



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Quantification of drug treatment response
of tumor spheroids in mono- and coculture with fibroblasts**

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

Das Ziel dieses Projekts war die Evaluierung möglicher Veränderungen in der Wirkung der Chemotherapeutika Paclitaxel und Doxorubicin durch die extrazelluläre Matrix (EZM). Dies wurde durchgeführt, indem Tumorzellen der KP4 Zelllinie in Kokultur mit Fibroblasten der Zelllinie CCD-1137Sk generiert wurden. Die zentrale Fragestellung war, ob diese Kokultivierung eine signifikante Auswirkung auf die Effektivität der genannten Chemotherapeutika zeigte und inwiefern die Modifizierung der extrazellulären Matrix mithilfe von Matrigel hierbei eine Rolle spielen könnte. Dazu wurden mittels Microtissues® Molds Sphäroide der KP4 Zelllinie in Monokultur und mit Fibroblasten in Kokultur generiert. In weiteren Versuchsreihen wurden die KP4 Zellen in Monokultur und KP4-Fibroblasten-Kokultur in Matrigel eingebettet. Nach dreitägiger Reifung der Zellen formten sich Sphäroide, die anschließend mit den Chemotherapeutika Paclitaxel und Doxorubicin in den Konzentrationen 0 μ M, 0,2 μ M, 1 μ M und 5 μ M für jeweils 96 und 144 Stunden behandelt wurden. Anschließend wurden die Sphäroide fixiert, dehydriert und eingefroren, um anschließend Kryoschnitte anzufertigen.

Am Kryostat wurden dann 15 μ m dünne Schnitte angefertigt, die immunhistologisch gefärbt wurden. Hierbei wurden die Antikörper Ki-67, Cleaved-Caspase-3, Draq-5 und Kollagen Typ 1 verwendet. Während Draq-5 die Zellkerne anfärbt, färbt Ki-67 die proliferierenden Zellen, Cleaved-Caspase-3 die apoptotischen Zellen und Kollagen-1 den Anteil an Kollagen Typ 1, der in den Sphäroiden sezerniert wurde. Es wurden Aufnahmen am konfokalen Mikroskop von den gefärbten Schnitten gemacht und anschließend mit der Software CellProfiler segmentiert und quantifiziert.

Unterschiedliche Konzentrationen der Chemotherapeutika Paclitaxel und Doxorubicin in den Tumorsphäroiden in Mono- und Kokultur zeigten nach 96 und 144 Stunden einen Effekt auf die Größe der Sphäroide sowie auf den Anteil proliferierender und apoptotischer Zellen. Der prozentuale Anteil der proliferierenden Zellen nahm in allen Experimenten mit steigender Konzentration der Chemotherapeutika ab. Der Anteil an apoptotischen Zellen nahm zu. Im Vergleich der einzelnen Versuchsreihen stellte sich heraus, dass die Fibroblasten eine verstärkende Wirkung auf die Proliferation hatten im Vergleich zu den Monokulturen ohne Fibroblasten. Gleichzeitig stieg jedoch die Apoptoserate in Anwesenheit der Fibroblasten signifikant an. Die Anwesenheit des Matrigels begünstigte sowohl die Proliferation als auch die Apoptose, am stärksten in den Kokulturen mit Fibroblasten. Die Färbung mit dem Antikörper Kollagen-1 wurde verwendet, um die qualitative Verteilung des Kollagens innerhalb der Sphäroide zu visualisieren.

Es konnte gezeigt werden, dass die extrazelluläre Matrix einen erheblichen Einfluss auf die Tumorprogression hatte. Es wurden Wechselwirkungen der KP4 Tumorzellen mit den beiden Chemotherapeutika Paclitaxel und Doxorubicin gezeigt, welche sich in der Sensitivität und Resistenz gegenüber diesen manifestierten. Es ist anzumerken, dass die Wechselwirkung zwischen der Proliferation und Apoptose der Tumorzellen auf eine sogenannte Apoptose-induzierte Proliferation zurückzuführen ist, welche eine Herausforderung in der gezielten Tumorthherapie darstellt. Das Matrigel sollte eine zusätzliche Imitierung der in-vivo EZM darstellen. Diese Kulturbedingung zeigte signifikante Auswirkungen auf die Sphäroide, wobei eine einheitliche, standardisierte Festlegung dieses Verhältnisses nicht vorgegeben war und daher eine Veränderung des Verhältnisses zu signifikanten Unterschieden führen könnte. Eine realitätsnähere Nachahmung des Tumormikromilieus kann auch durch die Verwendung von CAFs beispielsweise aufgrund der Beeinflussung auf den Warburg-Effekt und die damit einhergehende Resistenz der Krebszellen gegenüber den Chemotherapeutika erzeugt werden.