



## **Charakterisierung eines neuen therapeutischen Antikörpers gegen das Knochensialoprotein durch Analyse in der 3D Zellkultur im Vergleich zur 2D Zellkultur**

Autor: Valeh Rustamov  
Institut / Klinik: Institut für Molekular- und Zellbiologie der Hochschule Mannheim  
Doktorvater: Prof. Dr. M. Hafner

Normalerweise ist das Knochensialoprotein (BSP) als ein wichtiger Mitwirkender bei der Mikrokalzifikation des Knochens beteiligt. Es wird jedoch auch in hohem Maße bei Prostata-, Lungen- und Brustkrebs sezerniert. Bei diesen Erkrankungen korreliert eine hohe Expression von BSP mit einer schlechten Prognose. Die Expression in dreifach negativen Brustkrebszellen wird durch den Transkriptionsfaktor RUNX2 verstärkt. Außerdem stehen sowohl BSP als auch RUNX2 unter der Kontrolle von IGF-1 und TGF- $\beta$ 1. Es wurde festgestellt, dass Knockdown von BSP oder dessen Inaktivierung durch spezifische Antikörper das metastatische Potenzial von dreifach negativen MDA-MB-231-Brustkrebszellen im Xenograft verringert. Bisher wurde die Rolle von BSP bei der Knochenmetastasierung mit *in vivo* Modellen untersucht, es fehlen aber valide *in vitro* Testsysteme zur Untersuchung der BSP-Biologie. Darüber hinaus lässt sich die häufig verwendete Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 unter 3D Kultur Bedingungen nur schwer kultivieren. In dieser Arbeit wurde ein Langzeit 3D Sphäroidmodell mit MDA-MB-231 Zellen in einem Sandwich Ansatz entwickelt, bei dem die Zellen zwischen einer nicht anhaftenden Oberfläche und Basalmembranextrakten eingebettet werden. Dies ermöglichte ein konstantes Wachstum der Sphäroide für mehr als 21 Tage. Auch die gemeinsame Kultivierung von MDA-MB-231 Zellen mit CCD-1137Sk Fibroblasten ergab stabil wachsende Sphäroide, was auf die Bedeutung der extrazellulären Matrix (EZM) in diesem Prozess hindeutet. Darüber hinaus wurde hier ein neues und einfaches Open-Source Analysewerkzeug entwickelt, um die Proteinexpression in 2D Kulturen und Sphäroiden durch Immunfluoreszenz zu charakterisieren. Unter Verwendung dieser Analysemethode in Kombination mit der Western-Blot Analyse wurde das Expressionsprofil von BSP charakterisiert. BSP wurde an der Oberfläche von Sphäroiden in Mono- als auch in Kokulturen angereichert, und seine Häufigkeit korrelierte im Allgemeinen mit der von TGF- $\beta$ 1 unter verschiedenen Bedingungen, einschließlich Sphäroid-Reifung, zytostatischer Behandlung und Kokultivierung mit Fibroblasten. Allerdings war eine Korrelation zwischen IGF-1 und BSP auf Monokultur- Zeitverlaufsprofile beschränkt. Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit neue Werkzeuge entwickelt, um die Regulation der Genexpression von BSP in Kombination mit der Zellproliferation und Apoptose in einem langfristigen Brustkrebs 3D Modell zu untersuchen.