *et al.* Short term culture of breast cancer tissues to study the activity of the anticancer drug taxol in an intact tumor environment. *BMC cancer* 6, 86, doi:1471-2407-6-86 [pii] 10.1186/1471-2407-6-86 (2006).
- 224 Gatenby, R. A. & Gillies, R. J. Glycolysis in cancer: a potential target for therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 1358-1366, doi:10.1016/j.biocel.2007.03.021 (2007).
- 225 Pouyssegur, J., Dayan, F. & Mazure, N. M. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441, 437-443, doi:10.1038/nature04871 (2006).
- 226 Hornberger, J., Cosler, L. E. & Lyman, G. H. Economic analysis of targeting chemotherapy using a 21-gene RT-PCR assay in lymph-node-negative, estrogen-receptor-positive, early-stage breast cancer. *Am J Manag Care* 11, 313-324 (2005).
- 227 Burstein, H. J., Mangu, P. B., Somerfield, M. R. *et al.* American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update on the use of chemotherapy sensitivity and resistance assays. *J Clin Oncol* 29, 3328-3330.