

Optimierung des Chemosensitivitätstests ChemoSelect® und
Untersuchung der Möglichkeit des Nachweises einer Wirkung des
monoklonalen Antikörpers Herceptin in diesem diagnostischen
Testverfahren

Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt von

Dirk Waldenmaier
aus Berlin

Department Biologie II, Anthropologie und Humangenetik

Zur Beurteilung eingereicht am 22.06.2004

Diese Arbeit wurde bei der Firma CellControl Diagnostics GmbH & Co. KG,
Martinsried unter der Anleitung von Dr. Frank C. Kischkel durchgeführt.

Ein Teil dieser Arbeit wurde publiziert als Waldenmaier et al., Toxicology and Applied
Pharmacology, 2003: 192(3):237-45.

Erstgutachter: Prof. Dr. E. H. Weiß
Zweitgutachter: Prof. Dr. W. Schartau
Sondervotum: Dr. F. C. Kischkel

Tag der mündlichen Prüfung: 30.07.2004

1	Zusammenfassung	4
2	Einleitung.....	6
2.1	Epidemiologie von Krebserkrankungen.....	6
2.2	Medikamentöse Krebstherapie.....	8
2.2.1	Chemotherapie.....	8
2.2.1.1	Alkylanzien.....	9
2.2.1.2	Antimetabolite	10
2.2.1.3	Mitosehemmer / Spindelgifte.....	10
2.2.1.4	Interkalanzien: Anthrazykline	11
2.2.2	Tumorzellspezifische Therapeutika.....	11
2.3	Klassische Kriterien zur Therapiewahl	14
2.4	Chemosensitivitätstestung	14
2.5	Das Cytosensor Mikrophysiometer.....	16
2.6	Der ChemoSelect®-Test.....	18
3	Zielsetzung der Arbeit.....	20
4	Material und Methoden.....	21
4.1	Material	21
4.1.1	Therapeutika	21
4.1.2	Zelllinien.....	21
4.1.3	Puffer und Medien.....	22
4.1.4	Reagenzien.....	22
4.1.5	Verbrauchsmaterialien	23
4.1.6	Testkits.....	23
4.1.7	Geräte	23
4.2	Methoden	24
4.2.1	Zellkultur.....	24
4.2.2	Mykoplasmen-Detektion.....	25
4.2.3	Langzeitlagerung von Zelllinien.....	26
4.2.4	Isolation von Tumorzellen aus Primärgewebe.....	26
4.2.5	MTS-Test	27
4.2.6	Kristallviolett-Test.....	27
4.2.7	ChemoSelect®-Test.....	27
4.2.8	Auswertung der Daten des ChemoSelect®-Tests	28
4.2.9	Zellzyklusanalyse	29

4.2.10	Immunhistochemischer Nachweis des Her2/neu Rezeptors	29
5	Ergebnisse	31
5.1	Grundsätzliche Untersuchung des bestehenden Tests	31
5.1.1	Medium	31
5.1.2	Reproduzierbarkeit	34
5.1.3	Einfluss der Zellzahl	35
5.1.4	Verlässlichkeit	37
5.2	Optimierung des Mediums	39
5.2.1	Glukose	39
5.2.2	Phosphat	41
5.2.3	Serum	42
5.2.3.1	Konzentration	42
5.2.3.2	Ersatzstoffe	45
5.2.3.3	FCS Chargentest	47
5.2.4	SeleX	49
5.3	Optimierung der Zellzahl	50
5.4	Verlässlichkeit	52
5.4.1	Alkylanzien	53
5.4.2	Antimetabolite	54
5.4.3	Mitosehemmer / Spindelgifte	56
5.4.4	Interkalanzien: Anthrazykline	58
5.5	Untersuchung tumorspezifischer Therapeutika	59
5.5.1	Nachweis des Her2/neu Rezeptors	60
5.5.2	Herceptin	61
5.5.3	Kombination von Herceptin mit Chemotherapeutika	64
6	Diskussion	68
6.1	Der ChemoSelect [®] -Test	68
6.1.1	Medium	69
6.1.2	Reproduzierbarkeit	73
6.1.3	Verlässlichkeit	74
6.1.4	Anwendbarkeit	77
6.1.5	Ausblick: Klinische Validierung	80
6.2	Herceptin-Test	82
6.3	Abschlussbetrachtung	87

7	Literaturverzeichnis	89
8	Anhang	94
8.1	Abkürzungen	94
8.2	Zusammensetzung des SeleX-Mediums	95
8.3	Veröffentlichung	96
8.4	Lebenslauf	105

1 Zusammenfassung

Krebs stellt heute in den Industrieländern die zweithäufigste Todesursache dar. In der Therapie von Krebserkrankungen spielt die Chemotherapie neben der operativen Entfernung und der Bestrahlung als systemische Behandlungsform eine wichtige Rolle. Forscher unternehmen große Bemühungen, neue und verbesserte Therapieformen gegen Krebs zu entwickeln. Diese Aktivität hat dazu geführt, dass heute zahlreiche Medikationen erhältlich sind, die gegen Krebs einsetzbar sind. In Folge dieser Entwicklungen ist die Therapiewahl schwieriger geworden. Obwohl pathologisch diagnostizierte Charakteristika eine gewisse Selektion erlauben, gehen diese Klassifizierungen nicht weit genug, um auf die individuellen Bedürfnisse des Krebspatienten einzugehen.

Prätherapeutische *in vitro* Chemosensitivitätstests bieten die Möglichkeit, Behandlungserfolge durch eine Individualisierung der Chemotherapie für Krebspatienten zu vergrößern. Für diese Untersuchungen werden dem Patienten Tumorzellen entnommen, und *ex vivo* mit in Frage kommenden Therapeutika in Kontakt gebracht. Dabei lässt sich herausgefunden, welche Therapeutika eine Wirkung auf die individuellen Tumorzellen zeigen. Bis heute sind solche Testverfahren unter Onkologen umstritten und eine Integration dieser Verfahren in den medizinischen Alltag ist noch nicht realisiert.

Unterschiedliche methodische Herangehensweisen existieren in der Chemosensitivitätstestung. In dieser Arbeit wurde der bestehende ChemoSelect[®]-Test grundlegend untersucht und optimiert. Die Optimierung diente dazu, Durchführbarkeit und Vorhersagekraft des Verfahrens zu vergrößern und eine breite Anwendbarkeit des Tests zu ermöglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass Chemosensitivitäten in bestimmten Grenzen unabhängig von der Zellzahl reproduzierbar im Test nachzuweisen sind. Mit Hilfe eines optimierten Mediums konnte der Einsatzbereich des Tests mittels einer Reduktion der erforderlichen Zellzahl vergrößert werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass die im ChemoSelect[®]-Test gemessene Ansäuerungsrate mit der Proliferation der Zellen korreliert. Untersuchungen ergaben eine gute Vergleichbarkeit des Tests mit verschiedenen Proliferationstests. Für Vertreter der

wichtigsten Chemotherapeutikaklassen ließen sich *in vitro* spezifische Wirkungen nachweisen.

Basierend auf den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit wurde ein grundlegendes Konzept für eine klinische Validierungsstudie aufgesetzt, mit welchem innerhalb von zwei Jahren überprüft werden kann, wie hoch der prädiktive Wert des Tests ist.

Ferner wurde die Möglichkeit untersucht, im Test Sensitivitäten gegenüber neuartigen, spezifisch gegen Tumorzellen gerichteten Therapeutika nachzuweisen. Als Beispiel für ein solches Therapeutikum wurde der monoklonale Antikörper Herceptin verwendet, der gegen den Her2/neu Rezeptor gerichtet ist. Im Testsystem ließ sich eine Wirkung des monoklonalen Antikörpers sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Chemotherapie nachweisen. Dieser Effekt war spezifisch bei Zellen zu beobachten, die sich durch eine Überexpression des Her2/neu Rezeptors auszeichneten.

2 Einleitung

2.1 Epidemiologie von Krebserkrankungen

Während in der Vergangenheit Infektionskrankheiten im Mittelpunkt der medizinischen Forschung standen, spielt die Krebsforschung heute eine zunehmend wichtige Rolle. Krebs beschreibt im klassischen Sinne alle bösartigen Neubildungen (Neoplasien). Diese Neubildungen bestehen aus entarteten Zellen, die sich von Normalzellen unterscheiden und sich von ihrem Ursprungsort über das Blut- oder Lymphsystem in andere Organe ausbreiten können, um dort Tochtergeschwülste (Metastasen) zu bilden. Grundsätzlich lässt sich Krebs in solide und nicht solide Arten unterteilen. Mit Leukämien als Hauptvertreter stellen Hämoblastosen die nicht solide Form dar. Innerhalb der soliden Krebsarten lässt sich weiter zwischen Karzinomen und Sarkomen unterscheiden. Während Karzinome aus Epithelzellen wie der Haut, Schleimhaut oder Drüsen entstehen, stammen Sarkome vornehmlich aus Bindegewebszellen (Fibrosarkom), Muskelzellen (Myosarkom), Fettzellen (Liposarkom) oder Knochenzellen (Osteosarkom).

Weltweit werden jährlich ca. 9 Mio Krebsdiagnosen gestellt. Nach Angaben des Robert-Koch-Institutes erkrankten in Deutschland im Jahre 1998 ca. 350.000 Menschen an Krebs. Davon verteilte sich jeweils etwa die Hälfte der Fälle auf beide Geschlechter, wobei es klare Unterschiede in der Häufigkeit der verschiedenen Krebsarten zwischen den Geschlechtern gibt, wie Abbildung 1 zeigt.

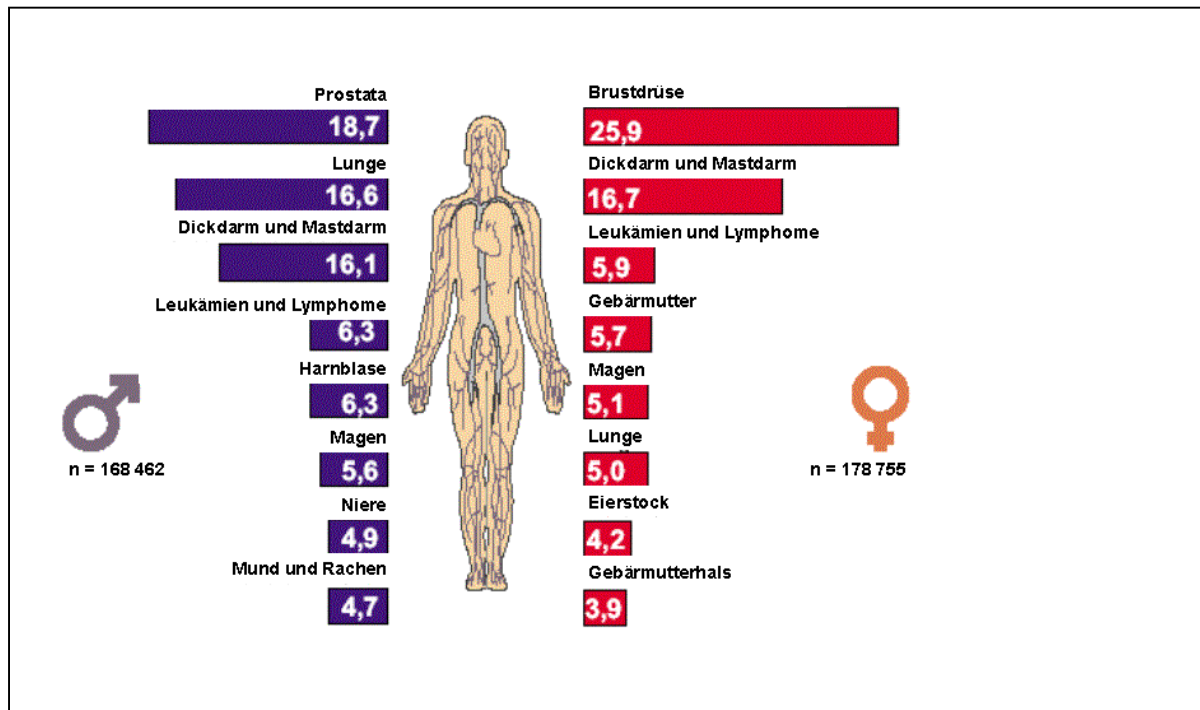


Abbildung 1: Prozentuale Anteile der häufigsten Krebsformen an der Gesamtzahl 1998 in Deutschland. (Aus: Informationen des RKI, 2002)

Nach Angaben des statistischen Bundesamtes stellte Krebs im Jahre 2002 in Deutschland nach Herz- und Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. In diesem Zeitraum wurde ein Viertel aller Todesfälle durch Krebs verursacht. Die Verteilung der Sterberate folgt dabei nicht der Häufigkeit der Erkrankung, sondern unterscheidet sich in einigen Fällen deutlich von dieser. Insgesamt starben die meisten Krebspatienten an Erkrankungen der Lunge, welche jedoch bei Frauen nur die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache darstellte. Bei Frauen führte der Brustkrebs, bei Männern hingegen der Lungenkrebs zu den meisten Todesfällen (Abbildung 2).

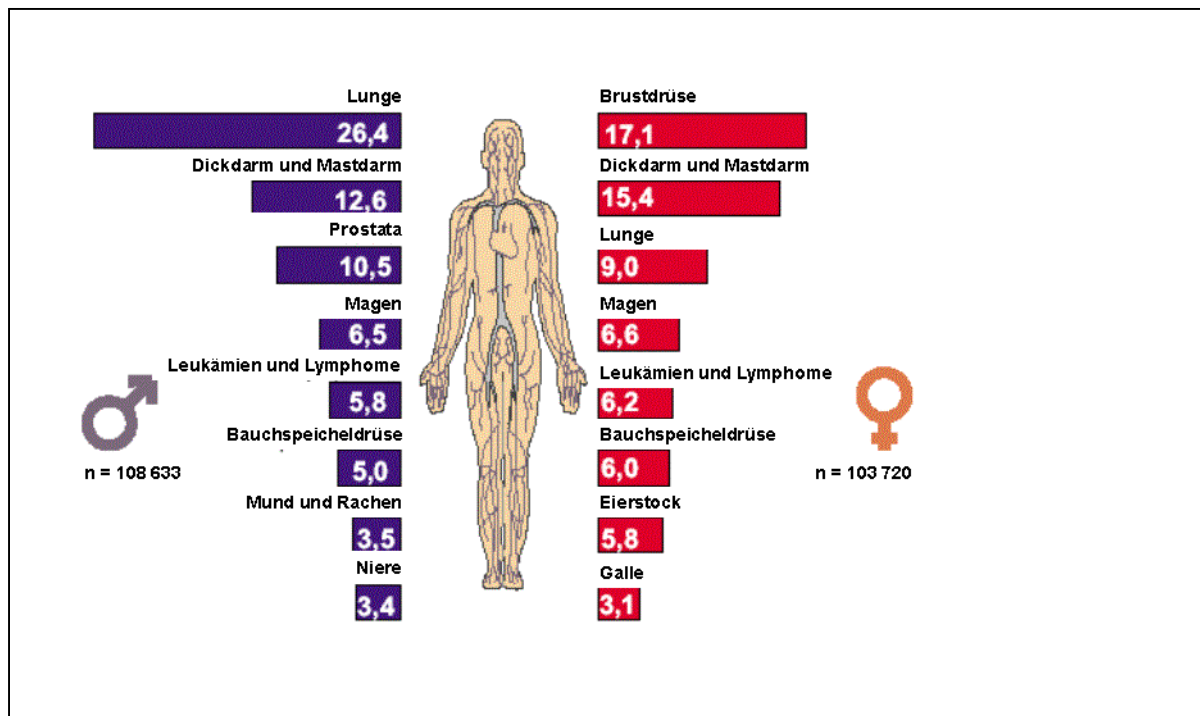


Abbildung 2: Verteilung der Häufigkeiten der krebisbedingten Tode im Jahre 1998 in Deutschland in Prozent. (Aus: Informationen des RKI, 2002)

2.2 Medikamentöse Krebstherapie

2.2.1 Chemotherapie

Ziel der Krebstherapie ist neben einer Verlängerung des Lebens auch eine Erhöhung der Lebensqualität. Diese Lebensqualität bemisst sich nach Kriterien wie der Symptomatik der Erkrankung und der Schwere der Nebenwirkungen der eingesetzten Therapie. Neben der operativen Therapie und der Bestrahlung zählt heute die Chemotherapie zu den drei Hauptsäulen in der Behandlung von Krebs. Im Gegensatz zu Operation und Bestrahlung handelt es sich hierbei um eine systemische Therapie, die auf den ganzen Körper wirkt, also beispielsweise auch auf Metastasen unbekannter Lokalisation. Mit ca. 200.000 Behandlungen pro Jahr in Deutschland erfährt der Großteil aller Krebspatienten im Laufe ihrer Therapie mindestens eine Chemotherapie. Diese Behandlungsform reicht bis in die 40er Jahre zurück und ist heute mit ca. 50 verschiedenen, zugelassenen Medikamenten vertreten. Im Laufe der Zeit wurden einerseits neuartige Chemotherapeutika

entwickelt, aber auch bekannte Substanzen überarbeitet, um beispielsweise Nebenwirkungen zu verringern. Selten ist es jedoch geschehen, dass auf diese Weise ein Therapeutikum durch eine neue oder verbesserte Version ersetzt wurde. Vielmehr ist es zu einer erheblichen Zunahme der Menge erhältlicher Therapeutika gekommen, die für eine Therapie zur Verfügung stehen. Ein Nebeneffekt dieser Entwicklungen ist, dass die Wahl des zu verabreichenden Therapeutikums für Ärzte immer schwieriger geworden ist.

Bezüglich der Nomenklatur der Chemotherapeutikagruppen ist anzumerken, dass von manchen Autoren eine Einteilung nach chemischer Verwandtschaft verwendet wird, während andere eine Einteilung nach Wirkmechanismen verwenden. Soweit nicht anders angemerkt, wurde in dieser Arbeit die Nomenklatur nach den zugrunde liegenden Wirkmechanismen verwendet.

2.2.1.1 Alkylanzien

Große Bedeutung innerhalb der Chemotherapeutika kommt den Alkylanzien zu. Diese bilden eine chemisch inhomogene Gruppe hauptsächlich organischer Verbindungen mit reaktiven Zentren. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie Alkylgruppen in organische Verbindungen wie DNA oder Proteine inserieren können. Die Auswirkungen dieser Substanzen ähneln denen ionisierender Strahlung, weshalb Substanzen dieser Klasse auch als Radiomimetika bezeichnet werden. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind die Stickstoff-Lost Derivate (Lost = Senfgas, nach den Erfindern: Lommel und Steinkopf). Hierzu gehören die Oxazaphosphorine, u. a. mit den Vertretern Cyclophosphamid, Maphosphamid und Iphosphamid. Sie wirken vornehmlich durch die Ausbildung von Quervernetzungen der DNA (Osieka et al., 1984). Eine ähnliche Wirkung wie Stickstoff-Lost-Derivate haben die monofunktionalen Nitroso-Harnstoffe. Zu diesen zählen u. a. Bendamustin, Carmustin oder Lomustin. Trotz ihrer Monofunktionalität bilden diese Substanzen ebenfalls Quervernetzungen der DNA aus (Weiss und Issell, 1982). Die Wirkung findet unter Ausbildung von Ethylbrücken statt (Kohn, 1977). Auch Methansulfonsäureester wie Busulfan oder Treosulfan wirken auf ähnliche Weise. Die Gruppe der Mitomycine mit dem für die Tumorthherapie wichtigen Stoff Mitomycin D stellen atypische Alkylanzien dar. Auch sie interagieren mit der DNA, indem sie Quervernetzungen ausbilden, wodurch die DNA-Replikation inhibiert wird (Tomasz et

al., 1987). Auch die sogenannten Platin-Analoga wirken, indem sie durch Interaktion mit funktionalen Gruppen der DNA diese quervernetzen. Durch diese Vernetzungen wird die Funktion der DNA als Matrize zerstört und die DNA-Synthese inhibiert (Knox et al., 1986), (Raymond et al., 1998). In die Gruppe der Platin-Analoga gehören die Substanzen Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin. Platin-Analoga werden aufgrund ihres sehr ähnlichen Wirkmechanismus oft im Zusammenhang mit den Alkylanzien erwähnt, obwohl sie nach der strengen Definition nicht dazu gehören.

2.2.1.2 Antimetabolite

Eine weitere wichtige Gruppe der Chemotherapeutika bilden die Antimetabolite. Die chemische Ähnlichkeit dieser Substanzen mit wichtigen Zellbausteinen führt zum Einbau dieser Substanzen in die Zellen. Aus solchen Fehleinbauten resultieren Funktionsstörungen der Zellen.

Die Klasse der Antimetabolite lässt sich in verschiedene Unterklassen einteilen, die nach den Strukturen benannt sind, welchen sie ähneln. Purinanaloga (z. B. Mercaptopurin, Thioguanin oder Pentostatin) hemmen die Synthese der Purinbasen Adenin und Guanin. Pyrimidinanaloga (z. B. 5'-Fluorouracil, Gemcitabin) hemmen die Replikation der DNA, indem sie als falsche Pyrimidinbasen in die DNA eingebaut werden und so ihre Synthese inhibieren (Huang et al., 1991). Mit der Substanz Methotrexat wurde ein weiterer Stoff entwickelt, der zelleigene Strukturen imitiert. Diese Substanz hemmt als Folsäureanalogon kompetitiv die Dihydrofolatreduktase, welche die Reduktion von Dihydrofolat zu dem für die DNA- und RNA-Synthese wichtigen Tetrahydrofolat katalysiert. Diese Reaktion führt so zu einer Inhibition der DNA- und RNA-Synthese (Morgan et al., 1994).

2.2.1.3 Mitosehemmer / Spindelgifte

Die Klasse Mitosehemmer / Spindelgifte inhibiert die Zellteilung durch eine Beeinflussung der Kernspindeln. Die im Rahmen der Zellteilung für die Aufteilung der Chromosomen auf beide Schwesterzellen wichtigen Mikrotubuli werden dabei entweder an ihrer Kondensation oder an ihrem Abbau gehindert. Dies führt entweder

zu einer irreversiblen Stabilisierung der Mikrotubuli, wie es durch Taxane bewirkt wird, oder zur Zerstörung dieser Strukturen, wie es durch Vincaalkaloide geschieht. Vincaalkaloide sind Naturstoffe, die aus Pflanzen der Gattung *Vinca rosea* gewonnen werden. Therapeutika dieser Klasse sind z. B. Vincristin, Vindesin oder Vinorelbin. Sie binden an Tubulin, die Untereinheit der Mikrotubuli und verhindern somit die Polymerisation dieser Moleküle (Goa und Faulds, 1994). Die Zellen verbleiben daraufhin in der Metaphase (Meininger et al., 1990).

Ebenfalls Naturstoffe innerhalb der Klasse der Mitosehemmer / Spindelgifte sind die Taxane mit den Vertretern Docetaxel und Paclitaxel. Diese werden aus Eibenarten der Gattung *Taxus* gewonnen und stabilisieren Mikrotubuli, indem sie deren Depolymerisation verhindern. Die Zellen verbleiben daraufhin in der G2- und M-Phase des Zellzyklus (Figgitt und Wiseman, 2000), (Wiseman und Spencer, 1998).

2.2.1.4 Interkalanzien: Anthrazykline

Die Gruppe der Anthrazykline beschreibt im Gegensatz zur bisherigen Benennung nach Wirkmechanismen eine chemisch verwandte Gruppe von Substanzen, denen gemeinsam ist, dass sie in die DNA interkalieren. Aus diesem Grunde werden Substanzen dieser Wirkstoffgruppe auch als Interkalanzien bezeichnet. Interkalationen bewirken eine sterische Behinderung bei der DNA- und RNA-Replikation, -Transkription und -Reparatur. Anthrazykline werden aus bestimmten Streptomyceten-Arten gewonnen und wirken in der S-Phase des Zellzyklus. Beispiele für diese Gruppe von Chemotherapeutika sind Doxorubicin, Daunorubicin oder Epirubicin (Plosker und Faulds, 1993).

2.2.2 Tumorzellspezifische Therapeutika

Große Bemühungen werden von der Pharmaindustrie und von Biotechnologiefirmen unternommen, um neue Therapieformen gegen Krebs zu entwickeln. Diese Bestrebungen haben einige Produkte hervorgebracht, die heute bereits erfolgreich eingesetzt werden. Grundsätzlich unterscheiden sich diese neuartigen Substanzen von Chemotherapeutika, da sie gegen tumorzellspezifische Strukturen gerichtet sind,

während Chemotherapeutika auf alle sich teilenden Zellen wirken. Eine weit verbreitete Strategie ist hierbei der Einsatz therapeutischer Antikörper. Prominentestes Beispiel dieses Ansatzes ist Herceptin (Trastuzumab, Genentech). Dieser humanisierte, monoklonale Antikörper richtet sich gegen den Oberflächenrezeptor Her2/neu, der zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGFR) gehört (Coussens et al., 1985). Die Überexpression dieses Rezeptors sowie die Amplifikation des entsprechenden Gens ist beim Mammakarzinom einerseits mit einer schlechten Prognose korreliert, andererseits bietet sie einen Angriffspunkt für die Therapie mit Herceptin (Slamon et al., 1987), (Di Fiore et al., 1987). Erste klinische Studien ergaben, dass 11,6% der therapierten Patientinnen mit Her2/neu überexprimierenden Tumoren auf den Antikörper ansprachen (Baselga et al., 1996). Ergebnisse dieser Studie führten außerdem dazu, dass weitere Studien mit Herceptin in Kombination mit Chemotherapeutika durchgeführt wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die kombinatorische Administration von Cisplatin und Herceptin zu einem signifikant häufigeren Ansprechen führte, als jede der Therapien einzeln (Pegram und Slamon, 1999). Eine weitere Studie zeigte, dass Patientinnen, die zusätzlich zur Chemotherapie (Anthrazyklin/Cyclophosphamid oder Paclitaxel) mit dem Antikörper behandelt wurden, zu 50% auf die Therapie ansprachen, während nur 32% auf die alleinige Chemotherapie ansprachen (Slamon et al., 2001). Herceptin ist heute bei Patientinnen mit Her2/neu-überexprimierenden Tumoren für die Therapie des metastasierenden Mammakarzinomes zugelassen. Dieses Therapeutikum ist somit ein Beispiel, das aufzeigt, wie diagnostisch erhobene Faktoren einen Einfluss auf die Therapie nehmen können. Für ein solches Zusammenspiel wurde jüngst der Begriff „Theragnostika“ geprägt.

Eine weitere, wichtige Strategie neuartiger Therapeutika ist der Eingriff in die Signalleitung von Tumorzellen. Besonders Tyrosinkinase-Inhibitoren sind hier von Bedeutung. Wichtige Beispiele für diese Art von Therapeutika sind Glivec (Aventis) und Iressa (AstraZeneca). Glivec ist heute zur Therapie chronischer myeloischer Leukämie (CML) und stromaler Gastrointestinaltumoren (GIST) zugelassen. Diese Substanz inhibiert eine mutierte Form (Bcr-Abl) der Abl-Tyrosinkinase, welche bei 95% der Patienten mit CML und bei Patienten mit GIST zu finden ist und sich aus einer Translokation der Chromosomen 9 und 22 ergibt (Druker et al., 1996). Aus dieser Translokation resultiert das 1960 erstmals beschriebene Philadelphia-

Chromosom (Nowell und Hungerford, 1960). Iressa, ein Inhibitor einer EGFR-Tyrosinkinase, hat sich in der Therapie des nicht kleinzelligen Lungenkarzinomes (*non small cell lung cancer*, NSCLC) klinisch bewährt und ist in zahlreichen Ländern für die Therapie dieser Indikation zugelassen (Fukuoka et al., 2003). Zahlreiche weitere Antikörper und Inhibitoren der Signaltransduktion befinden sich in der klinischen Erprobung. Sogar der Wunsch nach einem Impfstoff gegen Krebs wird bereits klinisch untersucht. So soll eine Impfung mit VaccinOvar (ACA 125, CellControl), einem anti-idiotypischen Antikörper gegen das Tumorantigen CA 125, welches sich auf einem Großteil der Ovarialkarzinome findet, dazu führen, dass in Patienten eine aktive Immunantwort gegen den Tumor ausgelöst wird (Foon und Bhattacharya-Chatterjee, 2001). Sollte sich in klinischen Studien bestätigen, dass dieser Ansatz funktioniert, wäre sogar die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, Frauen präventiv gegen Eierstockkrebs zu vakzinieren. Die Zwischenauswertung einer klinischen Phase Ib/II Studie deutet darauf hin, dass das Tumorstoff ACA 125 eine spezifische Immunantwort auslöst und so eine Erhöhung der Überlebenszeit der behandelten Patientinnen bewirkt (Reinartz et al., 2004).

Die Entwicklung solcher spezifischer Therapeutika erfordert einen wesentlich größeren Aufwand im Vergleich zu herkömmlichen Therapeutika, was sich in deutlich höheren Therapiekosten niederschlägt. Auf der anderen Seite bietet die genannte Spezifität zumindest bei einigen dieser Therapeutika die Möglichkeit, die Patientengruppe vor der Therapie zu identifizieren, bei der eine Wirkung zu erwarten ist. Auf diese Weise lassen sich unwirksame Therapien vermeiden und dadurch Kosten sparen. Wie angedeutet, ist ein solcher Eignungstest für das Beispiel Herceptin heute bereits gegeben. Eine Her2/neu Überexpression bzw. eine Amplifikation des entsprechenden Gens gilt als Voraussetzung für die Zulassung zur Therapie mit dem Antikörper. Auf diese Weise lässt sich die Patientenpopulation einschränken, die für eine Therapie herangezogen wird. Da jedoch ein Großteil der Patientinnen trotz Überexpression bzw. Genamplifikation nicht auf die Therapie mit Herceptin anspricht, besteht Potenzial, einen verbesserten Eignungstest zu entwickeln.

2.3 Klassische Kriterien zur Therapiewahl

Für einige Tumorarten haben sich heute klare Behandlungsstandards durchgesetzt. In diesen Fällen haben Ergebnisse klinischer Studien belegt, dass diese Standards allen anderen untersuchten Regimes überlegen sind. In der Mehrzahl der Krebsindikationen ist eine solche Standardtherapie jedoch nicht verfügbar. In diesen Fällen werden betroffene Patienten mit Therapeutika nach der Wahl des Arztes behandelt, ohne dass deren individuelle Wirksamkeit prätherapeutisch geprüft ist. Ärzte stützen sich in diesen Fällen auf klinische Resultate und eigene Erfahrungen, wobei auch Erkenntnisse aus der Therapie anderer Tumorerkrankungen herangezogen werden.

Praktische Bestrebungen, Tumoren zu klassifizieren um Therapiegruppen zu definieren, führten zu einem international anerkannten und angewandten Einteilungssystem, der TNM-Klassifizierung. Mit Hilfe dieser Klassifizierung werden Tumoren nach den Kriterien Größe (T1-T4), Lymphknotenbefall (N1-N3) und Metastasierungsgrad (M0-M1) eingestuft. Zusätzlich erfolgt eine histologische Einteilung (*grading*, G1-G4), die nach Bösartigkeit des Tumors erfolgt. Bei manchen Krebsarten kommen für die Einteilung Tumormarker oder der Status gewisser Hormonrezeptoren hinzu. Therapeutische Maßnahmen werden heute in der Regel nach diesen Kriterien gewählt.

2.4 Chemosensitivitätstestung

Unterschiedlichste molekulare Ereignisse führen zum Phänotyp eines Tumors. Die Biologie der Tumorentstehung impliziert, dass sich Tumoren erheblich in ihren Eigenschaften unterscheiden können. Die klassischen TNM-Kriterien gehen daher nicht weit genug, um individuelle Unterschiede in ihrer ganzen Komplexität zu erfassen.

Eine Herangehensweise an die Problematik der Therapiewahl stellen funktionale Chemosensitivitätstests dar, die vor einer Chemotherapie erfolgen können. In diesen Tests werden lebende Tumorzellen *in vitro* mit in Frage kommenden Chemotherapeutika in Kontakt gebracht und deren Wirksamkeit gemessen. Für diese

Art von Messung stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die Parameter quantifizieren, die mit der Vitalität der Zellen korrelieren. Ziel solcher Tests ist sowohl die Vermeidung unwirksamer Therapien, als auch die sofortige Anwendung der wirksamsten Therapie. Erste Bestrebungen, mit Hilfe der Chemosensitivitätstestung individuelle Charakteristika des Tumors für die Therapiewahl zu nutzen, wurden bereits in den 70er Jahren beschrieben (Hamburger und Salmon, 1977).

Der Wert eines Chemosensitivitätstests setzt sich stets aus den Faktoren „Vorhersagekraft“ und „Durchführbarkeit“ zusammen. Die Vorhersagekraft beschreibt, zu welchem Anteil das *in vitro* vorhergesagte Ansprechen auch im Patienten zu beobachten ist. Die Anwendbarkeit fasst zusammen, welcher Anteil der durchgeführten Tests überhaupt zu einem Ergebnis führt. Nur wenn diese beiden Faktoren zusammenspielen, ist der entsprechende Test für Krebspatienten von großem Nutzen.

Beim sogenannten Stammzellassay (*Human Tumor Clonogenic Assay*, HTCA) wird die Fähigkeit von Zellen untersucht, Kolonien in Agar zu bilden. Wirksame Chemotherapeutika sollen hierauf Einfluss nehmen. (Salmon et al., 1978). Dieser Test ist maßgeblich durch die lange Dauer und eine niedrige Auswertbarkeitsrate beschränkt.

Testverfahren nach Volm bzw. Kern untersuchen den Einbau radioaktiv markierter Vorläufer des Nukleinsäurestoffwechsels, H^3 -Thymidin, welches durch Chemotherapeutika beeinflusst wird (Kaufmann, 1984), (Kern und Weisenthal, 1990). Diese Testverfahren sind heute kaum noch von Bedeutung.

Dem DISC-Test (*Differential Staining Cytotoxicity Assay*) liegt als Messgröße die Tatsache zugrunde, dass lebende Zellen bei intakter Zellmembran keinen Farbstoff aufnehmen (Weisenthal und Kern, 1991). Dieser Test ist sehr arbeitsintensiv und die Beurteilung der Färbung subjektiv, was die Anwendbarkeit einschränkt.

Der MTT (=3-(4,5di-methylthiazol-2-yl)-2,5-piphenyl-tetrazolium-bromid)-Test ist ein Proliferationstest, der heute von zahlreichen Anwendern genutzt wird. Bei diesem Test wird die Aktivität eines Enzyms gemessen, welches die Reduktion eines Tetrazoliumsalzes in ein colorimetrisch messbares Produkt katalysiert. Diese Umsetzung ist abhängig vom Metabolismus der Zellen (Scudiero et al., 1988), (Xu et al., 1999). Während es sich beim MTT-Test um einen weit verbreiteten Proliferationstest handelt, ist dieses Verfahren für die Chemosensitivitätstestung

aufgrund der großen einzusetzenden Zellzahl als auch durch die lange Dauer beschränkt.

Von großer Bedeutung für die Chemosensitivitätstestung an primären Tumorzellen ist der ATP-Test (*ATP cell viability assay*). In diesem Test wird mit Hilfe einer enzymatischen Reaktion, die durch das von aktiven Zellen produzierte ATP stattfinden kann, eine dabei entstehende Lumineszenz gemessen (Sevin et al., 1988). Auf diese Weise lässt sich eine Aussage über die Menge vorhandener ATP-Moleküle treffen, welche mit dem Metabolismus der Zellen korreliert.

Als einzige der vorgestellten Testmethoden gilt heute in Deutschland der ATP-Test als klinisch relevant. Dieser Test wird von Forschungsgruppen und einigen Klinikern eingesetzt, um Sensitivitätsbestimmungen durchzuführen. Einige Firmen bieten diesen Test auch kommerziell an. Klinische Daten bestätigen die Qualität dieses Verfahrens (Sevin et al., 1988), (Sevin et al., 1993). Die Akzeptanz gegenüber Chemosensitivitätstests gilt unter Klinikern dennoch als beschränkt, da für keines der genannten Testverfahren eine aussagekräftige, prospektive klinische Studie durchgeführt wurde, die klar belegen konnte, dass Patienten von einer prätherapeutischen Chemosensitivitätstestung profitieren.

2.5 Das Cytosensor Mikrophysiometer

Eine weitere Variable, die mit dem zellulären Metabolismus korreliert, ist die Ansäuerungsfähigkeit der Zellen (Owicki und Parce, 1992). Metabolisch aktive Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie ihr umgebendes Medium ansäuern. Dazu trägt vor allem die Glykolyse bei, in deren Rahmen Protonen aus der Zelle geschleust werden. Je höher der Metabolismus der Zellen, desto höher ist somit auch ihre Ansäuerungsrate. Die Ansäuerungsrate kann mit Hilfe eines Mikrophysiometers der Firma Molecular Devices, Cytosensor genannt, gemessen werden (Abbildung 3) (McConnell et al., 1992). Bei diesem Verfahren werden Zellen in eine Messkammer eingebracht und kontinuierlich mit Medium umströmt, welches vorher entgast wurde, um die Bildung von Luftblasen innerhalb der Kammer zu vermeiden. Sobald ein Gleichgewicht zwischen dem Zustrom frischen Mediums und dem Abstrom des durch die Zellen angesäuerten Mediums entstanden ist, bleibt der pH-Wert in der Kammer konstant. Alle zwei Minuten wird die Perfusion für 30 s unterbrochen. In dieser Phase

führt der Metabolismus der Zellen zu einer Ansäuerung in der Kammer, da kein Austausch des Mediums mehr erfolgt. Diese Ansäuerung wird mit Hilfe eines lichtabhängigen Siliziumchips gemessen, der in der Lage ist, pH-Wert-Änderungen von bis zu 1/100 Einheiten zu detektieren. Kontinuierlich wird so der pH-Wert in der Kammer gemessen und mit Hilfe eines Computers aufgezeichnet. Aus den gemessenen pH-Werten errechnet sich alle zwei Minuten ein Messpunkt, der die Ansäuerung pro Zeiteinheit darstellt und in der Einheit $-\mu\text{V}/\text{s}$ erfasst wird. Um die Vergleichbarkeit verschiedener Messkanäle sicherzustellen, werden vor der Auswertung alle Messkurven zu Beginn des auszuwertenden Zeitraumes auf 100% normiert (Abbildung 4).

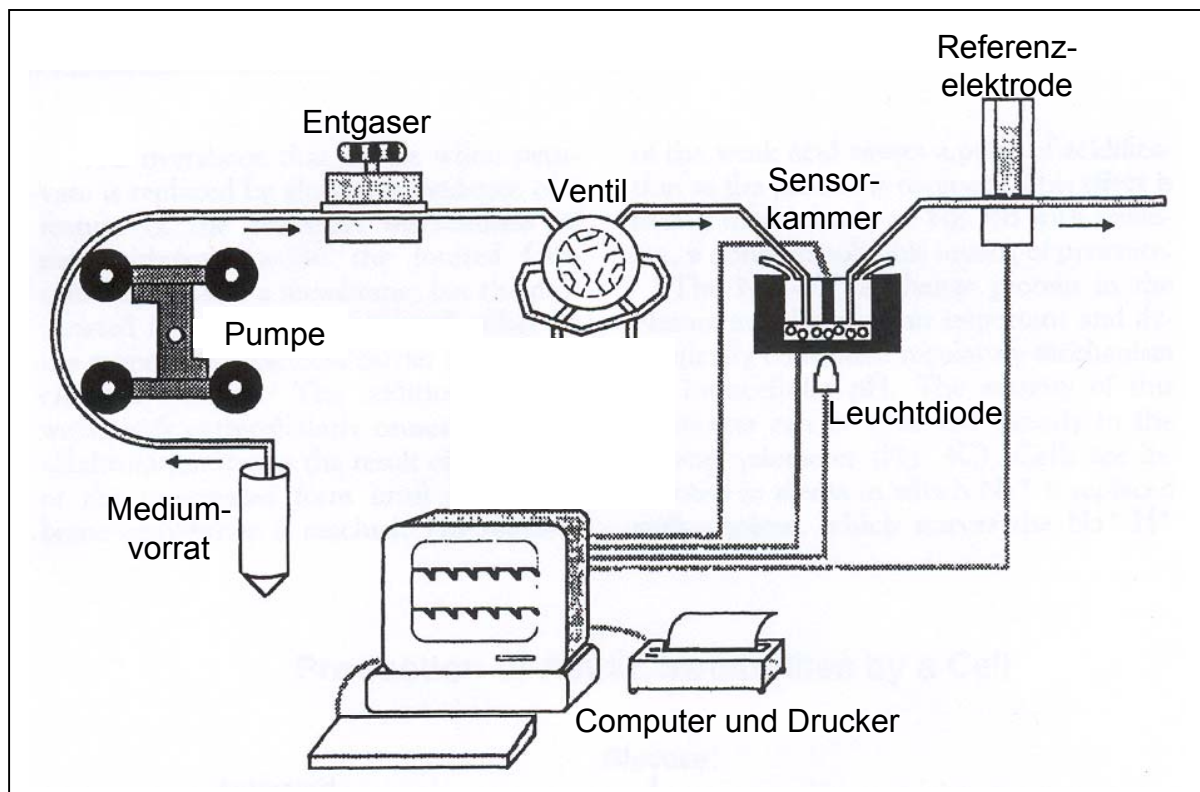


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Cytosensor Mikrophysiometers. (Aus: McConnell et al., 1992)

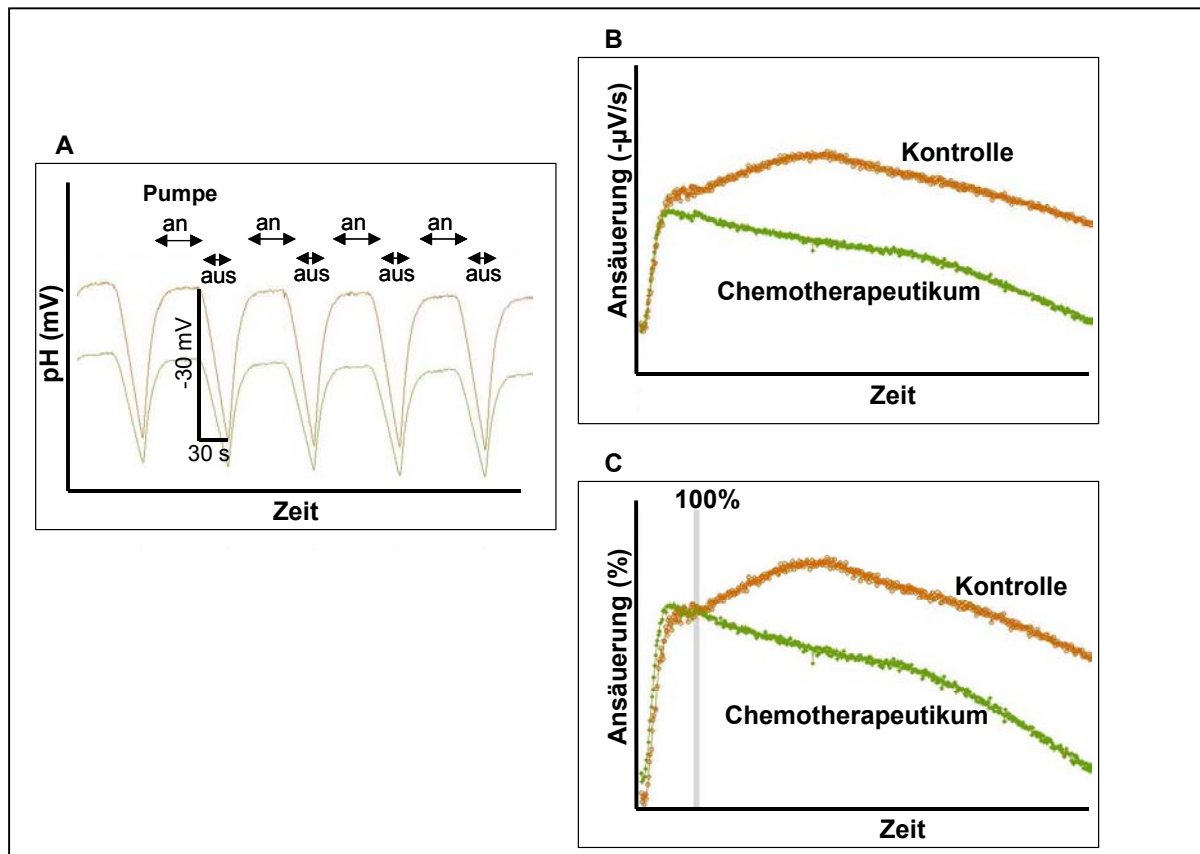


Abbildung 4: Darstellung der Datengenerierung im Cytosensor. A: Messung der Rohdaten in mV. B: Darstellung der Datenpunkte in $-\mu\text{V/s}$. C: Daten nach Normalisierung, beginnend bei 100%.

2.6 Der ChemoSelect[®]-Test

1995 begannen Wissenschaftler der Firma CellControl, einen Test zu entwickeln, der die Methode der Ansäuerungsfähigkeitsmessung mit Hilfe des Cytosensor Mikrophysiometers dazu verwendet, Chemosensitivitäten von Tumorzellen vorherzusagen. Es wurde ein Protokoll entwickelt, das u. a. auf generellen Produktbeschreibungen des Herstellers des Cytosensors sowie auf Beschreibungen des ATP-Chemosensitivitätstests basierte. Positive klinische Fallstudien berechtigten im Jahre 1998, den ChemoSelect[®]-Test kommerziell anzubieten.

Um die klinische Relevanz des Testverfahrens näher zu untersuchen, wurden weitere klinische Studien aufgesetzt. Unklarheit herrschte über die Möglichkeiten und Grenzen des Verfahrens. So wurde in klinischen Studien eine relativ geringe Auswertbarkeitsrate erreicht, da die Kriterien, die bezüglich der Anforderungen an das zu untersuchende Probenmaterial gestellt wurden, für den Test zu weit gefasst waren, wie sich später herausstellte. Die hohe Ausfallrate kam u. a. durch viele

Proben mit nicht für den Test ausreichender Zellzahl und solche mit zu niedrigen gemessenen Signalen zustande. Die Auswertung der klinischen Fallbeispiele wies jedoch mit einer Gesamtvorhersagekraft von 86% auf eine hohe Vorhersagekraft des Verfahrens hin (Thuro, 2001).

Wie in Kapitel 2.3 erwähnt, müssen für einen praktikablen Chemosensitivitätstest zwei Bedingungen erfüllt sein. Der Test muss eine gute Durchführbarkeit wie auch eine hohe Vorhersagekraft aufweisen. Der ChemoSelect[®]-Test ist anderen, vergleichbaren Tests bezüglich der Durchführbarkeit überlegen. Zwei Faktoren sind maßgeblich dafür verantwortlich. Zum einen werden für diesen Test bereits heute weniger Zellen benötigt, als für andere Chemosensitivitätstests, was zur Folge hat, dass der Test für eine größere Anzahl von Tumoren durchführbar ist. Außerdem ermöglicht die kürzere Messzeit des Tests die Untersuchung von Zellen, die nur kurz *in vitro* zu kultivieren sind und verringert das Risiko von kontaminationsbedingten Ausfällen. Die Vorhersagekraft des ChemoSelect[®]-Tests ist mit der anderer Tests vergleichbar, wie sich aus klinischen Fallbeispielen ergab. Im Gegensatz zu anderen Chemosensitivitätstests ist beim ChemoSelect[®]-Test besonders die Rate der richtigen Vorhersage von Sensitivitäten ermutigend. Die Wahrscheinlichkeit der richtigen Vorhersage von Resistenzen ist etwas niedriger als bei vergleichbaren Tests.

Im Jahre 2001 wurde in der Firma CellControl ein dreistufiges Entwicklungsprogramm aufgesetzt. Dieses Programm besteht aus 1) einem biologischen Grundlagenteil, 2) der Entwicklung einer optimierten Geräteplattform und 3) einer klinischen Validierung des Tests.

Die biologische Grundlagenforschung sollte Einblicke in die Problemfelder Durchführbarkeit und Vorhersagekraft ermöglichen und helfen, den Test zu optimieren.

Im Projekt der Maschinenentwicklung soll ein Messgerät entwickelt werden, welches das in der vorliegenden Arbeit verwendete Cytosensor Mikrophysiometer verbessern und ersetzen soll. Das verbesserte Gerät soll eine höhere Sensitivität aufweisen und helfen, Arbeitszeit und Kosten bei der Testdurchführung einzusparen. Ferner ebnet das biologische Forschungsprogramm den Weg für klinische Validierungsstudien, welche Mitte 2004 beginnen sollen.

3 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit stellt einen Teil des wissenschaftlichen Programms der Firma CellControl dar, und gliedert sich in zwei Hauptprojekte:

Im ersten Projekt sollten die Möglichkeiten und Grenzen des bestehenden ChemoSelect[®]-Tests untersucht werden. Angestrebte Optimierungen verfolgten das Ziel, sowohl die Durchführbarkeit als auch die Vorhersagekraft des Tests zu erhöhen.

Um die Durchführbarkeit des ChemoSelect[®]-Tests zu verbessern, sollten folgende Fragen geklärt werden:

Wie muss das Testmedium beschaffen sein, um die Messung zytostatischer Effekte auf Tumorzellen speziell im Cytosensor Mikrophysiometer zu ermöglichen?

In welchem Maße sind Messungen im ChemoSelect[®]-Test reproduzierbar?

Welche Zellzahl ist für die Durchführung des Test mindestens notwendig und in welchem Bereich darf sie schwanken, ohne das Messergebnis zu beeinflussen?

Folgende weitere Fragen sollten beantwortet werden, um die Vorhersagekraft des Tests zu untersuchen:

Wie korrelieren Ergebnisse des ChemoSelect[®]-Tests mit Ergebnissen von Proliferationstests?

Lassen sich im ChemoSelect[®]-Test spezifische Effekte von Chemotherapeutika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen darstellen?

Im zweiten Projekt sollte die Möglichkeit untersucht werden, ein Ansprechen auf moderne, tumorzellspezifische Therapeutika mit dem zugrunde liegenden ChemoSelect[®]-Test vorherzusagen. Als Beispiel für ein solches Therapeutikum sollte der monoklonale Antikörper Herceptin dienen, der gegen den Her2/neu Rezeptor gerichtet ist und in der Therapie des metastasierenden Mammakarzinoms eingesetzt wird.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Therapeutika

Substanz	Wirkmechanismus	Hersteller	C _{max} (µg/ml)
5FU	Antimetabolit	Sigma, Taufkirchen, Deutschland	22,5
Adriamycin	Alkylanz	Sigma, Taufkirchen, Deutschland	0,5
Cisplatin	DNA-Vernetzer	Sigma, Taufkirchen, Deutschland	3,8
Gemcitabin	Antimetabolit	Lilly, Bad Homburg, Deutschland	22,5
Oxaliplatin	DNA-Vernetzer	Sanofi Winthrop, Morrisville, USA	3,6
Paclitaxel	Mitosehemmer	Sigma, Taufkirchen, Deutschland	13,6
Topotecan	Topoisomerase-Inhibitor	Glaxo Smith Kline, Middlesex, UK	33,5
Vinorelbin	Mitosehemmer	Pierre Fabre, Freiburg, Deutschland	1,0

Tabelle 1: Übersicht über verwendete Chemotherapeutika und ihre maximale Serumkonzentration (C_{max}).

Wenn nicht anders angemerkt, wurden im ChemoSelect[®]-Test Chemotherapeutika in der maximal im Patienten beobachteten Serumkonzentration (c_{max}) eingesetzt. Der monoklonale Antikörper Herceptin (Trastuzumab) wurde von der Firma Roche, Basel, Schweiz bereitgestellt.

4.1.2 Zelllinien

Bezeichnung	Ursprung	Herkunft (Nummer)
BT-474	Brustdrüsenkarzinom des Milchganges	ATCC (HTB-20)
Capan-1	Pankreas Adenokarzinom, Metastase: Leber	Prof. Löhr, Mannheim
HCT-15	Kolorektal Adenokarzinom	ATCC (CCL-225)
HCT 116	Kolorektal Karzinom	ATCC (CCL-247)
HT-29	Kolorektal Adenokarzinom	ATCC (HTB-38)
MCF7	Brustdrüse, Adenokarzinom, Metastase: Pleuralerguss	DSMZ (ACC 115)
MDA-MB-453	Brustdrüsenkarzinom	DSMZ (ACC 65)
PaCa44	Pankreas Adenokarzinom	Prof. Löhr, Mannheim
Panc-1	Pankreas epithelioides Karzinom des Ganges	Prof. Löhr, Mannheim
SK-BR-3	Brustdrüse, Adenokarzinom, Metastase: Pleuralerguss	ATCC (HTB-30)
SK-OV-3	Eierstock Adenokarzinom, Metastase: Ascites	ATCC (HTB-77)
SW620	Kolorektal Adenokarzinom, Metastase: Lymphknoten	ATCC (CCL-227)

Tabelle 2: Übersicht über untersuchte Zelllinien und ihre Herkunft.

4.1.3 Puffer und Medien

BSS (*Balanced salt solution*, 138 mM NaCl, 10 mM Glukose, 5 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 0,77 mM Na₂HPO₄, x 2 H₂O, 0,23 mM NaH₂PO₄ x 2 H₂O)
DMEM/F12 Medium (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
Erythrozyten-Lysepuffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,01 mM EDTA)
HybriCare Medium (ATCC, Manassas, USA)
Leibowitz L15 Medium (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
McCoy's 5a Medium (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
RPMI 1640 (PAN, Aidenbach, Deutschland)
RUN-Medium (PAN, Aidenbach, Deutschland)
SeleX-Medium (Spezielle Anfertigung, BioConcept Allschwill, Schweiz)
PBS (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

4.1.4 Reagenzien

Agarose-Zelleinschlussmedium (Molecular Devices, Sunnyvale, USA)
Collagenase B (Roche, Basel, Schweiz)
D-(+) Glukose Lösung (45%) (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
DNAse I (Roche, Basel, Schweiz),
Dispase II (Roche, Basel, Schweiz)
Fötale Kälberserum (FCS)
- PAN, Chargen P221909, P220411 (PAN, Aidenbach, Deutschland)
- Invitrogen, Chargen 40Q6214K, 40Q5621K (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
Panexin (PAN, Aidenbach, Deutschland)
SeraPlus (PAN, Aidenbach, Deutschland)
Amphotericin B (Fungizone, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
Kanamycin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
L-Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin (PAA, Linz, Österreich)
Propidium Iodid (PI, Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
RNAse (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

Trypanblau (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)

Trypsin/EDTA (PAA, Linz, Österreich)

4.1.5 Verbrauchsmaterialien

Acht-Vertiefungsplatten (TPP, Trasadingen, Schweiz)

Einfrierröhrchen (Nalge Nunc, Rochester, USA)

Einwegartikel für den Cytosensor-Test, wenn nicht anders angegeben (Molecular Devices, Sunnyvale, USA)

Debubblor-Membranen für den Cytosensor-Test, spezielle Herstellung: Pall GmbH (Dreieich, Deutschland); Zuschnitt: Profiltack (Otterstadt, Deutschland)

Einfriercontainer (Nalge Nunc, Rochester, USA)

Mikrotiterplatten (TPP, Trasadingen, Schweiz)

Transwells für den Cytosensor Test (Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande)

Zellkulturflaschen T75 (Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande)

Zellsiebe, Nylon, 70 µm (BD Falcon, Heidelberg, Deutschland)

Zwölf-Vertiefungsplatten (TPP, Trasadingen, Schweiz)

4.1.6 Testkits

CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, USA)

Herceptest (DAKO Cytomation, Dänemark)

Mycoplasma Detection PCR ELISA (Roche, Basel, Schweiz)

4.1.7 Geräte

Cytosensor (Molecular Devices, Sunnyvale, USA)

ELISA Plattenleser und Software (Version V3.11) (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland).

FACS Scan Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

PCR Cycler Genius (Techne, Duxford Campridge, UK)

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Aufgrund des Mangels an NaHCO₃ in Leibowitz L15-Medium wurden für Zellen, die in diesem Medium kultiviert wurden, geschlossene Kulturflaschen verwendet, während alle anderen in Flaschen mit Filterdeckeln kultiviert wurden. Zum Ablösen der Zellen wurde Trypsin/EDTA-Lösung verwendet. Für Versuche mit Herceptin wurden die Zellen mit 1 mM EDTA-Lösung abgelöst, um eine eventuelle Beeinträchtigung des Her2/neu Rezeptors durch Enzyme zu vermeiden.

Für jede der verwendeten Zelllinien wurde eine Haupt-Zellbank (*Master-Cellbank*, *MCB*) mit je 30 Röhrchen angelegt. Diese diente als Langzeitresource für die Zellen. Aus einem Röhrchen dieser Zellbank wurde mit Ausnahme der Zelllinien PaC44 und Panc-1 wiederum eine Arbeits-Zellbank (*Working-Cellbank* (*WCB*)) mit je 30 Röhrchen angelegt. Zellen für Versuche wurden ausschließlich aus dieser Bank expandiert, um einen lange anhaltenden Vorrat an Zellen und die Vergleichbarkeit der erzielten Ergebnisse zu gewährleisten. Nach maximal 30maligem Passagieren der Zellen wurden diese verworfen und neue aus der *WCB* angezogen.

Bezeichnung	Kulturmedium	Passage <i>MCB</i>	Passage <i>WCB</i>
BT-474	HybriCare + 10% FCS	P 5	P 9
Capan-1	DMEM/F12 + 10% FCS	P 5	P 8
HCT-15	RPMI 1640 + 10% FCS	P 15	P 19
HCT 116	McCoy's 5a + 10% FCS	P 6	P 10
HT-29	McCoy's 5a + 10% FCS	P 7	P 10
MCF7	RPMI 1640+ 10% FCS	P 21	P 25
MDA-MB-453	Leibowitz L15 + 10% FCS (Zellkultivierung) RPMI 1640 + 10% FCS (CV-Test)	P 10	P 13
PaCa44	DMEM/F12 + 10% FCS + 2,5 µg/ml Amphotericin B + 100 µg/ml Gentamycin + 2 mM Glutamin	P 6	N/D
Panc-1	DMEM/F12 + 10% FCS + 2,5 µg/ml Amphotericin B + 100 µg/ml Gentamycin + 2 mM Glutamin	P 7	N/D
SK-BR-3	McCoy's 5a + 10% FCS	P 10	P 15
SK-OV-3	McCoy's 5a + 10% FCS	P 6	P 11
SW620	Leibowitz L15 + 10% FCS	P 4	P 6

Tabelle 3: Übersicht über Passagen der verwendeten Zelllinien in der Haupt- (*MCB*) und Arbeitszellbank (*WCB*).

4.2.2 Mykoplasmen-Detektion

Um mykoplasmatische Kontaminationen in der Zellkultur zu vermeiden, wurde monatlich ein Mykoplasmen-Ausschlusstest durchgeführt. Dazu wurde der von Roche erhältliche Mykoplasma-PCR-ELISA Kit verwendet und wie vom Hersteller empfohlen angewandt. Nach einer potentiellen Anreicherung von Mykoplasmen durch Zentrifugation des Zellkulturüberstands wurde in Anwesenheit von Digoxigenin-markiertem dUTP eine mykoplasmenspezifische DNA-Region amplifiziert. Nach Denaturierung der Amplifikate wurden diese mit einer Biotin-markierten Probe hybridisiert und auf Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatten immobilisiert. Die immobilisierte Probe wurde mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-Digoxigenin Antikörper inkubiert. Die Enzymaktivität wurde mit dem Peroxidasesubstrat 3,5,3',5' Tetramethylbenzidin (TNB) nachgewiesen. Infizierte Zellen wurden verworfen und entsprechende Versuche wiederholt.

4.2.3 Langzeitlagerung von Zelllinien

Zellkulturen in der logarithmischen Wachstumsphase wurden wie unter 4.2.1 beschrieben geerntet. Nach 5 Minuten Zentrifugieren bei 200 g wurden die Zellen in FCS mit 10% DMSO aufgenommen, in Einfrierröhrchen überführt und in Einfriercontainern langsam auf -80°C heruntergekühlt, bevor sie bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

4.2.4 Isolation von Tumorzellen aus Primärgewebe

Primäres Tumorgewebe wurde in speziellen Transportröhrchen über Nacht bei Raumtemperatur vom Ort der Entnahme in das Labor transportiert. Die Röhrchen enthielten Transportmedium, bestehend aus RPMI 1640 Medium mit 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin. Das Tumorgewebe wurde zunächst zweimal mit Transportmedium gewaschen. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde das Gewebe in ca. 2 ml Medium schwimmend mit zwei Skalpellenspitzen in Stücke von höchstens 1 mm^3 geschnitten und anschließend mit einem Enzymcocktail verdaut. Der Enzymcocktail bestand aus 1 ml einer DNase / Dispase-Lösung (720 U/ml DNase, 4,25 U/ml Dispase) und 500 μl Collagenase-Lösung (2,7 U/ml). Der enzymatische Verdau erfolgte bei 37°C und betrug maximal 2 h. Nach dem Verdau wurde die Zellsuspension durch Zellsiebe mit einer Porengröße von 70 μm filtriert, zweimal mit Medium gewaschen und 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert. Wenn im Sediment ein hoher Anteil an Erythrozyten sichtbar war, wurde anschließend eine Erythrozytenlyse vollzogen. Dabei wurden die Zellen in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer aufgenommen, vorsichtig mit 1 ml FCS unterschichtet und erneut 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert. Das Sediment wurde einmal mit 5 ml Medium gewaschen, dann resuspendiert und die lebenden Zellen nach Trypanblaufärbung gezählt.

4.2.5 MTS-Test

Der Tetrazoliumsalz-Test wurde wie vom Hersteller Promega beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden so in Flachboden-Mikrotiterplatten ausplattiert, dass sich ein Endvolumen von 200 µl pro Vertiefung ergab. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ in entsprechendem Medium. Anstelle des Leibowitz L15-Mediums, welches kein NaHCO₃ enthält, wurde RPMI 1640-Medium verwendet, um starke pH-Wert-Änderungen in der Atmosphäre des Brutschrankes zu vermeiden. Nach gewünschter Inkubationszeit wurden pro Vertiefung 20 µl MTS-Lösung zugegeben und die Platten für weitere 2-3 h im Brutschrank inkubiert. Die Absorption wurde bei 490 nm im ELISA Plattenleser gemessen.

4.2.6 Kristallviolett-Test

Für den Kristallviolett-Test (CV-Test) wurden die Zellen wie in Kapitel 4.2.5 beschrieben in Mikrotiterplatten ausplattiert. Der CV-Test wurde nach einem auf Beschreibungen von Kramer und Carver (1986) basierenden und daraus modifizierten Protokoll durchgeführt. Nach 16, 24 oder 72 h Kultivierung wurde das Medium abgenommen und mit 200 µl PBS pro Vertiefung gewaschen. Die Platten wurden vorsichtig ausgeklopft und anschließend mit 100 µl einer 0,5% Kristallviolett-Lösung in 25% MetOH pro Vertiefung gefärbt. Nach 5 Minuten Inkubation wurde die Färbelösung mit Leitungswasser ausgewaschen, die Platten getrocknet und die Zellen mit 100 µl 2% Na-Deoxycholat-Lösung pro Vertiefung lysiert. Nach vollständiger Lyse auf einem Mikrotiterplattenschüttler wurde die Absorption der Platten im ELISA Plattenleser bei 560-690 nm gemessen.

4.2.7 ChemoSelect[®]-Test

Die Mikrophysiometer Methode wurde von McConnell et al. (1992) und Wada et al. (1992) beschrieben. Der darauf aufbauende ChemoSelect[®]-Test basierte auf Beschreibungen von Metzger et al. (2001). Die Zellen wurden in entsprechendem

Medium ohne Serum in einem Verhältnis von zwei Teilen Zellsuspension und einem Teil geschmolzener, 37°C warmer Agarose-Zelleinschlussmedium aufgenommen. Diese Agarose-Zell-Suspension wurde in Transwell-Einsätze pipettiert und 8 Minuten bei 4°C inkubiert, um zu erstarren. Die Zellzahl pro Kammer reichte von 5.000 bzw. 250.000 Zellen für Zelllinien bzw. 10.000 bis 125.000 Zellen für Primärzellen. Die Einsätze wurden anschließend in Sensorkammern gegeben und mit entsprechendem Laufmedium umspült, welches 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 100 µg/ml Kanamycin und 2,5 µg/ml Amphotericin B enthielt. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug 45 µl/min. Um die Ansäuerungsrate der eingebrachten Zellen festzustellen, wurde die Perfusion während des gesamten Experiments alle 2 Minuten für jeweils 30 s gestoppt. Die Ansäuerung in der Kammer wurde in jeder dieser Phasen aufgezeichnet. Vor einer eventuellen Exposition mit Therapeutika adaptierten die Zellen für 1,5 h an das entsprechende Medium.

4.2.8 Auswertung der Daten des ChemoSelect®-Tests

Die Ansäuerungsrate der Zellen wurde in $-\mu\text{V/s}$ gemessen, wobei alle zwei Minuten ein Datenpunkt generiert wurde. Um die Vergleichbarkeit der absoluten Messwerte zu gewährleisten, wurden die Kurven zu Beginn der auszuwertenden Messperiode normalisiert. Dafür wurde der Durchschnitt der ersten fünf Messpunkte auf 100% gesetzt. Mit Ausnahme der Experimente mit NaCl-Lösung und einer Salzlösung (*Balanced salt solution*, BSS), in denen Einfachbestimmungen durchgeführt wurden, wurden für alle weiteren Versuche von vier durchgeführten Parallelmessungen mindestens zwei zur Auswertung verwendet. Messkanäle, die aufgrund technischer Probleme nicht zu verwerten waren, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Für die graphische Darstellung wurden jeweils 15 Messpunkte eines Messkanals gemittelt. Diese Mittelwerte von zwei bis vier Messkanälen wurden wiederum gemittelt und mit der zugehörigen Standardabweichung im Diagramm dargestellt. Ein Datenpunkt repräsentiert somit 30 Minuten der Messung von zwei bis vier Messkanälen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde in Grafiken von Messungen über 72 h nur jeder dritte Datenpunkt mit Standardabweichung dargestellt. Zur Berechnung relativer Effekte wurde jeweils der Endpunkt der Messkurve der mit

Therapeutikum behandelten Zellen durch den Endpunkt der Messkurve der unbehandelten Kontrollzellen geteilt.

4.2.9 Zellzyklusanalyse

Für die Zellzyklusanalysen wurden die Zellen in Agarose-Zelleinschlussmedium aufgenommen und in 8-Vertiefungsplatten pipettiert. Pro Vertiefung und Bedingung wurden 8 Tropfen mit je 50.000 Zellen verwendet. Nach 16 h Inkubation wurden die Zellen in 70% EtOH resuspendiert und für mindestens 2 h bei -20°C gehalten. Für die Analyse wurde EtOH entfernt und das Zellsediment in 100 μl PBS mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Propidium-Iodid und 5 $\mu\text{g/ml}$ RNase aufgenommen. Nach 30 Minuten Inkubation bei RT wurden die Proben im FACS Gerät gemessen.

4.2.10 Immunhistochemischer Nachweis des Her2/neu Rezeptors

Der Nachweis des Her2/neu Rezeptors erfolgte mit Hilfe des von der amerikanischen Zulassungsbehörde (*Federal Drug Association*, FDA) zugelassenen, immunhistochemischen HercepTests der Firma DAKO. Die Präparation erfolgte wie vom Hersteller empfohlen. Zellen wurden aus ca. 80-90% konfluenten Kulturflaschen gelöst und als Cytospin-Präparate in Paraffin eingebettet. Nach Entfernung des Paraffins und Rehydrierung erfolgte die Färbung mit einem primären Kaninchenantikörper gegen das Her2/neu Protein. Das Visualisierungsreagenz beruhte auf der Dextranpolymer-Technologie und bestand aus einem Ziegen-Anti-Kaninchen-Immunglobulin und aus Meerrettichperoxidase Molekülen, die mit einer gemeinsamen Dextran-Hauptkette verknüpft sind.

Färbemuster	Kategorie	Status
Keine Färbung oder weniger als 10% der Tumorzellen zeigen eine membranständige Färbung.	0	Negativ
Schwache oder kaum sichtbare Membranfärbung in mehr als 10% der Tumorzellen. Die Zellen zeigen eine nur unvollständige Membranfärbung.	1+	Negativ
Schwache bis moderate komplette Membranfärbung in mehr als 10% der Tumorzellen	2+	Schwach positiv
Starke, die komplette Membran umfassende Färbung in mehr als 10% aller Tumorzellen	3+	Stark positiv

Tabelle 4: Interpretation von Färbungen von Zellen mit Hilfe des HercepTests zur Klassifizierung des Her2/neu Rezeptorstatus (Angaben des Herstellers DAKO).

Die Auswertung erfolgte nach Kriterien des Herstellers in die Kategorien 0, 1+, 2+ und 3+ (Tabelle 4). Diese Kriterien sind unter 5.5.1 dargestellt. Zur Abstimmung des semiquantitativen Verfahrens waren dem Kit Kontrollobjektträger mit Zellen der Farbeintensitäten 0, 1+ und 3+ beigelegt.

5 Ergebnisse

5.1 Grundsätzliche Untersuchung des bestehenden Tests

Der ChemoSelect[®] Test ist ein Chemosensitivitätstest, im welchem die metabolische Aktivität von Tumorzellen in einem Mikrophysiometer (Cytosensor) gemessen und der Einfluss von Chemotherapeutika auf diese untersucht wird. Dazu werden die in den Test eingebrachten Zellen von einem Wachstumsmedium umströmt, welchem zu testende Chemotherapeutika zugefügt werden. Gemessen wird dabei die pH-Wert-Änderung, die in der Messkammer auftritt und durch die Stoffwechselaktivität der Zellen bedingt ist.

5.1.1 Medium

Eine wesentliche Einflussgröße bei Experimenten im Cytosensor ist das Medium, in welchem die Zellen mit zu testenden Chemotherapeutika in Kontakt gebracht und ihr Metabolismus gemessen wird. Grundsätzlich kann für Experimente im Cytosensor jede Art von Medium eingesetzt werden. Um jedoch kleinste pH-Wert-Änderungen darstellen zu können, empfiehlt es sich, ein Medium mit einer geringen Pufferkapazität zu verwenden. In der Literatur werden für Experimente im Cytosensor je nach Fragestellung hauptsächlich einfache Salzlösungen oder Zellkulturmedien verwendet. Zellkulturmedien werden dabei teilweise mit Serum versetzt. Die grundlegende Fragestellung war somit, wie das Medium beschaffen sein muss, um für einen Chemosensitivitätstest geeignet zu sein. Dabei muss sichergestellt sein, dass eingebrachte Zellen am Leben gehalten werden und dass sie auch weiterhin den Zellzyklus durchlaufen und sich teilen. Letzteres ist wichtig, da viele Chemotherapeutika nur auf sich teilende Zellen wirken.

Um zu untersuchen, wie sich die Zellen in einer Messung mit verschiedenen Medien verhalten und wie gut etwaige zytostatische Effekte in diesen Medien abzubilden sind, wurde ein Referenzexperiment durchgeführt, bei dem die Kolontumor-Zelllinie HCT 116 mit Oxaliplatin, einem zur Therapie des Kolonkarzinoms eingesetzten

Chemotherapeutikum, inkubiert wurde. Parallel dazu wurden die gleichen Zellen in entsprechenden Medien für eine Zellzyklusanalyse kultiviert, um anschließend eine Aussage über die Verteilung der Zellen im Zellzyklus treffen zu können. Untersucht wurde eine Salzlösung, BSS und RUN-Medium, eine abgewandelte Form von RPMI 1640 Medium jeweils mit und ohne FCS.

Die Ansäuerungsrate der Zellen, die im komplexen Zellkulturmedium im Cytosensor getestet wurden, blieb über die Zeit relativ konstant, während die der Zellen in BSS im gleichen Zeitraum rasch sank. In BSS konnte nicht zwischen den Messkurven von behandelten und unbehandelten Zellen unterschieden werden (Abb. 5 A). Im Kulturmedium hingegen deutete sich nur ein leichtes Abfallen der Ansäuerungsrate der mit Oxaliplatin versetzten Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Zellen an (Abb. 5 C). Die Zugabe von 10% FCS führte bei beiden Medien zu einer deutlich höheren Steigerung des Metabolismus über die Zeit als in Medien ohne FCS (Abb. 5 B, D). Während in BSS mit FCS nur ein kleiner zytostatischer Effekt beobachtet werden konnte, erwies sich RUN mit FCS als das Medium, in welchem der Effekt von Oxaliplatin am deutlichsten dargestellt werden konnte (Abb. 5 D). Die Zellzyklusanalyse ergab, dass bei Zellen, die in Salzlösung bzw. Medium ohne FCS gehalten wurden, ein etwa 1/3 höherer *G0/1-peak* zu erkennen war, als bei Zellen, die mit FCS kultiviert wurden (Abb. 5 B/D, 5 F/H). In beiden Fällen führte die Zugabe von FCS zu einer deutlichen Verschiebung des Verhältnisses der beiden *peaks* in Richtung *G2-peak*, führte also zu einer Erhöhung des Anteiles an Zellen in G2 (Abb. 5 D, H), also an sich teilenden Zellen. In Medien ohne FCS verblieben die Zellen größtenteils in G0/G1. Zellen, die in diesen Phasen des Zellzyklus ruhen, lassen eine Wirkung von Chemotherapeutika höchstens begrenzt zu und eignen sich daher nicht für die Darstellung von Chemosensitivitäten. RUN Medium mit FCS zeigte somit die größte Eignung, die Wirkung von Chemotherapeutika *in vitro* nachzuweisen. Bis auf weiteres wurde für Versuche im Cytosensor RUN Medium mit 10% FCS verwendet.

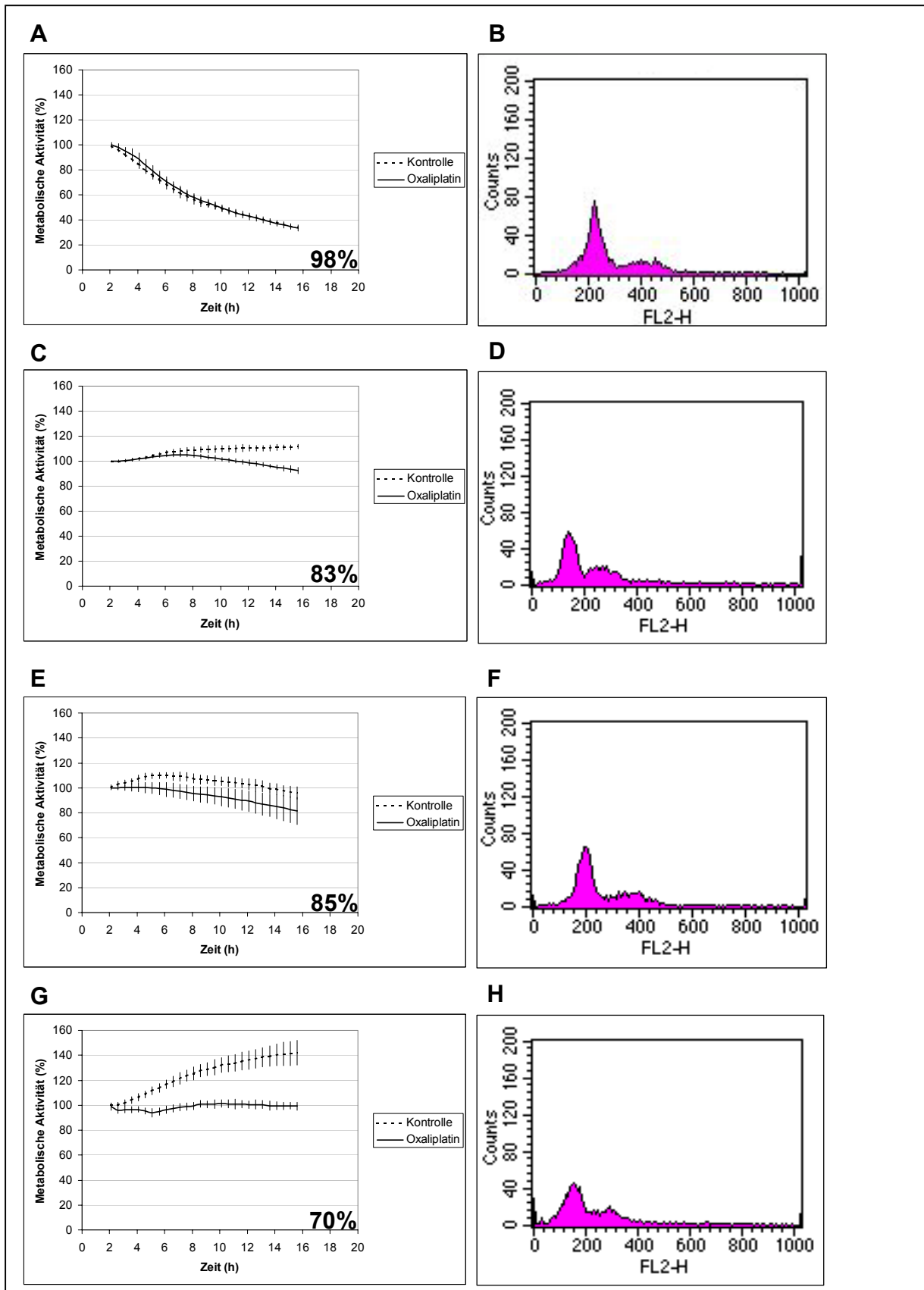


Abbildung 5: Vergleich des Verhaltens von SW620-Zellen in unterschiedlichen Medien. BSS (A, B), BSS + 10% FCS (C, D), RUN (E, F), RUN + 10% FCS (G, H). Messungen im ChemoSelect®-Test (A, C, E, G): Darstellung der metabolischen Aktivität behandelter und unbehandelter Zellen in Prozent ihrer Anfangsaktivität. Die hervorgehobene Prozentzahl gibt die Restaktivität nach 14 h Inkubation mit Oxaliplatin relativ zur Kontrolle wieder. Messung des DNA-Gehalts mit Hilfe eines FACS-Gerätes nach PI-Färbung zur Zellzyklusanalyse (B, D, F, H).

5.1.2 Reproduzierbarkeit

Um zu untersuchen, ob sich Ergebnisse von Chemosensitivitätsmessungen im Cytosensor reproduzieren lassen, wurde ein Referenzexperiment an drei verschiedenen Tagen (Tages-Variation) auf jeweils vier Geräten (Geräte-Variation) durchgeführt. Als Referenzexperiment wurden HCT 116 Zellen in RUN Medium mit 10% FCS mit Oxaliplatin in Kontakt gebracht. In diesem Experiment zeigte sich einerseits ein klarer Anstieg der Kontrollkurve und andererseits eine deutlich geringere Ansäuerungsrate der Zellen, die mit dem Chemotherapeutikum behandelt wurden (Abb. 5 G).

Wie in Tabelle 5 dargestellt, war der Effekt, den Oxaliplatin auf die metabolische Aktivität der Zellen verursachte, bei allen Versuchen mit einer Standardabweichung von 1-6% sehr gut vergleichbar. Es konnte gezeigt werden, dass die Variation der Ergebnisse zwischen an verschiedenen Tagen durchgeführten Versuchen (1-6%) und die Variation zwischen auf unterschiedlichen Geräten durchgeführten Versuchen (2-5%) in der gleichen Größenordnung lagen. Die Standardabweichung aller zwölf durchgeführten Experimente lag bei 3%.

Bei Experimenten, die an unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurden, zeigte sich, dass die Messkurven manchmal etwas unterschiedlich verliefen. Dieser Effekt ließ sich auf die Kultivierung der Zellen vor dem Experiment zurückführen. Insbesondere die Konfluenz in der für den Versuch verwendeten Kulturflasche erwies sich als entscheidend für die Messung. Bei Zellen, die aus wenig konfluenten Kulturflaschen stammten, stieg die Ansäuerungsrate geringer über die Zeit. Durch eine solch verringerte Proliferation der unbehandelten Kontrollzellen wird stets ein Teil des zytostatischen Effekts überdeckt. Durch eine hohe Konstanz in der Zellkultur, bei der die Zellzahl in der Flasche genau vorgegeben war, konnte die dargestellte, hohe Reproduzierbarkeit erreicht werden.

Gerät Nr.	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Mittelwert	Standard-abweichung
3	70%	72%	72%	71%	1%
4	70%	75%	72%	72%	3%
5	71%	78%	71%	73%	4%
8	67%	66%	76%	70%	6%
Mittelwert	70%	73%	73%		
Standard-abweichung	2%	5%	2%		
Mittelwert (alle)	72%				
Standard-Abweichung (alle)	3%				

Tabelle 5: Ergebnisse der wiederholten Messung der Chemosensitivität von HCT 116-Zellen gegenüber Oxaliplatin im ChemoSelect®-Test. Prozentzahlen geben die Restaktivität nach 14 h Inkubation mit Oxaliplatin relativ zur Kontrolle wieder.

5.1.3 Einfluss der Zellzahl

Ein wichtiger Faktor, der den Einsatz von Chemosensitivitätstests limitiert, ist die Zellzahl, die erforderlich ist, um eine Messung durchzuführen. Bei den meisten operativ entfernten Tumorproben, stärker noch bei Biopsiematerial, ist diese sehr begrenzt. Aus diesem Grunde sollte zunächst in einem Modellsystem untersucht werden, welchen Einfluss die verwendete Zellzahl auf die Messung nimmt und wo die kleinste mögliche Zahl liegt, die im Test einzusetzen ist.

Dabei wurden, ausgehend von standardmäßig eingesetzten 50.000 Zellen pro Kanal 5.000 bis 250.000 Zellen pro Kanal gemessen. Wie in Abbildung 6 für die Modellzelllinie HCT 116 dargestellt, konnte für Messungen mit einer Zellzahl von 10.000 bis 100.000 pro Kanal ein klarer Effekt von Oxaliplatin nachgewiesen werden. Unterhalb von 10.000 Zellen pro Kanal fiel die gemessene Ansäuerungsrate unter eine Grenze, ab welcher das Rauschen der gemessenen pH-Wert-Änderungen relativ zum gemessenen Signal zu hoch wurde, was eine mögliche Aussage begrenzte. Bei 250.000 Zellen verliefen die Messkurven gänzlich anders als bei allen anderen getesteten Zellzahlen. Hier sank die Ansäuerungsrate der Zellen über die Zeit und eine Inhibition durch Oxaliplatin war nicht mehr zu beobachten. Der Grund hierfür liegt vermutlich darin, dass in diesem Aufbau die Zellen so stark komprimiert in der Messkammer vorliegen, dass ein Austausch des Mediums während eines Messintervalls nicht mehr gewährleistet ist. Eine andere Erklärung wäre, dass die starke Ansäuerung in der Messkammer die darin befindlichen Zellen so stark

schädigt, dass der Metabolismus entsprechend sinkt, oder dass die Zellen durch gegenseitigen Kontakt inhibiert werden.

Für die Zelllinie HCT 116 wurde der Bereich von 10.000 bis 100.000 Zellen pro Messkanal als geeignet definiert. Für eine zweite getestete Zelllinie, SW620 verhielten sich die Ergebnisse ähnlich (Daten nicht dargestellt).

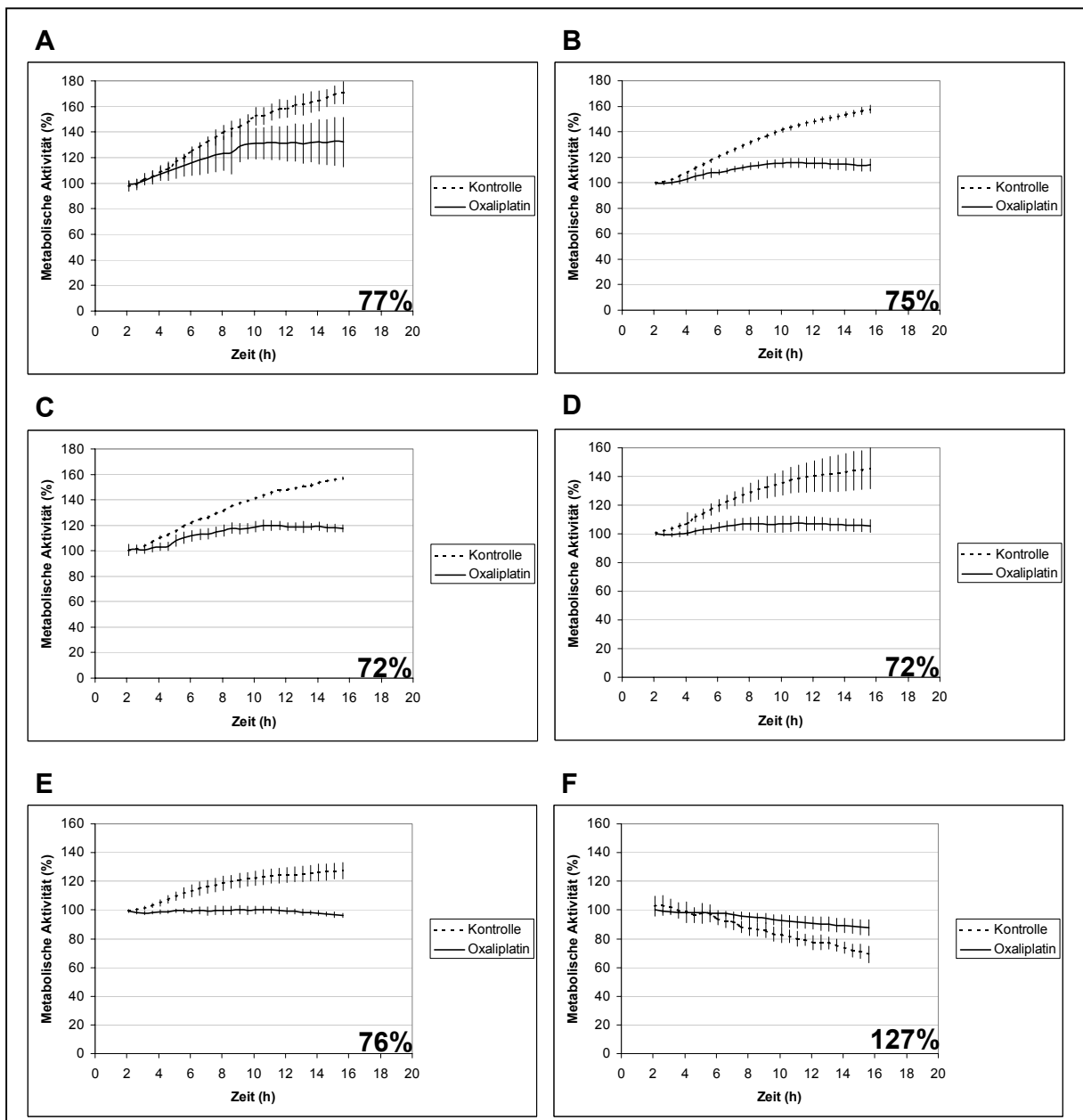


Abbildung 6: Einfluss der Zellzahl auf die Messung der Chemosensitivität von HCT 116-Zellen gegenüber Oxaliplatin im ChemoSelect®-Test: 5.000 (A), 10.000 (B), 25.000 (C), 50.000 (D), 100.000 (E), 250.000 (F). Darstellung der metabolischen Aktivität behandelter und unbehandelter Zellen in Prozent ihrer Anfangsaktivität. Die hervorgehobene Prozentzahl gibt die Restaktivität nach 14 h Inkubation mit Oxaliplatin relativ zur Kontrolle wieder.

5.1.4 Verlässlichkeit

Um den Cytosensor-Test *in vitro* zu validieren, wurde dieser mit zwei weiteren Proliferationstests, dem Kristallviolett (CV)-Test und dem MTS-Test verglichen. Der CV-Test misst mit Hilfe einer Proteinfärbung letztlich die Adhäsion von Zellen, die durch Apoptose und Nekrose negativ beeinflusst werden kann. Der MTS-Test ist eine Abwandlung des MTT-Tests und quantifiziert colorimetrisch die Umsetzung eines Tetrazoliumsalzes durch Hydrogenasen in ein farbiges Formazan-Produkt. Hier wird ein Farbumschlag gemessen, der durch Enzyme hervorgerufen wird, deren Aktivität mit der metabolischen Aktivität der Zellen korreliert.

Drei Chemotherapeutika (Cisplatin, Gemcitabin und Oxaliplatin) wurden für diese vergleichenden Analysen auf ihre Wirkung auf SW620-Zellen hin untersucht, wobei als Medium wiederum RUN + 10% FCS eingesetzt wurde. Da es für den CV-Test, wie auch für den MTS-Test üblich ist, Inkubationszeiten von mehreren Tagen zu verwenden, wurden Inkubationszeiten von 24 und 72 h ausgewertet. Wie in Abbildung 7 dargestellt, zeigten alle drei Substanzen eine mehr oder weniger starke Wirkung auf die Zellen. Die Wirkung war nach 72 h Inkubation stets deutlich stärker ausgeprägt als nach 24 h. Nach einem Tag war die beobachtete Wirkung im ChemoSelect[®]-Test am stärksten und deutlichsten. Dennoch zeigten auch die anderen Testmethoden eine Wirkung dieser Substanzen und die qualitative Aussage der Ergebnisse differierte in keinem Fall. Die Ergebnisse der drei untersuchten Methoden sind also durchaus vergleichbar.

Mit einer zweiten untersuchten Zelllinie, HCT 116, konnte die Vergleichbarkeit der Verfahren ebenfalls nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt).

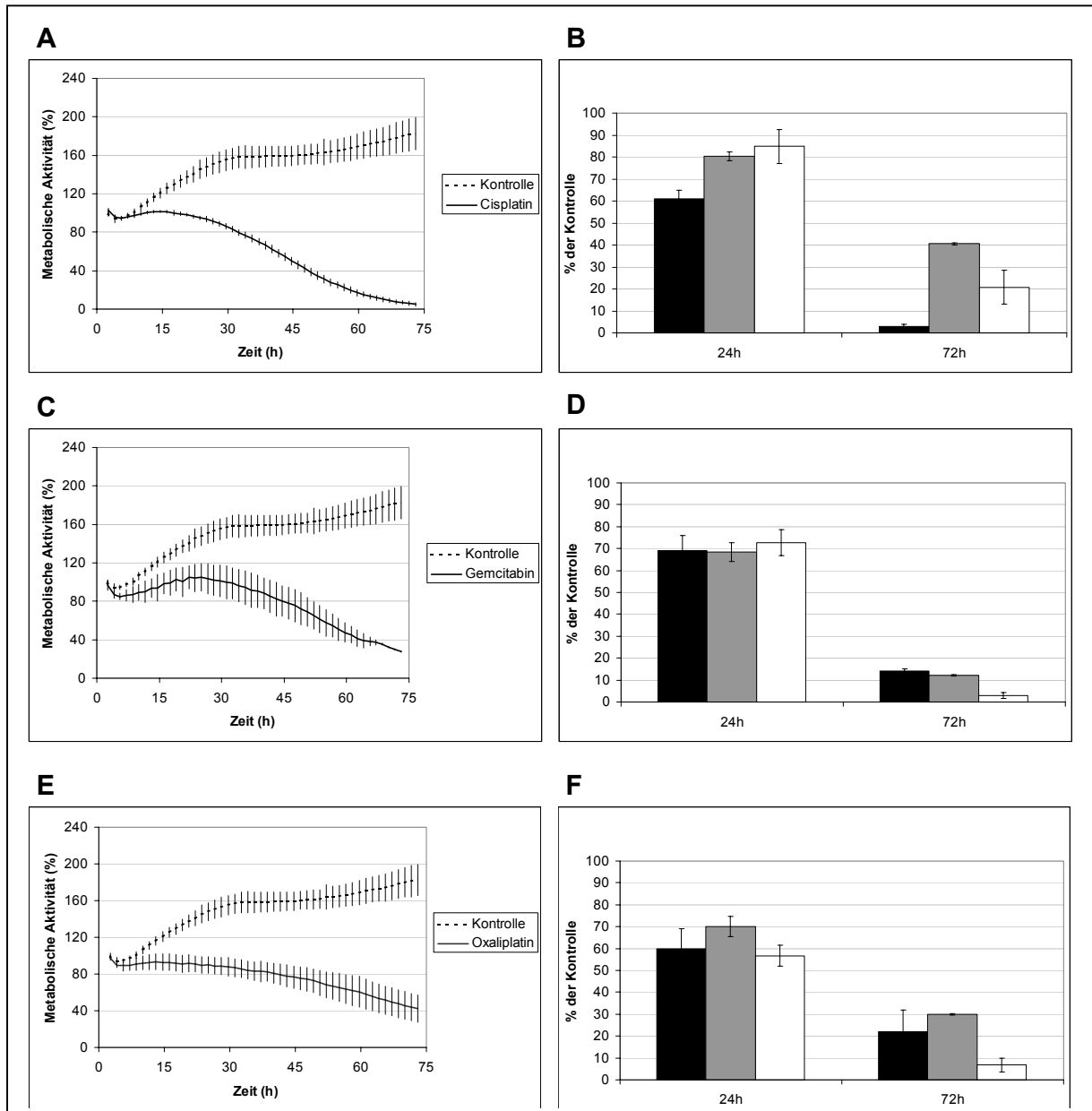


Abbildung 7: Vergleich unterschiedlicher Methoden zur Messung einer Chemosensitivität von SW620 Zellen gegenüber Cisplatin (A, B), Gemcitabin (C, D) und Oxaliplatin (E, F). Darstellung der metabolischen Aktivität behandelter und unbehandelter Zellen in Prozent ihrer Anfangsaktivität, gemessen im Cytosensor (A, C, E). Gegenüberstellung der Ergebnisse der drei Tests (B, D, F): Cytosensor ■ CV ■ MTS □

5.2 Optimierung des Mediums

5.2.1 Glukose

Wie in Abbildung 5 dargestellt, erwies sich von den vier getesteten Medien RUN Medium mit 10% FCS als optimal, was das Aufzeigen zytostatischer Effekte anging. Basierend auf diesen Erkenntnissen sollte die Rezeptur des Mediums für den Chemosensitivitätstest optimiert werden. Insbesondere sollte dabei der Gehalt an Glukose und Phosphat untersucht werden, da diese Faktoren einen maßgeblichen Einfluss auf die gemessene Ansäuerungsrate haben. Phosphat ist zum einen ein Puffer im Medium und birgt somit die potentielle Gefahr, die gemessene Ansäuerungsrate zu erniedrigen. Zum anderen ist Phosphat essentieller Bestandteil des Mediums und für das Überleben der Zellen notwendig. Glukose dient in diesem System als Hauptenergiequelle der Zellen, zumindest solange auf die Verwendung von FCS verzichtet wird. Um den Einfluss dieser Faktoren zu untersuchen, wurde zunächst die einfachste als geeignet erachtete Zusammensetzung, physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl), als Basis verwendet.

Es wurde gezeigt, dass Zellen, die in physiologischer NaCl-Lösung gehalten werden, sehr schnell an Aktivität verlieren. Die Zugabe von Glukose beschleunigt diesen raschen Abfall noch. Bei Glukosekonzentrationen ab 2 g/l war die Ansäuerungsrate innerhalb der Messdauer von 16 h auf null gefallen. Physiologische NaCl-Lösung erwies sich somit als nicht ausreichend für eine Messung im Cytosensor.

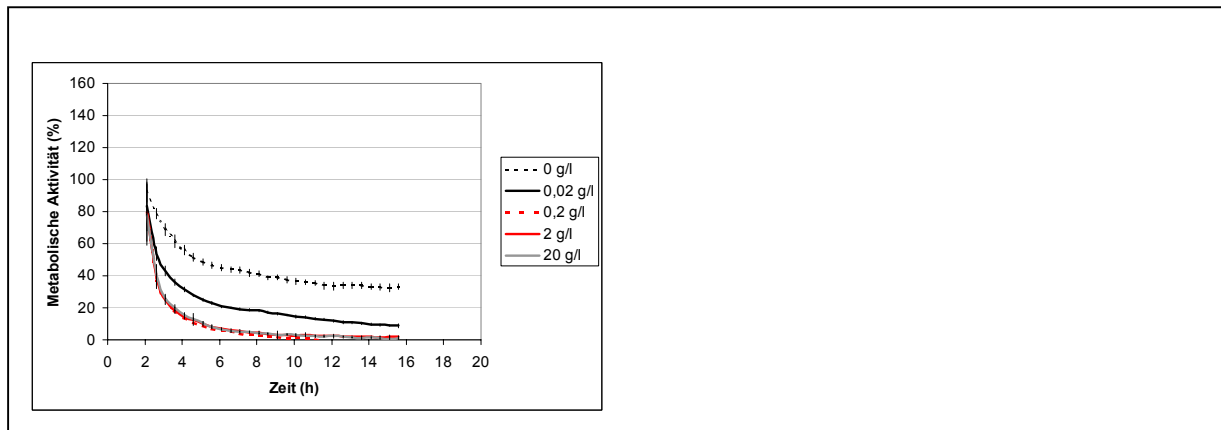


Abbildung 8: Messung von HCT 116 Zellen in 0,9% NaCl-Lösung mit unterschiedlichen Konzentrationen an Glukose im Cytosensor (Einfachmessungen). Darstellung der metabolischen Aktivität der eingebrachten Zellen in Prozent ihrer Anfangsaktivität.

Der Einfluss wichtiger Mediumkomponenten wurde daher in einer etwas komplexeren Salzlösung, BSS, untersucht. Dazu wurde das Rezept der BSS abgewandelt und der Phosphatpuffer zunächst weggelassen, um alleine den Effekt der Glukose untersuchen zu können. Bevor die Zellen mit Glukose in Kontakt gebracht wurden, waren sie einheitlich in BSS ohne Glukose und wiesen niedrige Ansäuerungsraten auf. Um den Einfluss von Glukose zu untersuchen, wurden die Zellen in Folge gleichzeitig mit Glukose in unterschiedlichen Konzentrationen konfrontiert. Die Ansäuerungsraten schnellten daraufhin in Abhängigkeit der Glukosekonzentration in die Höhe (Abbildung 9 B). Bei 50 g/l wurde dabei das Maximum erreicht. Betrachtet man zusätzlich zu den kurzfristig erzielten anfänglichen Aktivitäten auch den Verlauf über die Zeit, so fällt auf, dass dieser in einem Bereich von 2 bis 10 g/l Glukose am wenigsten abfiel. Höhere Konzentrationen bewirken zwar kurzzeitig eine höhere Steigerung, doch hielt diese nicht lange an. Dies lässt sich vermutlich auf eine starke Änderung der Osmolarität der Lösung zurückführen, die mit der Erhöhung der Glukosekonzentration einhergeht. Glukosekonzentrationen zwischen 2 und 10 g/l bewirkten hohe Aktivitäten bei geringstem Abfallen der Ansäuerungsrate über die Zeit und wurden daher als geeignet definiert.

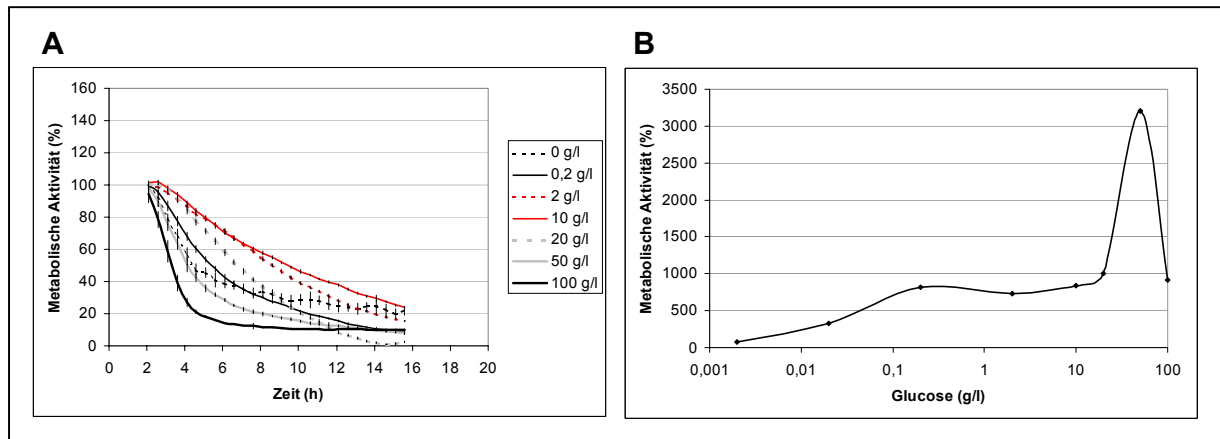


Abbildung 9: Messung von HCT 116 Zellen in BSS-Lösung ohne Phosphat mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (Einfachmessungen). Zuschaltung auf glukosehaltiges Medium nach 2 h. Verlauf der metabolischen Aktivitäten im Cytosensor. Darstellung der metabolischen Aktivität der eingebrachten Zellen in Prozent ihrer Anfangsaktivität (A). Darstellung der Aktivitäten direkt nach dem Übergang von 0g/l Glukose auf die dargestellte Konzentration (B).

5.2.2 Phosphat

Wie eingangs erwähnt, kommt Phosphat im Testsystem eine doppelte Rolle zu. Zum einen ist es als essentieller Bestandteil eines Wachstumsmediums für das Überleben von Zellen notwendig. Zum anderen ist es für Untersuchungen im Cytosensor generell von Bedeutung, da die Konzentration dieses Puffers einen maßgeblichen Einfluss auf die gemessene Ansäuerungsrate der Zellen in der Messkammer hat und mit dieser negativ korreliert. Um den Einfluss der Phosphatkonzentration auf Messungen im Cytosensor zu untersuchen, wurde BSS ohne Glukose und Phosphat verwendet. Nach Adaptation an das Medium wurde auf Medium mit unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen und einheitlich 2 g/l Glukose umgeschaltet. Abbildung 10 B stellt die Aktivierung der Zellen durch Glukose in das Verhältnis zur entsprechenden Rate vor dem Umschalten. Die Zugabe von Glukose bewirkte, dass die Ansäuerungsrate rapide anstieg, wobei der relative Anstieg höher war, je niedriger die Phosphatkonzentration war. Der Verlauf der Ansäuerungsrate über die Zeit zeigte, dass eine gewisse Mindestkonzentration notwendig war, um ein rasches Absinken der metabolischen Rate über die Zeit zu verhindern (Abb. 10 A). Während die Ansäuerungsrate über die Zeit also mit zunehmender Phosphatkonzentration eher aufrechterhalten wird, sinkt mit zunehmender Phosphatkonzentration die Anfangsaktivität. Bei 0,1 mM Phosphat war zum einen eine hohe Ansäuerungsrate der Messung gegeben, zum anderen sank die Rate nicht

so stark ab wie bei geringeren Konzentrationen. Diese Konzentration erwies sich somit als sinnvoller Kompromiss zwischen physiologischen Voraussetzungen und gemessenem Signal und wurde daher als optimal definiert.

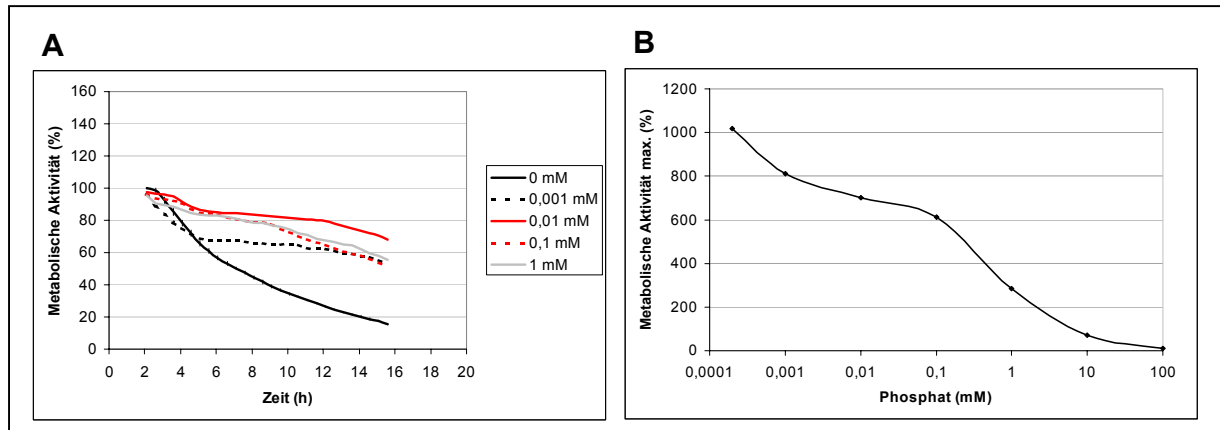


Abbildung 10: Untersuchung von HCT 116 Zellen im Cytosensor mit BSS-Lösung mit unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen (Einfachmessungen). Zuschaltung auf glukosehaltiges Medium nach 2 h. Darstellung der metabolischen Aktivität der eingebrachten Zellen in Prozent ihrer Anfangsaktivität (A). Darstellung der Aktivitäten direkt nach dem Übergang auf glucosehaltiges Medium mit unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen relativ zum Wert vor dem Übergang (B).

5.2.3 Serum

5.2.3.1 Konzentration

Zur Unterstützung des Wachstums humaner Zellen in Kultur wird in der Regel fötales Kälberserum (*Fetal Calf Serum*, FCS) in Konzentrationen zwischen 5 und 20% eingesetzt. Um zu untersuchen, welche Konzentration für Experimente im Cytosensor optimal ist, wurde das Referenzexperiment (HCT 116 Zellen mit Oxaliplatin) mit RUN Medium und FCS Konzentrationen von 1, 5, 10 und 20% durchgeführt und mit einem Experiment ohne FCS verglichen.

Zu den in Abbildung 11 dargestellten Versuchen ist anzumerken, dass sie durchgeführt wurden, bevor die für die Reproduzierbarkeit wichtigen Faktoren eruiert worden waren. Die verwendeten Zellen wurden vor dem Experiment nicht in Bedingungen kultiviert, die nach neueren Erkenntnissen als optimal definiert würden. Dennoch konnten in diesen Versuchen Erkenntnisse gewonnen werden, die sich in später durchgeführten Experimenten mit optimal kultivierten Zellen bestätigten.

Ohne Zugabe von Serum wiesen die Messkurven einen Abfall über die Zeit auf und ein Effekt von Oxaliplatin ließ sich kaum nachweisen (Abb. 11 A). Die Zugabe von 1% FCS verringerte auf der einen Seite den anfänglichen Anstieg der Ansäuerungsrate, führte jedoch nach einer gewissen Zeit zu einem Abfall, wobei sich beide Messkurven geringfügig unterschieden (Abb. 11 B). Bei 5% FCS verliefen beide Kurven etwa konstant bei 100% (Abb. 11 C) und erst die Zugabe von 10% FCS führte zu einem Anstieg der Ansäuerungsrate der metabolischen Aktivität der Kontrollzellen. Unter diesen Bedingungen wurde ein klarer Effekt von Oxaliplatin beobachtet (Abb. 11 D). Eine weitere Erhöhung der FCS Konzentration auf 20% vermochte den Anstieg der Kurve über die Zeit noch etwas zu erhöhen und den gemessenen Effekt von Oxaliplatin zu vergrößern (Abb. 11 E).

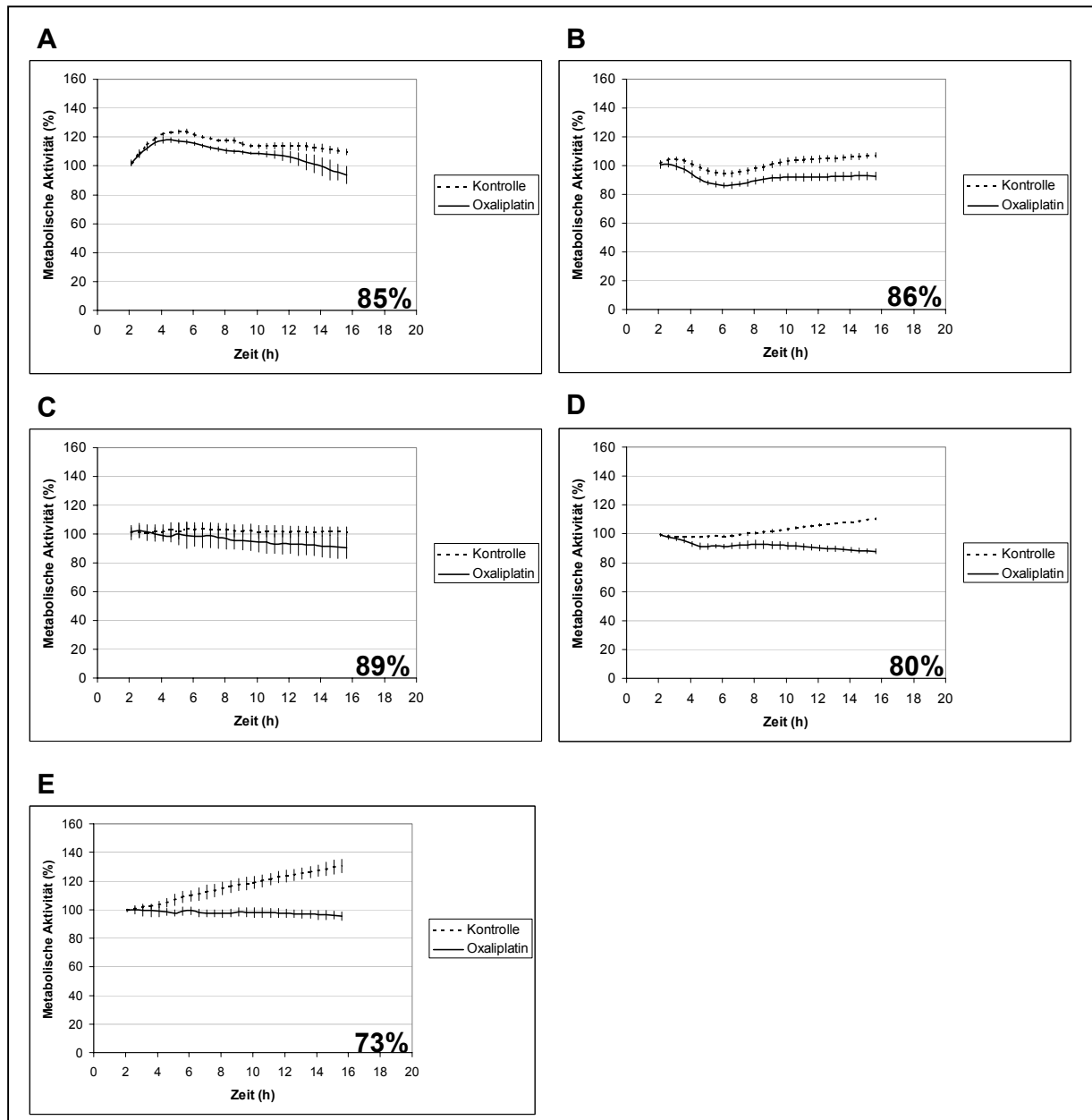


Abbildung 11: Messung der Chemosensitivität von HCT 116-Zellen gegenüber Oxaliplatin im ChemoSelect®-Test bei unterschiedlichen Konzentrationen von FCS: 0% (A), 1% (B), 5% (C), 10% (D), 20% (E). Darstellung der metabolischen Aktivität behandelter und unbehandelter Zellen in Prozent ihrer Anfangsaktivität. Die hervorgehobene Prozentzahl gibt die Restaktivität nach 14 h Inkubation mit Oxaliplatin relativ zur Kontrolle wieder.

Besonders bei Betrachtung des mit 10% FCS durchgeführten Experiments wurde im Nachhinein klar, dass die Kulturf flasche der verwendeten Zellen nicht ausreichend konfluent war (Abb. 11 D, 11 D). Um die Ergebnisse nach aktuellen Erkenntnissen zu reproduzieren, wurde das Referenzexperiment später erneut mit FCS-Konzentrationen von 0, 0,5, 5 und 10% und mit optimal kultivierten Zellen wiederholt (Abb. 12). In diesen Versuchen ließen sich die charakteristischen Kurvenprofile reproduzieren. Im Gegensatz zu den vorher durchgeführten Versuchen mit suboptimal kultivierten Zellen wiesen diese Versuche jedoch bei 10% FCS einen

deutlichen Anstieg der metabolischen Aktivität über die Zeit auf. Die Bedeutung dieses Anstiegs für eine Messung zytostatischer Effekte wurde im Kapitel 5.1.2 abgehandelt.

Diese Versuche führten zusammen mit der Prämisse, den FCS Verbrauch aus Kostengründen möglichst niedrig zu halten, dazu, dass eine FCS Konzentration von 10% als notwendig und ausreichend definiert wurde.

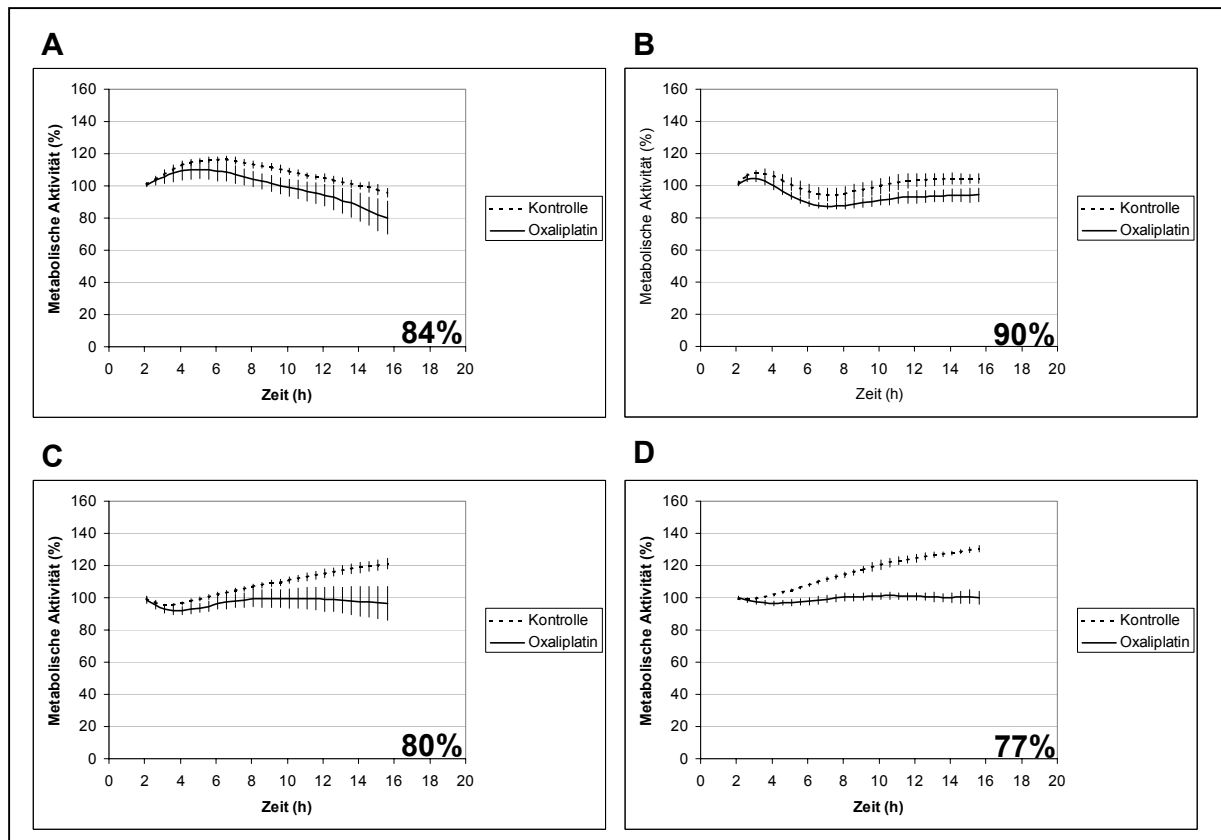


Abbildung 12: Messung der Chemosensitivität von HCT 116-Zellen gegenüber Oxaliplatin im ChemoSelect[®]-Test bei unterschiedlichen Konzentrationen von FCS: 0% (A), 0,5% (B), 5% (C), 10% (D). Darstellung der metabolischen Aktivität behandelter und unbehandelter Zellen in Prozent ihrer Anfangsaktivität. Die hervorgehobene Prozentzahl gibt die Restaktivität nach 14 h Inkubation mit Oxaliplatin relativ zur Kontrolle wieder.

5.2.3.2 Ersatzstoffe

Wie sich bereits in Kapitel 5.1.1 zeigte, konnten reine Nährmedien Zellen im Cytosensor nicht langfristig zu einem Wachstum bewegen. Durch die Zugabe von FCS wurde gewährleistet, dass die Zellen den Zellzyklus durchlaufen, was eine Voraussetzung dafür ist, Effekte vieler Chemotherapeutika nachweisen zu können. Die Verwendung eines so heterogenen Stoffes wie FCS als Bestandteil eines

Mediums in einem zu normierenden Test hat stets den Nachteil, dass dadurch Variationen in Kauf genommen werden müssen, sobald die verwendete Charge gewechselt wird. Ein Weg, diese Variationen zu verringern, ist die Verwendung von Serumersatzstoffen. Es sollte untersucht werden, ob Serumersatzstoffe in der Lage sind, anstelle von Serum entsprechende Wachstumseffekte zu bewirken, um Effekte von Chemotherapeutika zuzulassen. Zwei solche Ersatzstoffe wurden in einer Konzentration von 10% in RUN Medium miteinander und mit FCS verglichen. Panexin ist ein Serumersatzstoff, der sich aus definierten Komponenten zusammensetzt. SeraPlus ist Serum, das chromatographisch in unterschiedliche Fraktionen aufgetrennt und anschließend in definierten Anteilen wieder zusammengeführt wurde. Beide Ersatzstoffe sollen laut Hersteller vergleichbare Effekte wie FCS verursachen und Variationen zwischen unterschiedlichen Chargen im Vergleich zu FCS minimieren.

Als Referenzexperiment wurden HCT 116 Zellen mit Oxaliplatin inkubiert. Wie in Abbildung 13 C dargestellt, stieg die Kontrollkurve der in Medium mit SeraPlus gehaltenen Zellen deutlich weniger, als die der Zellen mit Medium mit FCS. Der gemessene Effekt von Oxaliplatin war hier entsprechend kleiner. Panexin bewirkte eine anfängliche starke Aktivierung der Zellen (Abb. 13 B). Ein geringfügiger Effekt von Oxaliplatin konnte zum Ende der Messung hin zwar beobachtet werden, doch unterschieden sich die Messkurven nicht signifikant. Keiner der getesteten Serumersatzstoffe erwies sich somit als gleichwertig zu FCS. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde beschlossen, dass FCS in diesem Testsystem nicht durch Ersatzstoffe substituiert werden kann. Um jedoch Chargenvariationen zu minimieren, wurde ein Vorgehen erarbeitet, mit welchem beim Wechsel der verwendeten FCS Charge eine möglichst ähnliche Nachfolgecharge ausgewählt werden kann.

Untersuchungen des Effektes unterschiedlicher Konzentrationen dieser Serumersatzstoffe auf Zelllinie SW620 bestätigten, dass das Wachstumsverhalten der Zellen unter diesen Bedingungen dem mit FCS nicht gleichwertig war.

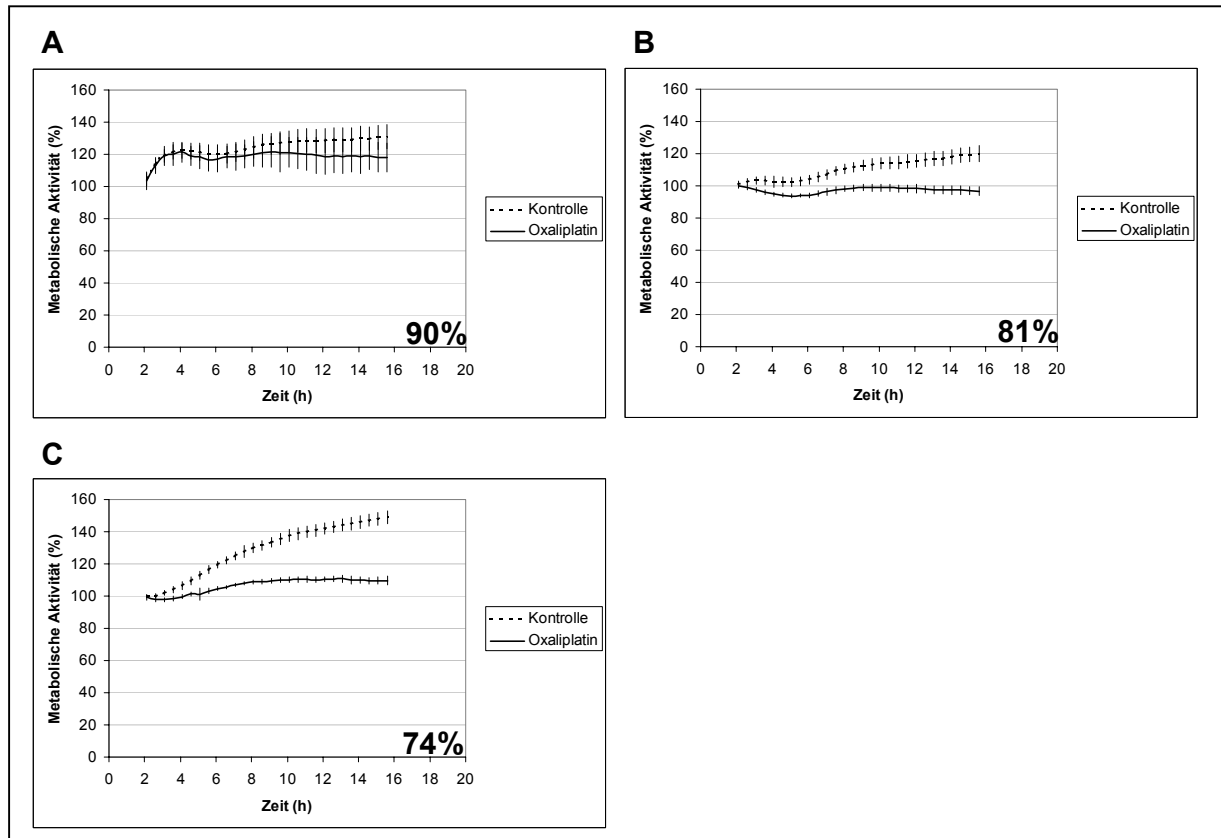


Abbildung 13: Messung der Chemosensitivität von HCT 116-Zellen gegenüber Oxaliplatin im ChemoSelect®-Test in Medien mit 10% Serum bzw. Serumersatzstoff: Panexin (A), SeraPlus (B), FCS (C). Darstellung der metabolischen Aktivität behandelter und unbehandelter Zellen in Prozent ihrer Anfangsaktivität. Die hervorgehobene Prozentzahl gibt die Restaktivität nach 14 h Inkubation mit Oxaliplatin relativ zur Kontrolle wieder.

5.2.3.3 FCS Chargentest

Da keiner der untersuchten Serumersatzstoffe FCS gleichwertig ersetzen konnte, wurde ein Verfahren entwickelt, mit dessen Hilfe bei einem Wechsel der FCS Charge sichergestellt werden kann, dass sich die gewählte Nachfolgecharge möglichst ähnlich verhält wie die ursprüngliche. FCS wird in der Regel in einer Größenordnung von 500 bis 2000 l pro Charge produziert. Um einen Wechsel der Charge möglichst selten vornehmen zu müssen, sollte also nach Möglichkeit eine komplette Charge reserviert und sukzessive abgenommen werden. Ziel war es, für alle weiteren Versuche dieser Arbeit eine einheitliche FCS-Charge zu verwenden, um Variationen gering zu halten.

Das erarbeitete Vergleichsverfahren umfasste zum einen Untersuchungen im CV-Test, bei welchen zehn Zelllinien mit acht Chemotherapeutika auf deren Wirkung hin untersucht wurden und die Ergebnisse mit denen der ursprünglichen Charge

verglichen und bewertet wurden. In einem zweiten Schritt wurde in einem Referenzexperiment (HCT 116 Zellen, Oxaliplatin) im Cytosensor die ähnlichste Charge mit der ursprünglichen verglichen. Der Vergleich der Chargen erfolgte semiquantitativ. Für die Bewertung der Ähnlichkeit im CV-Test wurden für jede untersuchte Bedingung maximal zwei Punkte vergeben. Diese wurden erreicht, wenn das Ansprechen (Wirkung, keine Wirkung) sehr vergleichbar war. Ein Punkt wurde vergeben, wenn die Ergebnisse nicht stark voneinander abwichen und kein Punkt repräsentierte ein deutliches Abweichen.

Es zeigte sich, dass von drei getesteten potentiellen Nachfolgechargen eine den anderen deutlich überlegen war, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse anging (Tabelle 6).

Charge	PAN P221909	PAN P220411	Gibco 40Q5621K
Bewertungen	100	100	100
Gesamtpunktzahl (max. 200)	143	114	121

Tabelle 6: Auswertung der Ergebnisse der FCS-Chargentestung zur Untersuchung der Ähnlichkeit verschiedener Chargen. Im CV-Test wurden 10 Zelllinien mit 10 Chemotherapeutika bzw. Lösungsmitteln inkubiert. Das Chemosensitivitätsprofil der Ursprungscharge wurde als Standard definiert und mit dem der anderen Chargen verglichen. Die Bewertung erfolgte semiquantitativ. Dazu wurden für 100 untersuchte Bedingungen jeweils maximal 2 Punkte vergeben. Diese wurden erzielt, wenn sich das Verhalten der Zellen gegenüber einer Substanz in Medium mit FCS unterschiedlicher Chargen sehr ähnlich war. 1 Punkt wurde vergeben, wenn die Ergebnisse nicht stark voneinander abwichen. Bei deutlichen Unterschieden wurde kein Punkt erreicht. Untersucht wurden die Zelllinien Capan-1, HCT-15, HCT 116, HT-29, MCF7, PaCa44, Panc-1, SK-BR-3, SK-OV-3, SW620. Die Chemotherapeutika 5FU, Adriamycin, Cisplatin, Gemcitabin, Paclitaxel, Topotecan und Vinorelbin wurden getestet.

Die Charge P221909 der Firma PAN wurde daraufhin im Cytosensor für ein Referenzexperiment mit HCT 116-Zellen und Oxaliplatin parallel zur Ursprungscharge 40Q6214K der Firma Gibco eingesetzt und die Effekte verglichen. In diesem Versuch zeigte sich, dass sich die Chargen zwar geringfügig unterschieden, was das Proliferationsverhalten der Zellen anging, doch waren diese Effekte sowohl bei der Kontrollkurve, als auch bei der Chemotherapeutikakurve zu beobachten und der gemessene relative inhibierende Effekt war somit in beiden Fällen nahezu identisch. Die Proliferation der Zellen in der Nachfolgecharge war etwas höher als bei der Ursprungscharge.

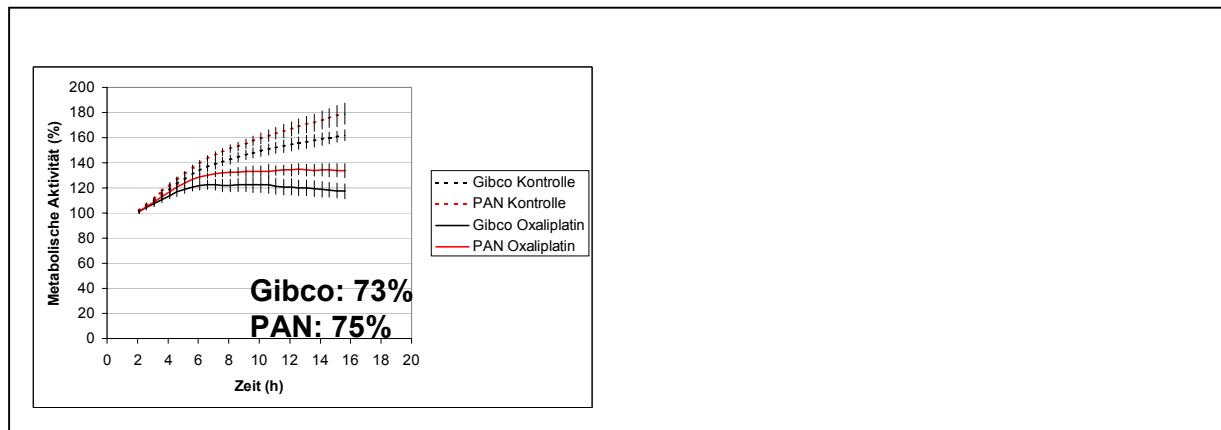


Abbildung 14: Messung der Chemosensitivität von HCT 116-Zellen gegenüber Oxaliplatin im ChemoSelect®-Test mit Serum unterschiedlicher Chargen: Darstellung der metabolischen Aktivität behandelter und unbehandelter Zellen in Prozent ihrer Anfangsaktivität. Die hervorgehobene Prozentzahl gibt die Restaktivität nach 14 h Inkubation mit Oxaliplatin relativ zur entsprechenden Kontrolle wieder. Die Ursprungscharge stammte von der Firma Gibco, die neue Charge von der Firma PAN.

5.2.4 SeleX

Auf Basis der Untersuchungen zur Optimierung des Mediums wurde ein neues Medium definiert und die Produktion für weitere Versuche in Auftrag gegeben. Grundlage des neuen Mediums ist das Kulturmedium DMEM/F12, welches sich durch eine breite Einsetzbarkeit für humane Tumorzellen auszeichnet. Folgende Abwandlungen bezüglich DMEM/F12 wurden in Anlehnung an obige Ergebnisse vollzogen, um das Medium an den ChemoSelect®-Test zu adaptieren: Um die Pufferkapazität zu verringern, wurde zum einen der Karbonatpuffer (NaHCO_3) weggelassen sowie die Phosphatkonzentration von ca. 1 mM auf 0,1 mM reduziert. Die Glukosekonzentration wurde von ca. 3 g/l auf 5 g/l erhöht, um die Ansäuerungsrate zu steigern. Wie für die meisten erhältlichen Formen von DMEM/F12 Medium üblich, wurde dem Medium Glutamin in einer Konzentration von 2 mM zugefügt. In Experimenten wurde dem Medium 10% FCS der Charge P221909 (PAN) zugefügt.

5.3 Optimierung der Zellzahl

Eine maßgebliche Limitation aller Chemosensitivitätstests ist die einzubringende Zellzahl. In den meisten Fällen ist es daher notwendig, einen Kompromiss zwischen Reproduzierbarkeit (Mehrfachbestimmungen) und der Anzahl der zu testenden Chemotherapeutika einzugehen. Um neben einer genauen Vorhersage auch eine möglichst wertvolle Aussage treffen zu können, ist es daher von Nutzen, die einzusetzende Zellzahl zu minimieren, um möglichst viele Testbedingungen untersuchen zu können. Aus diesem Grunde sollten die Grenzen untersucht werden, die bezüglich der in den Test einzubringenden Zellzahl bestehen. In Teil 5.1.3 wurde dies bereits an Zelllinien durchgeführt. Da sich Zellen, die aus primärem Tumorgewebe stammen, deutlich von Zelllinien unterscheiden können, sollte in diesem Teil zusätzlich die Grenze für diese Art von Zellen untersucht werden. Dazu wurden zwei Ovarialkarzinome und ein Kolorektalkarzinom untersucht.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde herausgefunden, dass das in die Messkammer eingebrachte Volumen von 10 μl größer ist als die eigentliche Kammer, wie sie im Testgerät vorliegt. Es lässt sich vermuten, dass das überschüssige Volumen beim Einsetzen der Kammer aus dieser herausgedrückt wird. Versuche bestätigten, dass bei vergleichbarer Konzentration der Agarose-Zell-Mischung die halbe Menge an Suspension (5 μl) ähnlich hohe oder höhere Ansäuerungsraten verursachte als das Ausgangsvolumen. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden weitere Experimente zur Reduktion der Zellzahl mit einem Pelletvolumen von 5 μl durchgeführt. Ausgangsgröße waren nach Metzger et al. (2001) 125.000 Zellen pro Kanal in 10 μl .

Tabelle 7 fasst die anfänglichen Ansäuerungsraten für unterschiedliche Karzinome und Zellzahlen zusammen. In zwei von drei Fällen waren die initialen Aktivitäten bei 10.000 eingesetzten Zellen sehr gering, was gegen diesen Aufbau spricht.

Zellzahl/Kanal	Aktivität Ovar 1 (- $\mu\text{V/s}$)	Aktivität Ovar 2 (- $\mu\text{V/s}$)	Aktivität Kolon (- $\mu\text{V/s}$)
125.000	86	46	34
50.000	123	46	41
25.000	65	33	16
10.000	45	7	5

Tabelle 7: Übersicht über metabolische Anfangsaktivitäten von Zellen im Cytosensor, die aus verschiedenen Primärtumoren stammten (in $-\mu\text{V/s}$). Unterschiedliche Zellzahlen wurden in das Gerät eingebracht.

Abbildung 15 zeigt, dass in allen Fällen eine Reduktion auf 1/5, in einem Fall sogar um den Faktor 12,5 ohne Einschränkung möglich ist. Diese Zahlen beinhalten bereits die Reduktion des eingebrachten Volumens. Praktische Konsequenz dieser Erkenntnisse ist, dass mit der gleichen Zellzahl potentiell 5 bis 12,5 mal mehr Testbedingungen untersucht werden könnten, was die Anwendbarkeit des Verfahrens erheblich vergrößern würde.

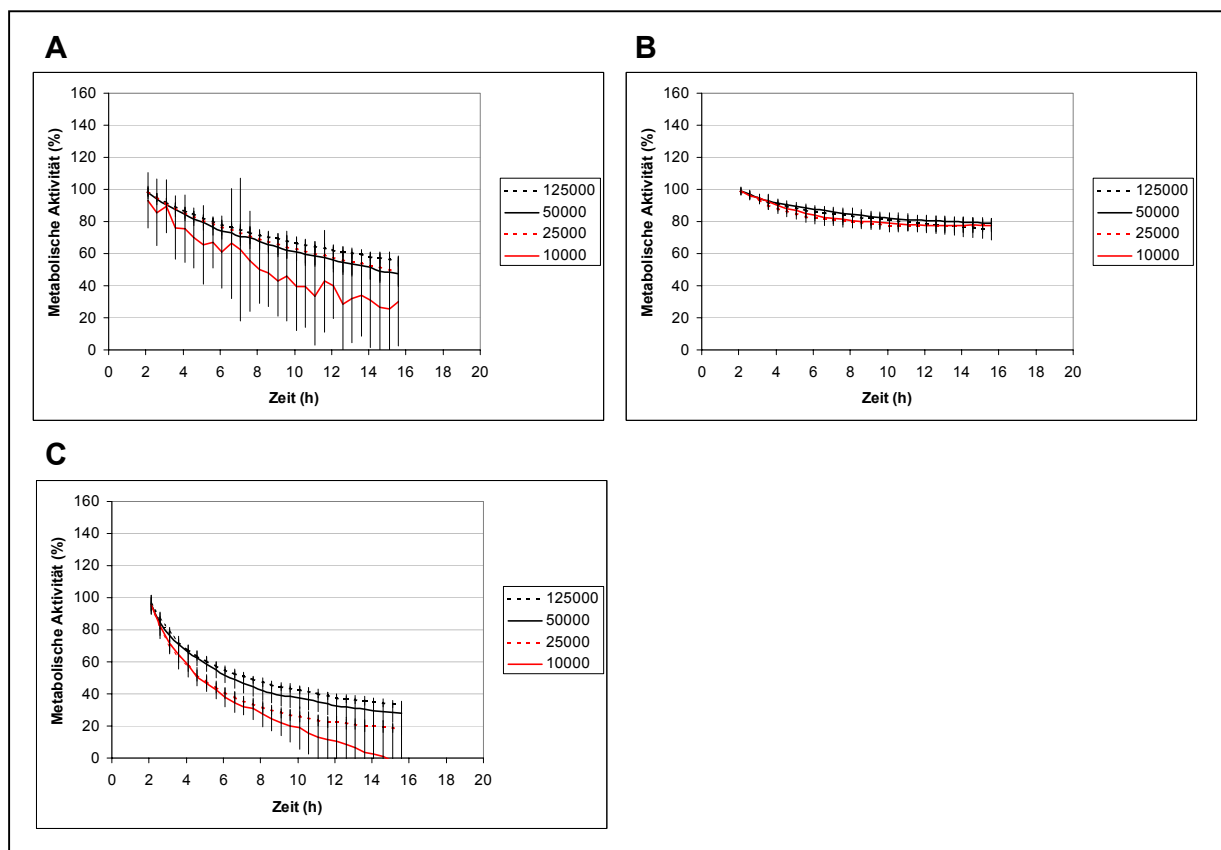


Abbildung 15: Einsatz unterschiedliche Zellzahlen im ChemoSelect®-Test. Zellen wurden aus primärem Tumorgewebe gewonnen: A. Ovarialkarzinom 1, B: Ovarialkarzinom 2, C. Kolonkarzinom. Darstellung der metabolischen Aktivität behandelter und unbehandelter Zellen in Prozent ihrer Anfangsaktivität.

Eine zusätzlich durchgeführte Analyse verdeutlicht, dass sich verschiedene Tumorentitäten bezüglich der Zellzahl, die sich aus operativ entfernten Tumoren isolieren lässt, deutlich von einander unterscheiden. Zu diesem Zweck wurden vier Ovarialkarzinome und drei Kolorektalkarzinome herangezogen, die im Rahmen von Untersuchungen außerhalb dieser Arbeit in der Firma untersucht wurden. Aus Tabelle 8 A und 8 B wird deutlich, dass die eingesandte Gewebemenge bei beiden Tumorentitäten im Durchschnitt sehr ähnlich war. Ein deutlicher Unterschied zeigte

sich jedoch in der Zellzahl, die pro Gewicht aus dem Gewebe isoliert werden konnte. Aus dieser kleinen Auswertung wird deutlich, dass bei den untersuchten Gewebeproben durchschnittlich um einen Faktor 5 mehr Zellen im Gewebe von Ovarialkarzinomen enthalten sind, als in Kolorektalkarzinomen. Dieser Unterschied hat einen maßgeblichen Einfluss auf den Einsatzbereich des Testverfahrens und macht den Stellenwert der Zellzahlreduktion deutlich.

Bezeichnung	Gewicht (g)	Zellzahl	Zellzahl / g
Ovar 1	7,8	29,6*10E6	3,8*10E6
Ovar 2	10,6	90,0*10E6	8,5*10E6
Ovar 3	8,2	11,4*10E6	1,4*10E6
Ovar 4	4,3	9,8*10E6	2,3*10E6
Durchschnitt	7,7	35,1*10E6	4,6*10E6

Tabelle 8 A: Übersicht über Gewicht und Zellzahl vier operativ entfernter Ovarialkarzinome, die für Forschungszwecke in die Firma CellControl eingeschickt und untersucht wurden.

Bezeichnung	Gewicht (g)	Zellzahl	Zellzahl / g
Kolon 1	9,0	3,5*10E6	0,4*10E6
Kolon 2	13,3	7,5*10E6	0,6*10E6
Kolon 3	1,6	7,5*10E6	4,8*10E6
Durchschnitt	8,0	6,2*10E6	0,8*10E6

Tabelle 8 B: Übersicht über Gewicht und Zellzahl von vier operativ entfernten Kolorektalkarzinomen, die für Forschungszwecke in die Firma CellControl eingeschickt und untersucht wurden.

In den aufgeführten Beispielen würde die erzielte Reduktion der Zellzahl bedeuten, dass beim Ovarialkarzinom bei standardmäßiger vierfach Bestimmung durchschnittlich 46 Bedingungen ($46 \cdot 4 \cdot 25.000 = 4,6 \cdot 10^6$) statt bisher 9,2 ($9,2 \cdot 4 \cdot 125.000 = 4,6 \cdot 10^6$) Bedingungen untersucht werden könnten. Beim Kolorektalkarzinom wird der Fortschritt noch deutlicher: Hier könnten durchschnittlich 8 Bedingungen ($8 \cdot 4 \cdot 25.000 = 0,8 \cdot 10^6$) statt ursprünglich 1,6 Bedingungen ($1,6 \cdot 4 \cdot 125.000 = 4,6 \cdot 10^6$) untersucht werden. In diesem Fall würde die Reduktion erst eine sinnvolle Untersuchung ermöglichen.

5.4 Verlässlichkeit

In Kapitel 5.1.4 konnte gezeigt werden, dass Effekte von Chemotherapeutika im Cytosensor grundsätzlich detektiert werden können. Die Chemotherapeutika bilden eine sehr inhomogene Gruppe, was ihre Wirkmechanismen und ihre chemische Struktur angeht. Ein breit einsetzbarer Chemosensitivitätstest sollte die Möglichkeit

bieten, Effekte von Substanzen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen aufzuzeigen.

In diesem Kapitel sollte untersucht werden, ob Sensitivitäten für Substanzen der wichtigsten Wirkstoffklassen im optimierten Medium darstellbar sind. Beispielhaft wurden Vertreter verschiedener Substanzklassen innerhalb der Chemotherapeutika im CV-Test und im ChemoSelect[®]-Test auf die Möglichkeit des Nachweises einer Wirkung hin untersucht. Gesucht wurde dabei jeweils nach einer resistenten und einer sensitiven Zelllinie. Grundsätzlich wurden alle in Kapitel 4.2.1 aufgeführten Zelllinien für diese Untersuchungen herangezogen. Dabei spielte die klinische Anwendung der Substanzen für bestimmte Tumorentitäten keine Rolle. Während im CV-Test unterschiedliche Konzentrationen der Therapeutika untersucht wurden, setzte man im Cytosensor aus praktischen Gründen jeweils die maximale Serumkonzentration (c_{\max}) ein, die bei entsprechender Therapie in Patienten erreicht wird.

5.4.1 Alkylanzien

Wie in Abbildung 16 dargestellt, wies die Zelllinie SK-BR-3 bei c_{\max} eine Sensitivität gegenüber Cisplatin auf. Der Effekt war in beiden Tests mit 68% im CV-Test und 76% im ChemoSelect[®]-Test sehr deutlich. Die Zelllinie BT-474 erwies sich dagegen als resistent. Bei c_{\max} waren im CV-Test noch 90% der Zellen nachzuweisen und Cisplatin vermochte die Zellen erst bei höheren Konzentrationen deutlich zu inhibieren. Die Messung im Cytosensor ergab einen Wert von 94% und stellt somit ebenfalls eine Resistenz dar.

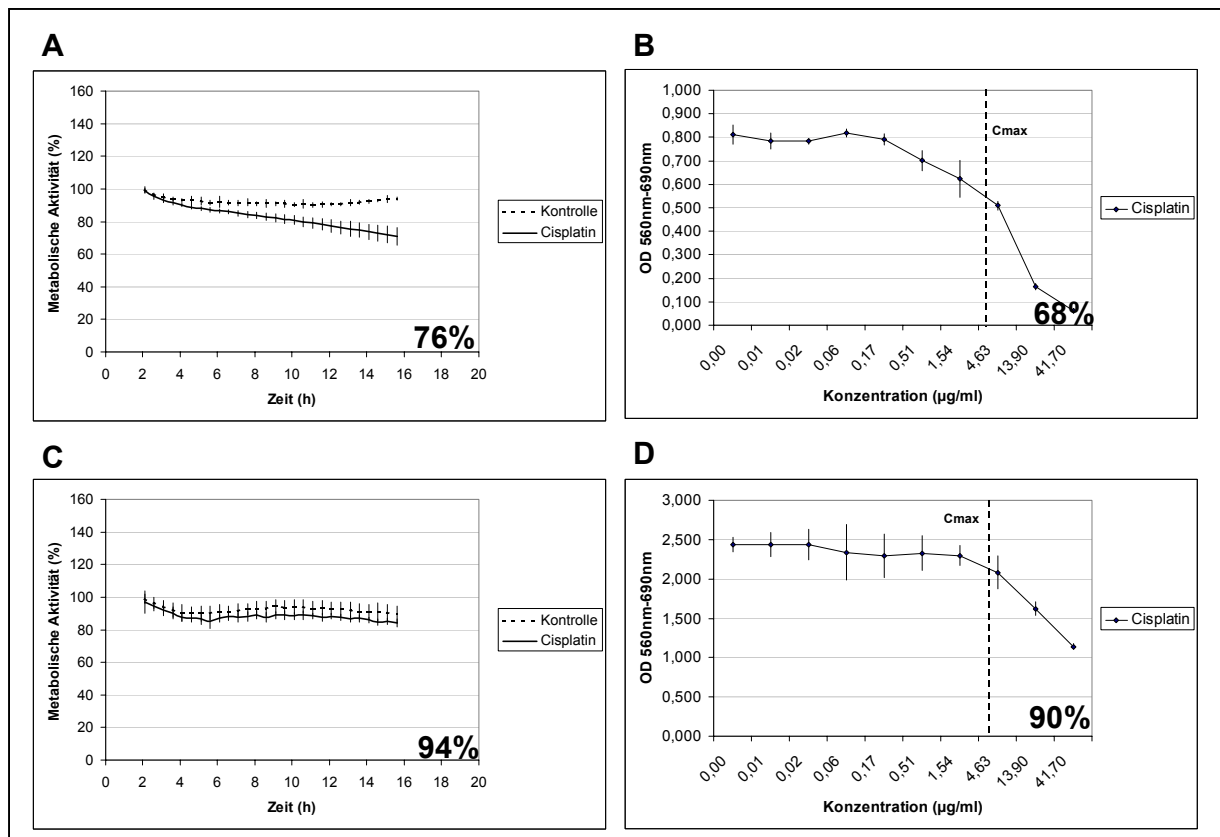


Abbildung 16: Messung der Chemosensitivität humaner Karzinomzelllinien gegenüber Cisplatin im ChemoSelect[®]-Test (A, C) und im CV-Test (B, D): Darstellung der metabolischen Aktivität behandelter und unbehandelter Zellen in Prozent ihrer Anfangsaktivität. Die hervorgehobene Prozentzahl gibt die Restaktivität nach 14 h Inkubation mit dem Chemotherapeutikum relativ zur Kontrolle wieder (A, C). Darstellung der gemessenen optischen Dichte in Abhängigkeit der eingesetzten Chemotherapeutikakonzentration nach 14 h Inkubation. Die maximale Serumkonzentration der Chemotherapeutika ist als c_{max} hervorgehoben (B, D). Untersuchte Zelllinien: SK-BR-3 (A, B), BT-474 (C, D).

5.4.2 Antimetabolite

Exemplarisch für die Gruppe der Pyrimidinanaloga innerhalb der Gruppe der Antimetabolite wurden die Substanzen 5'-Fluorouracil (5FU) und Gemcitabin untersucht.

Die Zelllinie SK-BR-3 erwies sich als äußerst sensitiv gegenüber Gemcitabin. Im CV-Test war bereits bei einer Konzentration von ca. $1/50 c_{max}$ eine deutliche Inhibierung von ca. 50% zu beobachten. Im Cytosensor konnte diese Wirkung ebenfalls aufgezeigt werden und resultierte in einer Restaktivität von 79% (Abb. 17 A). Auffallend ist hier der besonders schnell eintretende Effekt. Im Gegensatz dazu zeigte Gemcitabin keine Wirkung auf die Zelllinie SK-OV-3 (Abb. 17 C, D). Erst bei

Konzentrationen deutlich über c_{\max} wirkte die Substanz auf diese Zellen, während im CV-Test bei c_{\max} eine leichte Stimulation zu beobachten war.

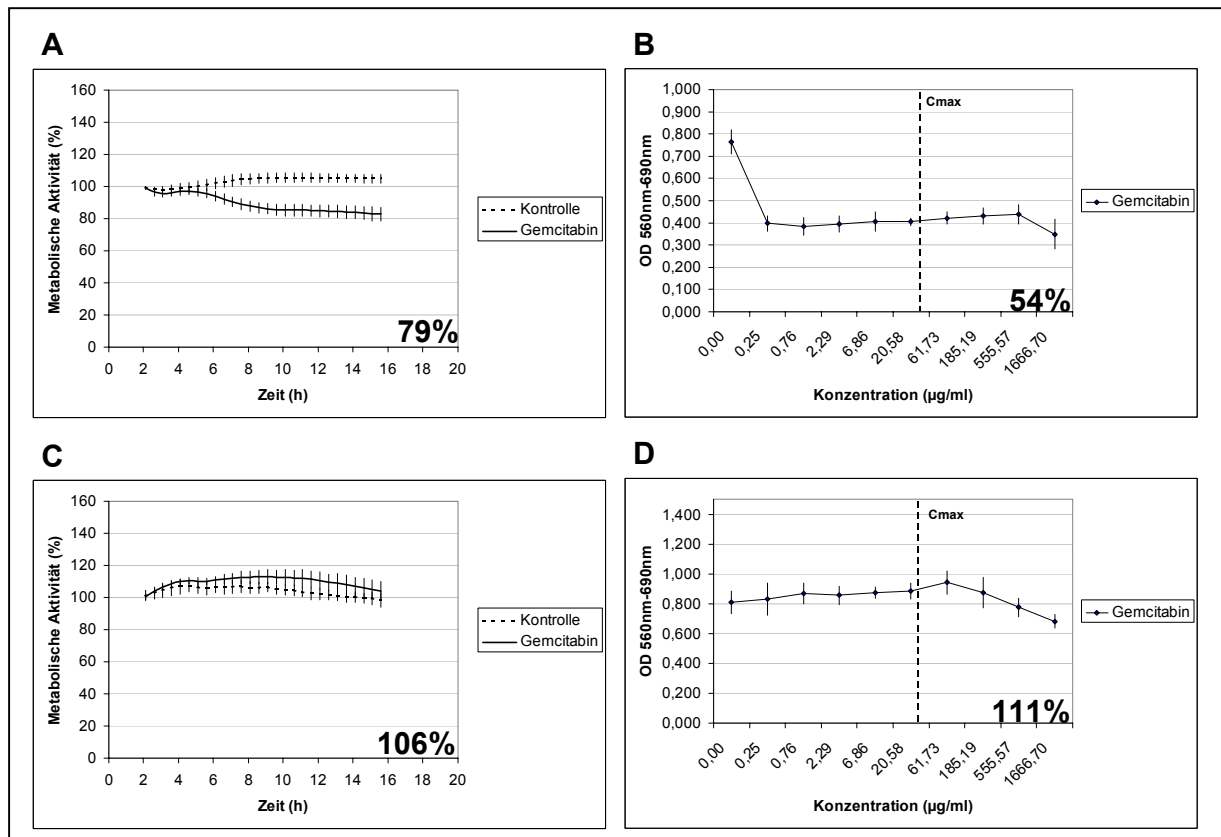


Abbildung 17: Messung der Chemosensitivität humaner Karzinomzelllinien gegenüber Gemcitabin im ChemoSelect®-Test (A, C) und im CV-Test (B, D): Darstellung der metabolischen Aktivität behandelter und unbehandelter Zellen in Prozent ihrer Anfangsaktivität. Die hervorgehobene Prozentzahl gibt die Restaktivität nach 14 h Inkubation mit dem Chemotherapeutikum relativ zur Kontrolle wieder (A, C). Darstellung der gemessenen optischen Dichte in Abhängigkeit der eingesetzten Chemotherapeutikakonzentration nach 14 h Inkubation. Die maximale Serumkonzentration der Chemotherapeutika ist als c_{\max} hervorgehoben (B, D). Untersuchte Zelllinien: SK-BR-3 (A, B), SK-OV-3 (C, D).

Wie Gemcitabin ist auch 5FU ein Pyrimidinanalogon und gehört in die Klasse der Antimetabolite. 5FU ist ein wichtiges Chemotherapeutikum in der Therapie des Kolonkarzinoms. 5FU zeigte auf die Zelllinie HCT 116 bei c_{\max} eine deutliche Wirkung (Restaktivität 60%) im CV-Test und im ChemoSelect®-Test (Restaktivität 67%). Die Zelllinie MDA-MB-453 erwies sich dagegen als resistent gegenüber 5FU. Während im CV-Test eine leichte Stimulation bei c_{\max} beobachtet werden konnte, war im Cytosensor ein minimaler Effekt sichtbar (Restaktivität 94%).

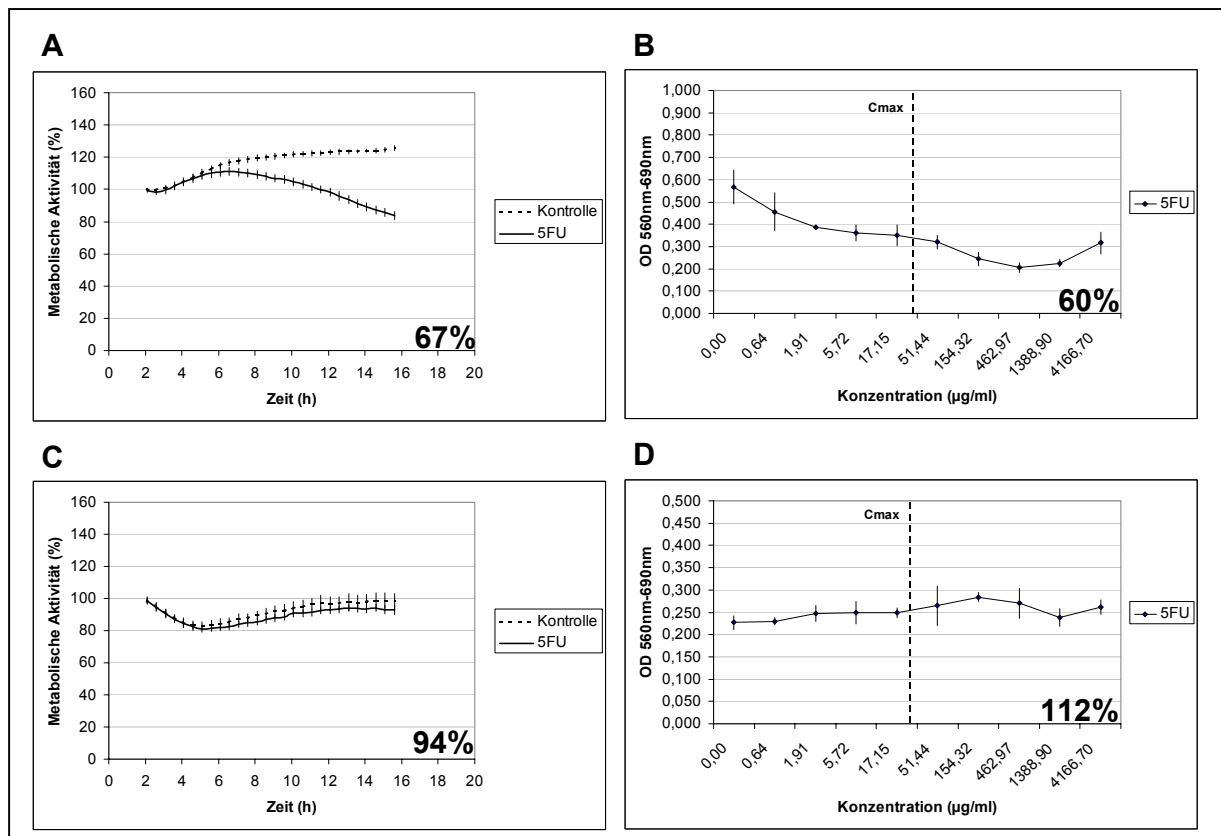


Abbildung 18: Messung der Chemosensitivität humaner Karzinomzelllinien gegenüber 5FU im ChemoSelect®-Test (A, C) und im CV-Test (B, D): Darstellung der metabolischen Aktivität behandelter und unbehandelter Zellen in Prozent ihrer Anfangsaktivität. Die hervorgehobene Prozentzahl gibt die Restaktivität nach 14 h Inkubation mit dem Chemotherapeutikum relativ zur Kontrolle wieder (A, C). Darstellung der gemessenen optischen Dichte in Abhängigkeit der eingesetzten Chemotherapeutikakonzentration nach 14 h Inkubation. Die maximale Serumkonzentration der Chemotherapeutika ist als c_{max} hervorgehoben (B, D). Untersuchte Zelllinien: HCT 116 (A, B), MDA-MB-453 (C, D).

5.4.3 Mitosehemmer / Spindelgifte

Beispielhaft für die Gruppe der Mitosehemmer / Spindelgifte wurde Vinorelbin untersucht. Die Zelllinie HCT 116 erwies sich in beiden Tests als äußerst sensitiv gegenüber Vinorelbin (Abb. 19 A, B, Restaktivitäten im CV 55%, CS 53%). Dieser Effekt war im Cytosensor bereits innerhalb weniger Stunden zu beobachten. Anders verhielt es sich bei der Zelllinie Capan-1. Sie erwies sich im Cytosensor mit einer relativen Aktivität von 105% als resistent und eine Wirkung war im CV-Test erst bei ca. 10-facher c_{max} zu beobachten (Abb. 19 C, D).

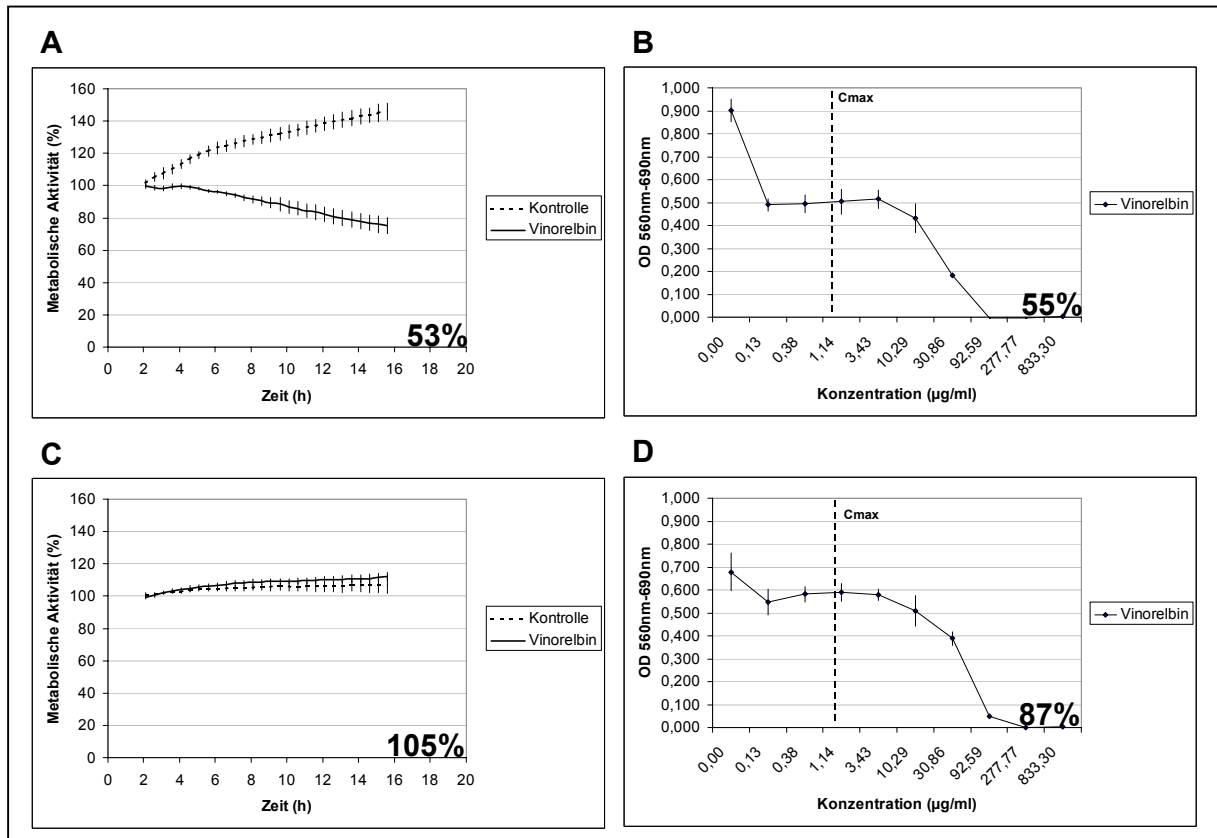


Abbildung 19: Messung der Chemosensitivität humaner Karzinomzelllinien gegenüber Vinorelbin im ChemoSelect®-Test (A, C) und im CV-Test (B, D): Darstellung der metabolischen Aktivität behandelter und unbehandelter Zellen in Prozent ihrer Anfangsaktivität. Die hervorgehobene Prozentzahl gibt die Restaktivität nach 14 h Inkubation mit dem Chemotherapeutikum relativ zur Kontrolle wieder (A, C). Darstellung der gemessenen optischen Dichte in Abhängigkeit der eingesetzten Chemotherapeutikakonzentration nach 14 h Inkubation. Die maximale Serumkonzentration der Chemotherapeutika ist als c_{max} hervorgehoben (B, D). Untersuchte Zelllinien: HCT 116 (A, B), Capan-1 (C, D).

Ebenfalls Naturstoffe innerhalb der Klasse der Mitosehemmer / Spindelgifte sind die Taxane. Beispielhaft für diese Gruppe von Chemotherapeutika wurde Paclitaxel untersucht. Da Paclitaxel nicht wasserlöslich ist, wurde es in einer Konzentration von 50 mg/ml in DMSO gelöst. In den Versuchen wurde eine entsprechende Lösungsmittelkontrolle mitgeführt.

Die DMSO-Kontrolle zeigte einen minimal stimulierenden Effekt auf die Zellen. Die Zelllinie SK-BR-3 erwies sich als sensitiv und bereits bei der geringsten im CV-Test untersuchten Konzentration konnte eine Inhibition von ca. 65% beobachtet werden (Abb. 19 B). Dies bestätigte sich im ChemoSelect®-Test mit einer relativen Restaktivität von 77% (Abb. 20 A). Im Gegensatz dazu konnte für BT-474 Zellen keine Wirkung beobachtet werden. Werte von 101% im CV-Test und 94% im ChemoSelect®-Test besagen, dass diese Zellen resistent gegenüber Paclitaxel sind.

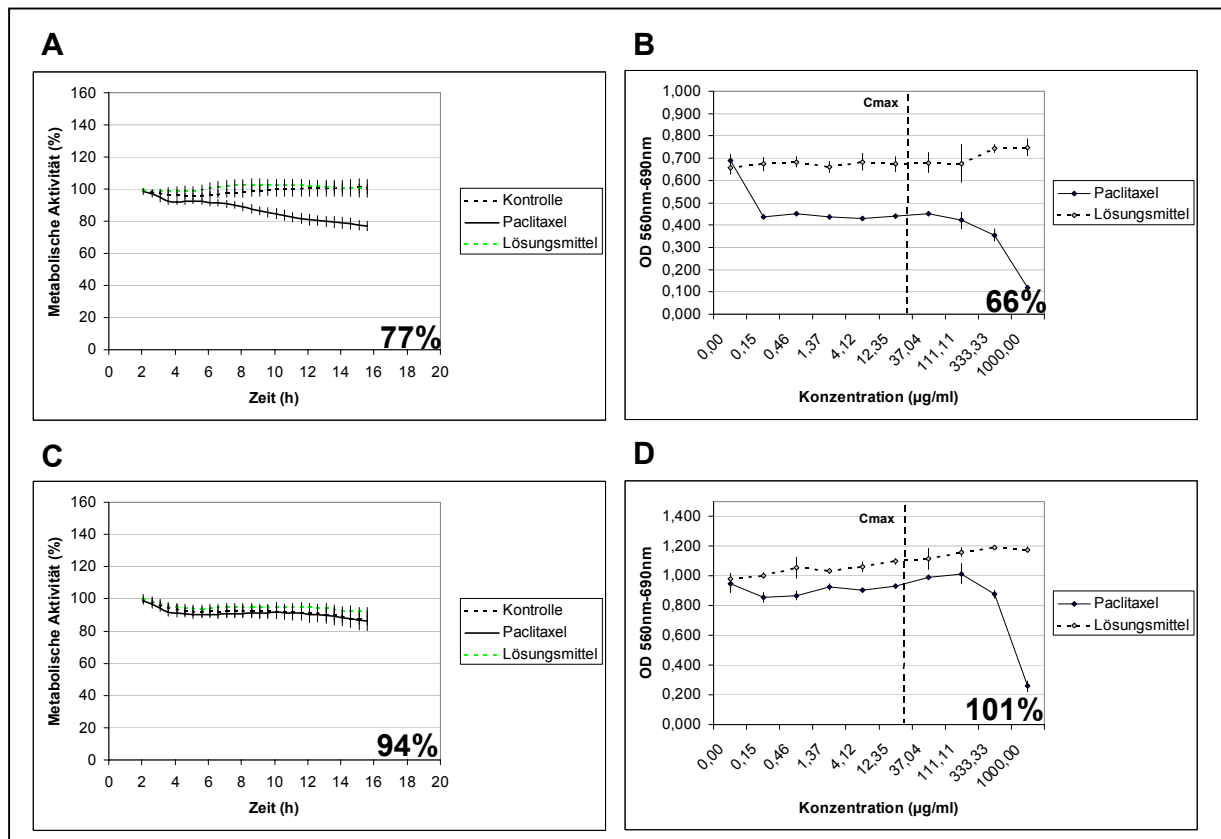


Abbildung 20: Messung der Chemosensitivität humaner Karzinomzelllinien gegenüber Paclitaxel im ChemoSelect®-Test (A, C) und im CV-Test (B, D): Darstellung der metabolischen Aktivität behandelter und unbehandelter Zellen in Prozent ihrer Anfangsaktivität. Die hervorgehobene Prozentzahl gibt die Restaktivität nach 14 h Inkubation mit dem Chemotherapeutikum relativ zur entsprechenden Kontrolle wieder (A, C). Darstellung der gemessenen optischen Dichte in Abhängigkeit der eingesetzten Chemotherapeutikakonzentration nach 14 h Inkubation. Die maximale Serumkonzentration der Chemotherapeutika ist als c_{max} hervorgehoben (B, D). Untersuchte Zelllinien: SK-BR-3 (A, B), BT-474 (C, D).

5.4.4 Interkalanzien: Anthrazykline

Beispielhaft für die Gruppe der Anthrazykline wurde Adriamycin (= Doxorubicin) untersucht. Für die Zelllinie HCT 116 zeigte sich im Cytosensor mit einer Restaktivität von 37% der Kontrolle der stärkste beobachtete Effekt (Abb. 21 A). Auch im CV-Test inhibierte die Substanz die Zellen und führte zu einem Restwert von 59%. Im Gegensatz dazu reagierte die Zelllinie BT-474 nicht sensitiv auf Adriamycin. Die Messung im Cytosensor ergab einen Wert von 96% und erst eine Konzentration über c_{max} führte im CV-Test zu einer Inhibition. Hier lag der Wert für c_{max} bei 105%.

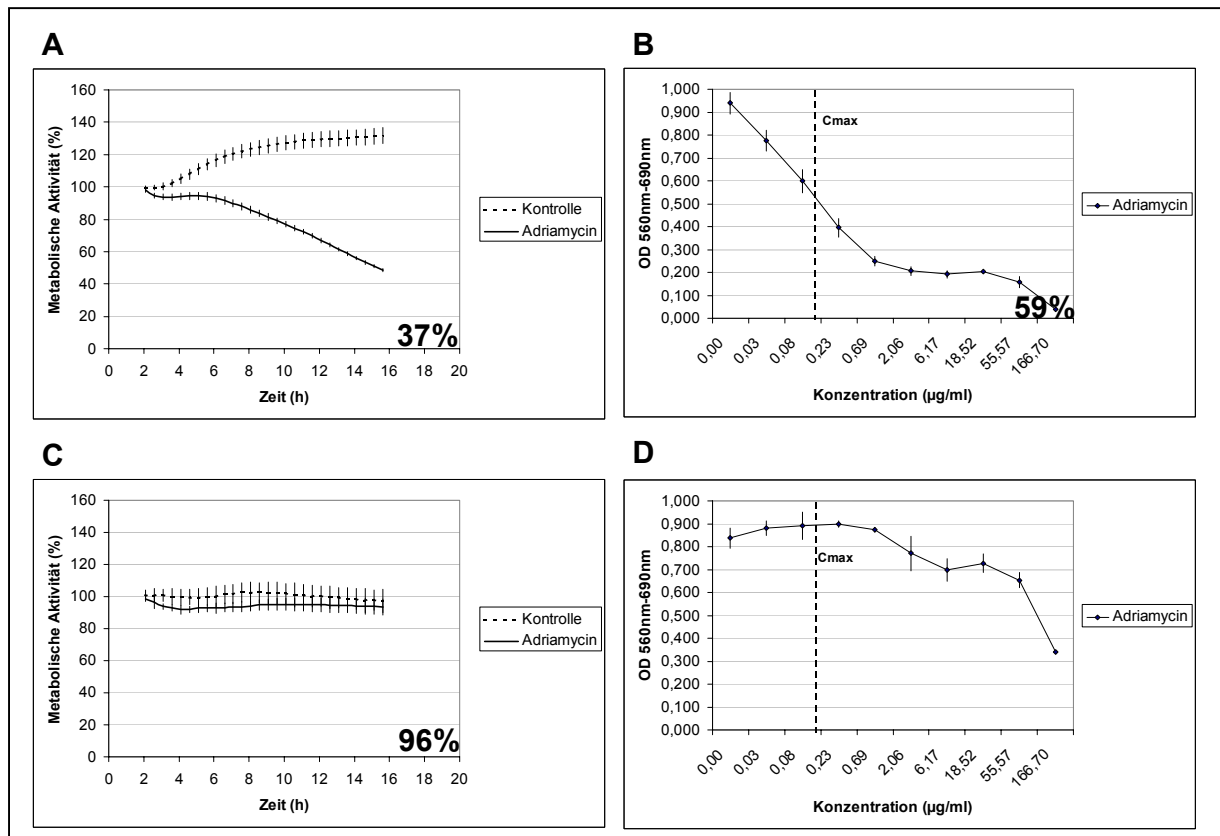


Abbildung 21: Messung der Chemosensitivität humaner Karzinomzelllinien gegenüber Adriamycin im ChemoSelect[®]-Test (A, C) und im CV-Test (B, D): Darstellung der metabolischen Aktivität behandelter und unbehandelter Zellen in Prozent ihrer Anfangsaktivität. Die hervorgehobene Prozentzahl gibt die Restaktivität nach 14 h Inkubation mit dem Chemotherapeutikum relativ zur Kontrolle wieder (A, C). Darstellung der gemessenen optischen Dichte in Abhängigkeit der eingesetzten Chemotherapeutikakonzentration nach 14 h Inkubation. Die maximale Serumkonzentration der Chemotherapeutika ist als c_{max} hervorgehoben (B, D). Untersuchte Zelllinien: HCT 116 (A, B), BT-474 (C, D).

5.5 Untersuchung tumorspezifischer Therapeutika

In der modernen Tumorthherapie spielen neben Chemotherapeutika zunehmend Substanzen eine Rolle, die sich durch neuartige Wirkmechanismen deutlich von Chemotherapeutika unterscheiden. Es handelt sich dabei um Moleküle, die spezifisch gegen tumorzellassoziierte Strukturen gerichtet sind. Eine wichtige Rolle in dieser Gruppe spielen vor allem therapeutische Antikörper sowie inhibitorische Moleküle wie Tyrosinkinase-Inhibitoren.

In diesem Versuchsteil sollte untersucht werden, ob sich im ChemoSelect[®]-Test neben Chemotherapeutika auch tumorspezifische Therapeutika auf ihre Wirkung hin untersuchen lassen. Ein prominentes Beispiel für diese Klasse von Tumortherapeutika ist der monoklonale Antikörper Herceptin, der zur Therapie des

metastasierenden Mammakarzinoms zugelassen ist. Der Antikörper bindet den Her2/neu Rezeptor und inhibiert so das Wachstum von Zellen, die dieses Oberflächenmolekül überexprimieren. Um zu untersuchen, ob sich eine Wirkung von Herceptin im ChemoSelect[®]-Test nachweisen lässt, wurden zunächst Modellsysteme mit Zelllinien etabliert. Untersucht wurden zwei Zelllinien, die eine starke Überexpression des Her2/neu Rezeptors (SK-BR-3, BT-474) zeigen, sowie eine, die lediglich eine leichte Expression aufweist (MCF7).

5.5.1 Nachweis des Her2/neu Rezeptors

Um zu überprüfen, ob die untersuchten Zelllinien des Modellsystems eine der Literatur entsprechende Expression des Her2/neu Rezeptors aufweisen, wurde der kommerziell erhältliche, immunhistochemische HercepTest (DAKO) durchgeführt. In diesem Test wird ein markierter, polyklonaler Antikörper gegen Her2/neu eingesetzt, um mit Hilfe der Färbung eine Aussage über den Rezeptorstatus machen zu können. Die Intensität der Färbung gibt Aufschluss darüber, ob die untersuchten Zellen eine starke Überexpression des Rezeptors aufweisen und somit für eine Therapie mit Herceptin in Frage kommen. Für eine Therapie kommen nur Patienten mit Tumoren mit dem Her2/neu-Status 3+ in Frage. In schwach positiven Fällen (2+) kommt eine Therapie nur in Frage, wenn in einem FISH-Test eine Genamplifikation nachgewiesen werden konnte.

Ergebnisse des HercepTests sind in Abbildung 21 wiedergegeben. Wie beschrieben wiesen die Zelllinien SK-BR-3 und BT-474 eine starke Überexpression auf, die jeweils in die Kategorie 3+ fällt. SK-BR-3 zeigte dabei eine noch intensivere Färbung als BT-474. Die Zelllinie MCF7 hingegen wies nur eine leichte Expression des Rezeptors auf. Die Intensität der Färbung klassifiziert MCF7 als 1+. Der Rezeptor lässt sich also auch auf diesen Zellen nachweisen, während eine Überexpression nicht vorliegt.

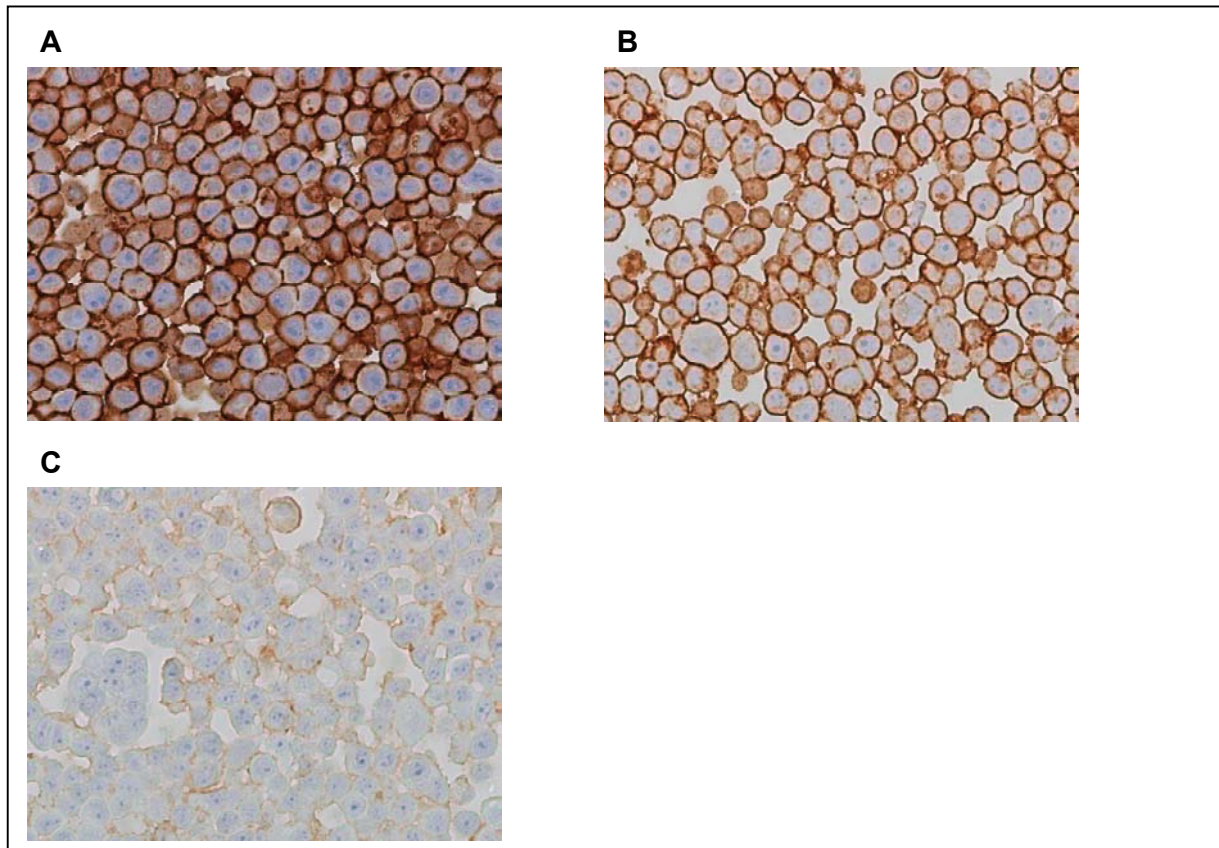


Abbildung 22: Immunhistochemische Untersuchung verschiedener Zelllinien mit dem HercepTest (DAKO). Gefärbt wird der membranständige Her2/neu-Rezeptor. SK-BR-3 (A), BT-474 (B), MCF7 (C).

5.5.2 Herceptin

Um für die Experimente sicherzustellen, dass der Her2/neu Rezeptor nicht durch Enzyme beeinträchtigt wird, wurden die Zellen anstelle von Trypsin mit EDTA aus den Kulturflaschen abgelöst. Der auszuwertende Zeitraum wurde von 16 h auf 24 h Inkubation erhöht, da zu erwarten war, dass Effekte, die Herceptin auf die Zellen bewirkt, weniger toxisch sind als die der Chemotherapeutika.

Im CV-Test zeigte Herceptin eine deutliche Wirkung auf SK-BR-3 Zellen (Abb. 23 A, B). Ab einer Konzentration von ca. 0,25 µg/ml war dieser Effekt bereits nach einem Tag Inkubation deutlich sichtbar und vergrößerte sich mit zunehmender Inkubationszeit. Der Effekt von Herceptin erreichte am fünften Tag eine maximale 60%-ige Inhibition, die ab einer Dosis von 1-2 µg/ml erzielt wurde. Die Erhöhung der Dosis brachte ab dieser Konzentration keinen zusätzlichen inhibitorischen Effekt. Für Messungen im Cytosensor wurde aufgrund dieser Erkenntnisse eine Konzentration von 4 µg/ml eingesetzt. Bei dieser Dosis konnte ein geringer Effekt von 91%

beobachtet werden. Obwohl die Unterschiede der Messkurven sehr gering waren, konnte ein Effekt von Herceptin mit dem Cytosensor innerhalb kürzester Zeit dargestellt werden, was diesen Test generell als geeignet darstellt, um eine Aussage bezüglich des Ansprechens auf Herceptin zu treffen. Begrenzt wird diese Aussage durch den systembedingten Messfehler, infolge dessen eine klare Unterscheidung der Messkurven nur begrenzt möglich ist.

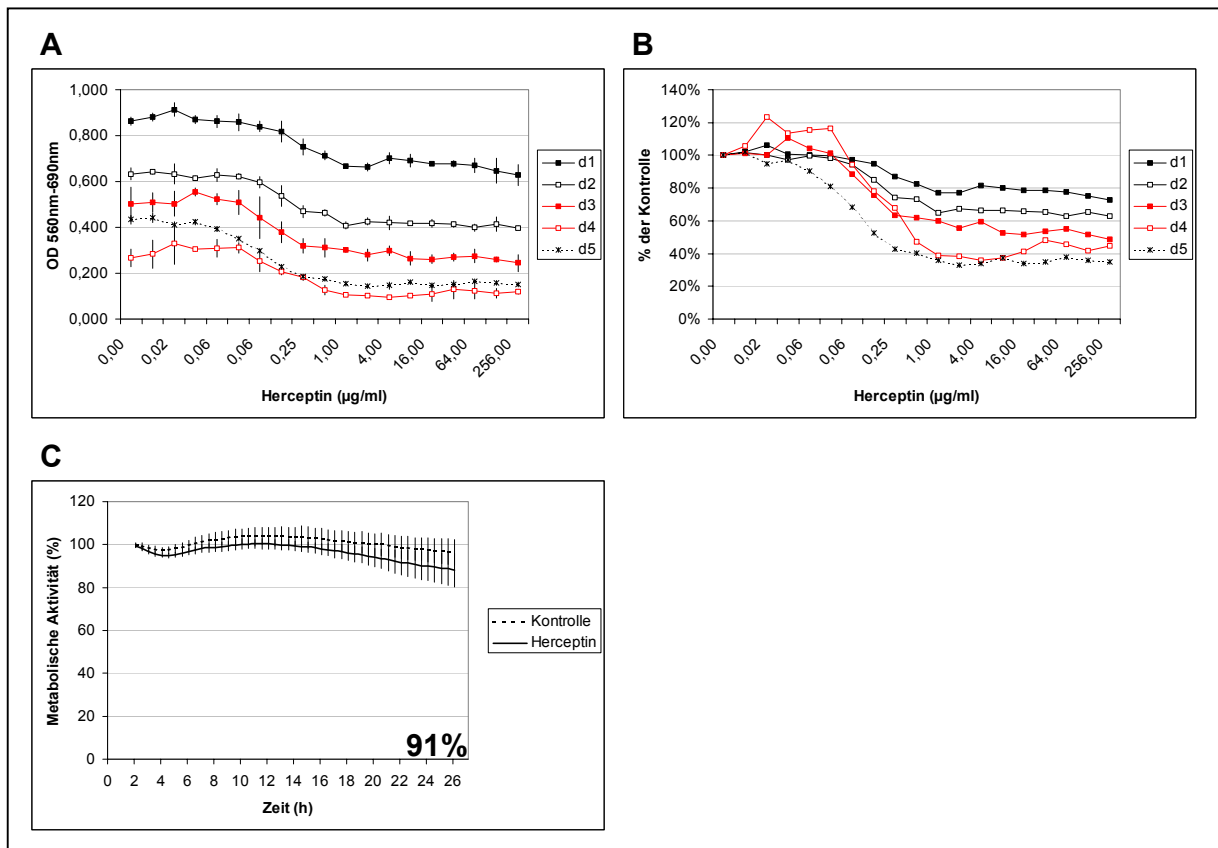


Abbildung 23: Messung der Sensitivität von SK-BR-3-Zellen gegenüber Herceptin im CV-Test (A, B) und im ChemoSelect®-Test (C). Darstellung der gemessenen optischen Dichten in Abhängigkeit der eingesetzten Herceptinkonzentration nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (A). Für unterschiedliche Inkubationszeiten wurden im CV-Test unterschiedliche Zellzahlen eingesetzt. Darstellung der optischen Dichten relativ zur entsprechenden Kontrolle ohne Herceptin (B). Darstellung der metabolischen Aktivität behandelter und unbehandelter Zellen in Prozent ihrer Anfangsaktivität. Die hervorgehobene Prozentzahl gibt die Restaktivität nach 24 h Inkubation mit 4 µg/ml Herceptin relativ zur Kontrolle wieder (C).

Die Messung von BT-474 Zellen im CV-Test zeigte, dass Herceptin auch auf diese Zellen wirkt (Abb. 24). Der Effekt wurde wiederum mit zunehmender Inkubationszeit größer. Ab einer eingesetzten Konzentration von ca. 1-2 µg/ml konnte auch bei BT-474 Zellen der maximale Effekt erzielt werden. Die im Cytosensor eingesetzte Konzentration von 4 µg/ml führte bei BT-474 Zellen mit 93% der Kontrolle zu einer geringen Inhibition der Ansäuerungsrate. Der gemessene Effekt trat innerhalb sehr

kurzer Zeit auf und vergrößerte sich im weiteren Verlauf nicht weiter. Auch für diese Zelllinie scheint sich also im Cytosensor ein Effekt von Herceptin aufzeigen zu lassen, wobei der Effekt etwas geringer ist und somit aufgrund der Messvariation noch schwieriger zwischen beiden Messkurven zu unterscheiden ist.

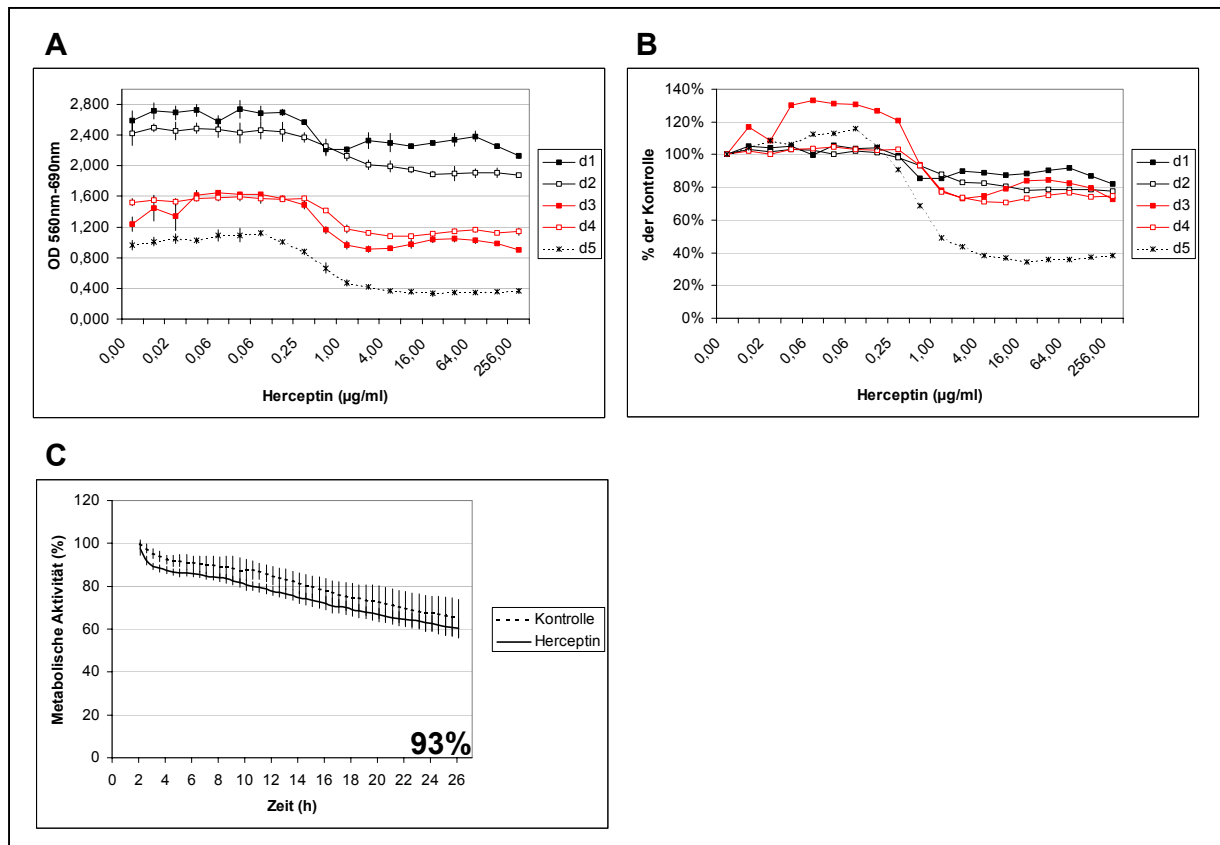


Abbildung 24: Messung der Sensitivität von BT-474-Zellen gegenüber Herceptin im CV-Test (A, B) und im ChemoSelect®-Test (C). Darstellung der gemessenen optischen Dichten in Abhängigkeit der eingesetzten Herceptinkonzentration nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (A). Für unterschiedliche Inkubationszeiten wurden im CV-Test unterschiedliche Zellzahlen eingesetzt. Darstellung der optischen Dichten relativ zur entsprechenden Kontrolle ohne Herceptin (B). Darstellung der metabolischen Aktivität behandelter und unbehandelter Zellen in Prozent ihrer Anfangsaktivität. Die hervorgehobene Prozentzahl gibt die Restaktivität nach 24 h Inkubation mit 4 µg/ml Herceptin relativ zur Kontrolle wieder (C).

Als Negativkontrolle für Sensitivitätstests gegenüber Herceptin diene die Zelllinie MCF7, welche nur eine geringe Her2/neu Rezeptorexpression aufweist (Abb. 25 C). Im CV-Test konnte Herceptin bei MCF7 Zellen unabhängig von der Inkubationszeit bei keiner getesteten Konzentration das Wachstum inhibieren. Bei hohen Konzentrationen kam es im Gegenteil zu einem erhöhten Wachstum der Zellen, die mit Herceptin in Kontakt kamen. Auch im Cytosensor konnte Herceptin keinen negativen Effekt auf die metabolische Aktivität von MCF7 Zellen ausüben. Zum

Versuchsende hin überstieg die Ansäuerungsrate der mit Herceptin behandelten Zellen die der unbehandelten Kontrolle geringfügig.

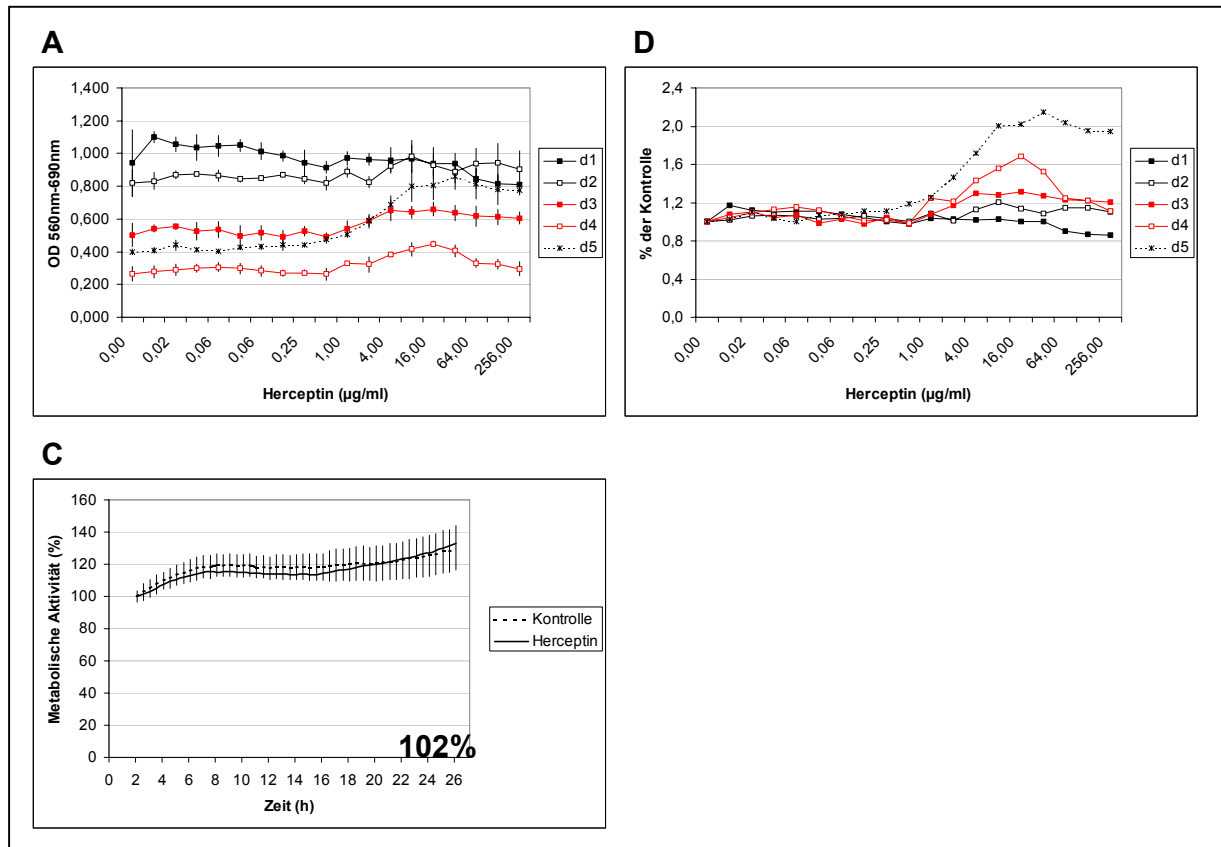


Abbildung 25: Messung der Sensitivität von MCF7-Zellen gegenüber Herceptin im CV-Test (A, B) und im ChemoSelect®-Test (C). Darstellung der gemessenen optischen Dichten in Abhängigkeit der eingesetzten Herceptinkonzentration nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (A). Für unterschiedliche Inkubationszeiten wurden im CV-Test unterschiedliche Zellzahlen eingesetzt. Darstellung der optischen Dichten relativ zur entsprechenden Kontrolle ohne Herceptin (B). Darstellung der metabolischen Aktivität behandelter und unbehandelter Zellen in Prozent ihrer Anfangsaktivität. Die hervorgehobene Prozentzahl gibt die Restaktivität nach 24 h Inkubation mit 4 µg/ml Herceptin relativ zur Kontrolle wieder (C).

Für die untersuchten Modellsysteme korreliert also das Ergebnis des immunhistochemischen HercepTests mit einem Ansprechen der untersuchten Zelllinien auf Herceptin in den verglichenen Testsystemen.

5.5.3 Kombination von Herceptin mit Chemotherapeutika

In der Klinik wird die Therapie mit Herceptin heute ergänzend zur Chemotherapie eingesetzt. Als Chemotherapeutika spielen dabei Taxane (Paclitaxel, Docetaxel) eine entscheidende Rolle.

Es sollte untersucht werden, ob im ChemoSelect[®]-Test kombinatorische Effekte von Herceptin und Chemotherapeutika detektiert werden können. Dazu sollten wiederum Modellsysteme untersucht werden, die sich bezüglich des Grades ihrer Her2/neu Expression unterscheiden und daher Unterschiede im Ansprechen erwarten ließen. Im Rahmen der Untersuchungen der alleinigen Wirkung von Chemotherapeutika und Herceptin stellte sich heraus, dass der Effekt, der durch den Antikörper nach 16 bzw. 24 h Inkubation maximal verursacht wird, deutlich kleiner ist als der Effekt, der durch wirksame Chemotherapeutika erzielt wird. Um zu verhindern, dass ein starker Effekt des Chemotherapeutikums einen Effekt von Herceptin überdeckt, wurde Paclitaxel in der reduzierten Konzentration von $1/10 c_{max}$ eingesetzt.

Die Zelllinie SK-BR-3 zeigte im CV-Test eine klare, dosisabhängige Inhibition durch Paclitaxel. Die Zugabe von Herceptin führte bei allen untersuchten Konzentrationen zu einem zusätzlichen inhibitorischen Effekt (Abb. 26 B). Im Cytosensor wurde beobachtet, dass die Zellen auch bei einer Konzentration von $1/10 c_{max}$ sensitiv gegenüber Paclitaxel waren und dass die Kombination von Paclitaxel mit Herceptin den inhibierenden Effekt zu vergrößern vermochte.

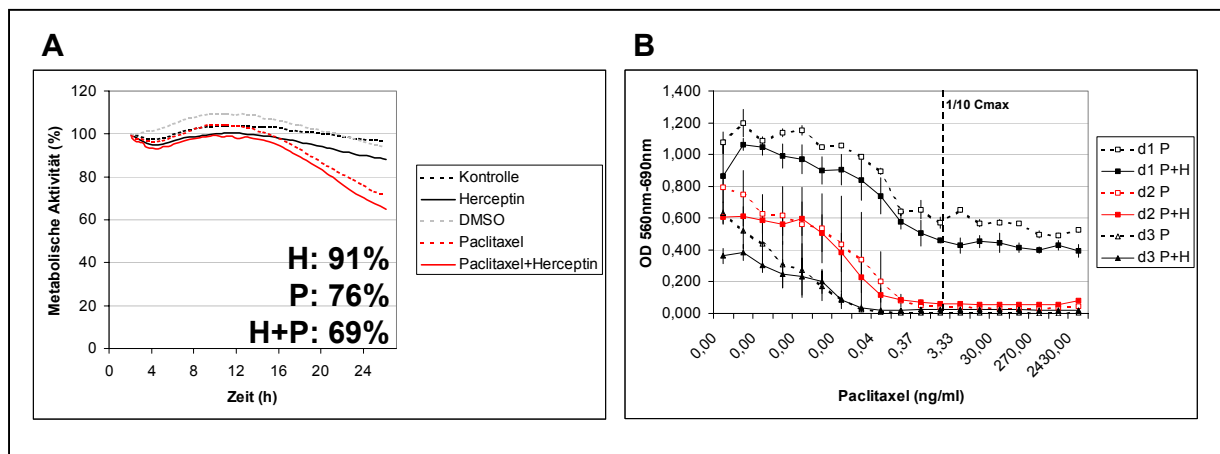


Abbildung 26: Sensitivitätstestung von SK-BR-3-Zellen gegenüber Paclitaxel und Herceptin im ChemoSelect[®]-Test (A) und im CV-Test (B). Darstellung der metabolischen Aktivität behandelter und unbehandelter Zellen in Prozent ihrer Anfangsaktivität, gemessen im Cytosensor (A). Die hervorgehobenen Prozentzahlen geben die Restaktivität nach 24 h Inkubation mit Herceptin (H), Paclitaxel (P) und Herceptin + Paclitaxel (H + P) relativ zur entsprechenden Kontrolle wieder (Herceptinkonzentration: 4 µg/ml, Paclitaxelkonzentration $1/10 c_{max}$). Einsatz Herceptin sowie der Kombination von Herceptin mit unterschiedlichen Konzentrationen von Paclitaxel im CV-Test mit Inkubationszeiten von 1 bis 3 Tagen (B). $1/10$ der maximalen Serumkonzentration von Paclitaxel ist als $1/10 c_{max}$ hervorgehoben. Für unterschiedliche Inkubationszeiten wurden im CV-Test unterschiedliche Zellzahlen eingesetzt.

Wie in Abbildung 27 A, B für den CV-Test dargestellt, konnte Herceptin erst ab dem zweiten Tag den Effekt von Paclitaxel auf BT-474 Zellen erhöhen. Am zweiten und

dritten Tag war der Effekt deutlich und bei den meisten getesteten Konzentrationen von Paclitaxel sichtbar. Wie bereits im Kapitel 5.4.3 gezeigt, wirkte Paclitaxel nur minimal auf BT-474 Zellen. Die Kombination von Paclitaxel und Herceptin führte dazu, dass die Ansäuerungsrate auf 83% der entsprechenden Kontrolle fiel, während die alleinige Zugabe von Paclitaxel und Herceptin zu einer verbleibenden Rate von 99% respektive 93% führten.

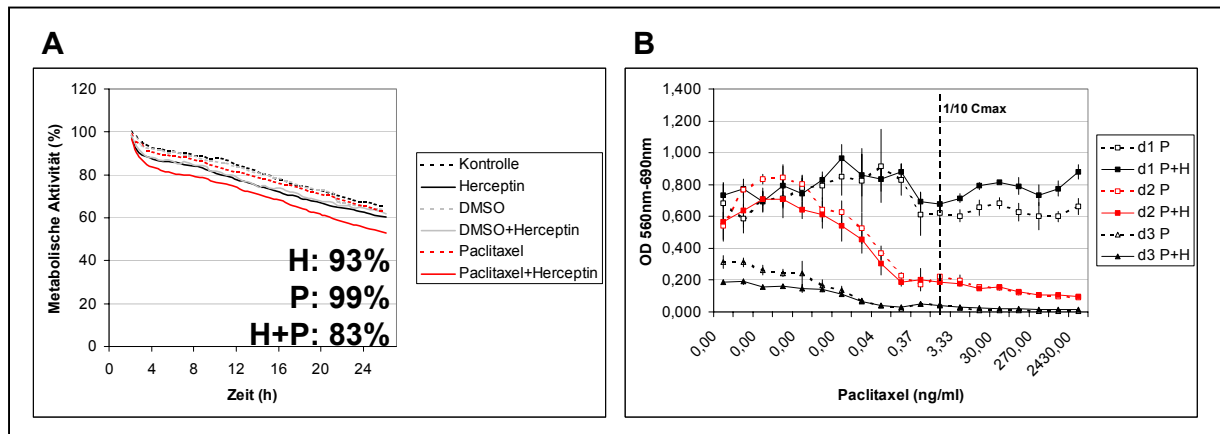


Abbildung 27: Sensitivitätstestung von BT-474-Zellen gegenüber Paclitaxel und Herceptin im ChemoSelect®-Test (A) und im CV-Test (B). Darstellung der metabolischen Aktivität behandelter und unbehandelter Zellen in Prozent ihrer Anfangsaktivität, gemessen im Cytosensor (A). Die hervorgehobenen Prozentzahlen geben die Restaktivität nach 24 h Inkubation mit Herceptin (H), Paclitaxel (P) und Herceptin + Paclitaxel (H + P) relativ zur entsprechenden Kontrolle wieder (Herceptinkonzentration: 4 µg/ml, Paclitaxelkonzentration 1/10 c_{max}). Einsatz Herceptin sowie der Kombination von Herceptin mit unterschiedlichen Konzentrationen von Paclitaxel im CV-Test mit Inkubationszeiten von 1 bis 3 Tagen (B). 1/10 der maximalen Serumkonzentration von Paclitaxel ist als 1/10 c_{max} hervorgehoben. Für unterschiedliche Inkubationszeiten wurden im CV-Test unterschiedliche Zellzahlen eingesetzt.

Die Zelllinie MCF7 erwies sich im CV-Test als sensitiv gegenüber Paclitaxel. Die Zugabe von Herceptin führte bei keiner der getesteten Konzentrationen von Paclitaxel und nach keiner untersuchten Inkubationszeit zu einen zusätzlichen inhibierenden Effekt (Abb. 28 B). Bei Messungen im Cytosensor zeigte Herceptin ebenfalls keinen zusätzlichen inhibierenden Effekt auf MCF7-Zellen, während Paclitaxel einen geringen Effekt zeigte. Während das Ergebnis für Herceptin mit dem Ergebnis des CV-Tests übereinstimmt, differiert das Ergebnis bezüglich Paclitaxel zwischen den Tests.

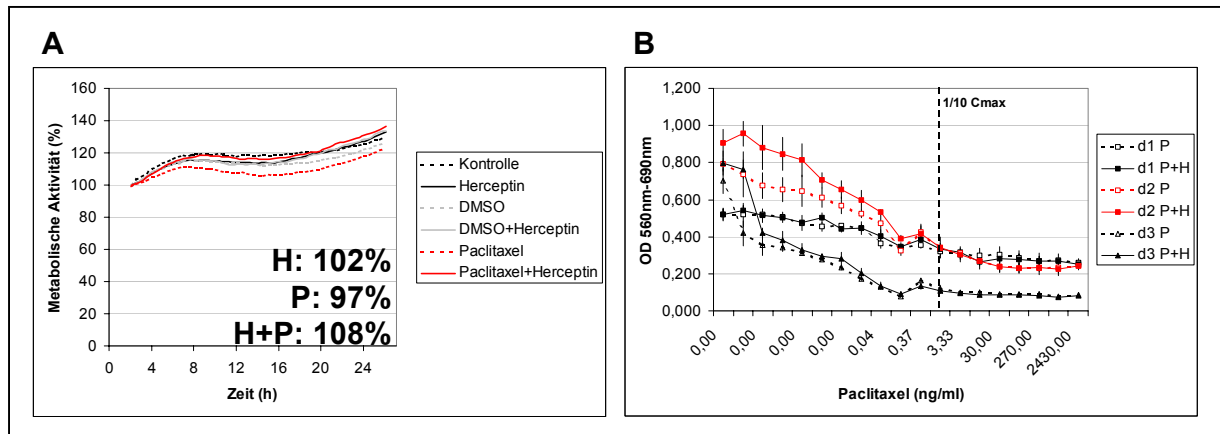


Abbildung 28: Sensitivitätstestung von MCF7-Zellen gegenüber Paclitaxel und Herceptin im ChemoSelect®-Test (A) und im CV-Test (B). Darstellung der metabolischen Aktivität behandelter und unbehandelter Zellen in Prozent ihrer Anfangsaktivität, gemessen im Cytosensor (A). Die hervorgehobenen Prozentzahlen geben die Restaktivität nach 24 h Inkubation mit Herceptin (H), Paclitaxel (P) und Herceptin + Paclitaxel (H + P) relativ zur entsprechenden Kontrolle wieder (Herceptinkonzentration: 4 µg/ml, Paclitaxelkonzentration 1/10 c_{max}). Einsatz Herceptin sowie der Kombination von Herceptin mit unterschiedlichen Konzentrationen von Paclitaxel im CV-Test mit Inkubationszeiten von 1 bis 3 Tagen (B). 1/10 der maximalen Serumkonzentration von Paclitaxel ist als 1/10 c_{max} hervorgehoben. Für unterschiedliche Inkubationszeiten wurden im CV-Test unterschiedliche Zellzahlen eingesetzt.

Tabelle 9 fasst die Restaktivitäten der drei Zelllinien, die mit Herceptin, Paclitaxel und der Kombination aus beidem behandelt und im Cytosensor gemessen wurden, zusammen. Dabei wird deutlich, dass beide Zelllinien, die sich durch eine Überexpression des Her2/neu Rezeptors auszeichnen, durch Herceptin inhibiert werden. Diese Inhibition wird sowohl bei der alleinigen Gabe von Herceptin deutlich, als auch bei der Kombination mit Paclitaxel. Die Zelllinie MCF7, die keine Überexpression zeigt, wird dagegen durch Herceptin leicht stimuliert.

Zelllinie	Her2/neu Status (IHC)	Herceptin	Paclitaxel	Paclitaxel + Herceptin
SK-BR-3	3+	91%	76%	69%
BT-474	3+	93%	99%	83%
MCF7	1+	102%	97%	108%

Tabelle 9: Übersicht über Ergebnisse zur kombinatorischen Wirkung von Herceptin + Paclitaxel, gemessen im Cytosensor: Metabolische Restaktivitäten der Modellzelllinien nach 24 h Inkubation mit entsprechenden Therapeutika. Die Prozentzahlen geben die Restaktivität nach 24 h Inkubation mit Herceptin, Paclitaxel und Herceptin + Paclitaxel relativ zur entsprechenden Kontrolle wieder (Herceptinkonzentration: 4 µg/ml, Paclitaxelkonzentration 1/10 c_{max}).

6 Diskussion

Die Diskussion beschäftigt sich im ersten Teil als Schwerpunkt mit der Optimierung des ChemoSelect®-Tests. Im zweiten Teil ist der Fokus auf den Herceptin-Test gerichtet. Abschließend wird in einem Ausblick eine Bewertung des in der vorliegenden Arbeit Erreichten dargestellt.

6.1 Der ChemoSelect®-Test

Im Rahmen der Krebstherapie spielt die medikamentöse Therapie als systemische Behandlungsform eine große Rolle. Besondere Bedeutung kommt dabei der Chemotherapie zu. Die Pharmaindustrie arbeitet seit langem daran, neue und verbesserte Wirkstoffe zu entwickeln. Als Nebeneffekt dieser Aktivität ist die Wahl passender Therapeutika immer schwieriger geworden. Um diese Wahl nicht wie heute empirisch treffen zu müssen, sondern an patientenindividuellen Anforderungen auszurichten, wird seit den 70er Jahren versucht, eine Methode zu entwickeln, mit der vor einer Therapie untersucht werden kann, welche Therapeutika eine Wirkung auf den individuellen Tumor zeigen und somit in der Therapie einzusetzen sind (Hamburger und Salmon, 1977). Obwohl die Untersuchungen der letzten 25 Jahre den Bedarf an einem Chemosensitivitätstest untermauern, konnte bis heute für keine der verwendeten Methoden zweifelsfrei gezeigt werden, dass sich diese Art von Test für eine Anwendung in der klinischen Routine eignet und zu einer Verbesserung der Prognose für Krebspatienten führt (Cortazar und Johnson, 1999).

Für einen Chemosensitivitätstest müssen grundsätzlich zwei Bedingungen erfüllt sein, um die Fragestellung des individuellen Ansprechens befriedigend beantworten zu können. Erstens muss ein solcher Test eine hohe Vorhersagekraft haben. Diese ist jedoch nur von Nutzen, wenn zweitens Ergebnisse auch für einen Großteil der Untersuchungen erhältlich sind. Gerade an der mangelnden Durchführbarkeit bzw. einer hohen Ausfallrate kranken die meisten verfügbaren Verfahren zur Chemosensitivitätstestung.

1995 entwickelten Wissenschaftler der Firma CellControl einen Chemosensitivitätstest, der die Ansäuerungsfähigkeit von Tumorzellen dazu

verwendet, eine Aussage über ein Ansprechen dieser Zellen auf Chemotherapeutika zu treffen. Dieser Test ist seit 1998 als ChemoSelect[®]-Test kommerziell erhältlich. In frühen klinischen Fallstudien zeigte sich, dass dieses Verfahren eine gute Vorhersagekraft aufweist, wobei jedoch eine hohe Ausfallrate in Kauf genommen werden musste (Thuro, 2001).

Im Jahre 2001 wurde in der Firma ein wissenschaftliches Programm aufgesetzt, das die für einen Chemosensitivitätstest wichtigen Themengebiete Durchführbarkeit und Vorhersagekraft adressieren sollte. Um die Durchführbarkeit zu verbessern, sollten im Rahmen biologischer Grundlagenforschung die Anforderungen des Testverfahrens untersucht und Parameter an diese angepasst werden. In einem weiteren Projekt sollte das für diese Untersuchungen verwendete Cytosensor Mikrophysiometer überarbeitet und miniaturisiert werden. Beide Projekte zusammen sollten positiven Einfluss auf die Durchführbarkeit des Tests nehmen. Experimente zur Biologie des Testverfahrens sollten zusätzlich dazu dienen, die Vorhersagekraft des Tests zu verbessern. Mit diesen Untersuchungen sollte eine neue Version des Tests entwickelt werden, die einer anschließenden klinischen Validierung standhalten kann. Die vorliegende Arbeit befasst sich als Hauptschwerpunkt mit einem Teil der durchgeführten biologischen Grundlagenuntersuchungen. Das Projekt der Überarbeitung des Messgerätes wurde parallel zu dieser Arbeit begonnen, während sich die klinische Validierung an diese Arbeit anschließen soll.

6.1.1 Medium

Beim ChemoSelect[®]-Test werden Zellen in einem Wachstumsmedium untersucht und mit Chemotherapeutika in Kontakt gebracht. Nach dem ursprünglichen Protokoll für den ChemoSelect[®]-Test wurde ein komplexes Medium (RUN) verwendet. Dieses Medium basiert auf dem Rezept von RPMI 1640, wobei der Karbonatpuffer fehlt, um die Sensitivität des Testsystems zu erhöhen. In klinischen Fallbeispielen zeigte sich, dass die Vorhersagekraft des Tests besonders in bezug auf das Aufzeigen von Sensitivitäten hoch war. Wenn also im Test eine Sensitivität gefunden wurde, so korrelierte diese in den meisten Fällen auch mit einem Ansprechen im Patienten. Wurde im Test eine Resistenz gefunden, so war die Korrelation geringerer. Es wurden somit zu viele Resistenzen detektiert. Den Untersuchungen lag die

Hypothese zugrunde, dass sich durch eine Optimierung des Mediums mehr Sensitivitäten aufzeigen lassen, und auf diese Weise die Aussage des Tests bezüglich der Vorhersage von Resistenzen vergrößert werden kann.

An das Medium werden unterschiedliche Anforderungen gestellt. Eine grundsätzliche Anforderung, die für jede Art von Chemosensitivitätstest gilt, ist die Eigenschaft des Mediums, eingebrachte Zellen *in vitro* zu Wachstum und Teilung anzuhalten. Die Teilung ist notwendig, da die meisten Chemotherapeutika nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus wirken, und eine Wirkung somit nur auf sich teilende Zellen erfolgen kann. Eine zusätzliche, spezifische Anforderung für den Test im Cytosensor ist eine niedrige Pufferkapazität des Mediums. Diese ist wichtig, da die Pufferkapazität in einer negativen Korrelation zur gemessenen Ansäuerungsrate steht.

Beim Vergleich unterschiedlicher Medien zeigte sich, dass ein komplexes Zellkulturmedium, das mit 10% Serum ergänzt wurde, die beste Grundlage für die generellen Anforderungen bot (Kapitel 5.1.1). Ohne FCS sorgte das Medium im Gegensatz zu einer Salzlösung dafür, dass die Ansäuerungsrate in einem Referenzexperiment über den Zeitraum des Experiments kaum absank. Die Zugabe von FCS führte zu einem klaren Anstieg dieser Rate über die Zeit und bewirkte eine deutliche Erhöhung des Anteils an sich teilenden Zellen. Erst in diesem Medium konnte im Modellsystem (Kolontumorzelllinie HCT 116 mit Oxaliplatin behandelt) ein deutlicher inhibierender Effekt aufgezeigt werden, während dieser Effekt in anderen Medien aufgrund des geringen Wachstums teilweise verdeckt wurde. Diese Erkenntnisse bestätigten, dass im ursprünglich für den ChemoSelect[®]-Test verwendeten Medium, RUN, Effekte von Chemotherapeutika nicht optimal nachgewiesen werden können, da sich nur wenige Zellen unter diesen Bedingungen teilen und die Wirkung einiger Substanzen somit verhindert wird.

Neben der Zugabe von FCS wurde das Medium darüber hinaus speziell für den Gebrauch in diesem Testsystem optimiert. Als Grundmedium wurde dabei DMEM/F12 gewählt, das als besonders reichhaltiges Medium gilt und in dem eine Vielzahl humaner Tumorzellen kultiviert werden kann. Abwandlungen erfolgten, indem einerseits der Phosphatpuffer auf ein vertretbares Minimum von 0,1 mM reduziert, sowie andererseits die Glukosekonzentration auf 5 g/l erhöht wurde (Kapitel 5.2).

Die Wahl einer eher hohen Glukosekonzentration hatte neben einem geringen positiven Effekt auf die Ansäuerungsrate einen weiteren Grund, der für die klinische

Relevanz eines Chemosensitivitätstests von Bedeutung ist: Da Tumorproben mehr oder weniger von Normalzellen durchsetzt sein können, besteht die Gefahr, dass das Messergebnis von Artefakten geprägt ist und keine Aussage über das Ansprechen der eigentlichen Tumorzellen zulässt. Obwohl zur Lösung dieses Problems maßgeblich der operierende Arzt gefragt ist, der den Tumor möglichst definiert entnehmen muss, soll dieser Gefahr zusätzlich mit einer höheren Glukosekonzentration begegnet werden. Es ist bekannt, dass Tumorzellen dazu neigen, Glukose auch unter aeroben Bedingungen mit einer hohen Rate in Laktat umzuwandeln (Warburg, 1956a), (Warburg, 1956b). Dieser Effekt wurde als Warburg-Effekt bekannt. Die rasche Umsetzung von Glukose in Laktat äußert sich in einer hohen Ansäuerungsrate, da aus jedem gebildeten ATP-Molekül mehr Protonen resultieren, als bei der Energiegewinnung über den Zitronensäurezyklus. In dieser Eigenschaft unterscheiden sich Tumorzellen von Normalzellen (Dills, 1993). Ziel dieser Anpassung war also, den Einfluss von Normalzellen auf die Messung zu minimieren. Eine weitere Maßnahme gegen die Gefahr des Normalzelleinflusses, die speziell im Cytosensor zum Tragen kommt, ist die Tatsache, dass die Zellen in Agarose eingebettet werden, bevor sie in die Messkammer eingesetzt werden. Durch diese Maßnahme wird zumindest der Einfluss von Fibroblasten begrenzt. Fibroblasten bilden einen Großteil der in Tumorproben enthaltenen Normalzellen. Von ihnen ist bekannt, dass sie nicht gut in Agarose wachsen (Koechli et al., 1994). In Versuchen außerhalb der vorliegenden Arbeit konnte für zusätzliche Kohlenstoffquellen (Fettsäuren, Pyruvat) kein positiver Effekt auf die Messung gefunden werden (Daten nicht dargestellt). Aufgrund dieser Versuche wurde entschieden, dem neuen Medium keine Fettsäuren und Pyruvat zuzusetzen, um eine gewisse zusätzliche Selektivität der Förderung des Wachstums von Tumorzellen zu erreichen. Zusammen mit diesen Erkenntnissen wurde das optimierte Medium formuliert und, als SeleX Medium bezeichnet, zum Patent eingereicht (Babarina et al., 2003).

Die Verwendung von Serum in einem diagnostischen Test birgt die Gefahr der Inkonsistenz. FCS ist ein sehr inhomogener Stoff, der sich von Charge zu Charge maßgeblich unterscheiden kann. Die Gefahr liegt dabei darin, dass sich Ergebnisse von Versuchen, die mit unterschiedlichen FCS Chargen durchgeführt wurden, deutlich unterscheiden können, wodurch die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Messergebnisse negativ beeinflusst werden kann. Um solche Effekte zu

minimieren, wurden von einigen Herstellern Serumersatzstoffe entwickelt, die es ermöglichen sollen, essentielle Effekte von FCS in der Zellkultivierung mit einer hohen Produkthomogenität zu vereinen. Zwei solche Produkte wurden im ChemoSelect[®]-Test mit FCS verglichen. Das erste, Panexin (PAN), ist eine aus verschiedenen Wachstumsfaktoren zusammengestellte synthetische Mischung. SeraPlus (PAN) hingegen ist eine Form von Serum, die nach chromatographischer Auftrennung in verschiedene Fraktionen und einer folgenden Zusammenfügung in definierten Anteilen für eine höhere Homogenität sorgen soll als FCS.

Versuche im Cytosensor zeigten, dass keiner der untersuchten Ersatzstoffe eine gleichwertige Alternative zu FCS darstellt (Kapitel 5.2.3.2). Beide Substanzen bedingten ein im Vergleich zu FCS geringeres Wachstum der Zellen und damit verbunden auch einen verminderten gemessenen zytostatischen Effekt im Referenzexperiment. Zusammen mit der Tatsache, dass Serumersatzstoffe deutlich teurer sind als FCS, wurde aufgrund dieser Erkenntnisse beschlossen, weiterhin FCS zu verwenden.

Die angesprochenen Probleme treten jeweils bei einem Wechsel der verwendeten FCS-Charge auf. Um häufige Wechsel zu vermeiden, sollte es generell angestrebt werden, möglichst große Chargen abzunehmen bzw. zu reservieren. Um Variationen, die mit einem solchen Wechsel einhergehen, klein zu halten, wurde ein Verfahren entwickelt, mit welchem unterschiedliche FCS-Chargen miteinander verglichen werden können (Kapitel 5.2.3.3). In diesem Verfahren wurden zehn Zelllinien im CV-Test mit acht verschiedenen Chemotherapeutika auf Sensitivität hin untersucht. In einer nachfolgenden, semiquantitativen Bewertung wurde die Charge ausgewählt, bei der in den meisten Fällen ähnliche Sensitivitäten und Resistenzen beobachtet wurden wie mit der ursprünglichen Charge. Diese Charge wurde anschließend in einem Referenzexperiment im Cytosensor mit der ursprünglichen Charge verglichen, um aufzuzeigen, ob sie auch bezüglich des Verlaufs der metabolischen Aktivitäten vergleichbar ist. Mit Hilfe dieses Verfahrens wurde für zukünftige Experimente eine Charge ausgewählt und reserviert, die gut mit der Ursprungscharge vergleichbar ist. Diese Charge sollte bis zum Abschluss der ersten geplanten Validierungsstudie zur Verfügung stehen (Kapitel 6.1.5).

6.1.2 Reproduzierbarkeit

Wichtig für einen diagnostischen Test ist es weiter, dass Ergebnisse der Messungen reproduzierbar sind und keine systematischen Fehler aufweisen. Die wiederholte Durchführung eines Referenzexperiments auf unterschiedlichen Messgeräten und an verschiedenen Tagen zeigte, dass die Variationen der Ergebnisse in einer gut vertretbaren Größenordnung liegen (Kapitel 5.1.2). Dabei zeigte sich, dass die Variation der Ergebnisse verschiedener Messgeräte denen verschiedener Messtage sehr ähnlich war. Ein systematischer Messfehler konnte somit ausgeschlossen werden. Im Rahmen der Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit zeigte sich jedoch auch, dass das Testsystem äußerst sensibel ist. Bestimmte Variationen in der Zellkultur führten dazu, dass bei sonst identischen Testbedingungen Ergebnisse teilweise von einander abwichen. Es wurde aufgezeigt, dass die Konfluenz in der verwendeten Kulturflasche einen maßgeblichen Einfluss auf den Test hat. Bei Zellen aus wenig konfluenten Kulturflaschen zeigte sich ein nur geringer Anstieg der metabolischen Aktivität über die Zeit. Um einen zytostatischen Effekt nachweisen zu können, erwies es sich in diesem Referenzexperiment jedoch als wichtig, dass die unbehandelten Kontrollzellen im Test stark proliferieren. Durch eine hohe Konstanz aller Variablen der Zellkultur, insbesondere der Zahl der Zellen in der für den Versuch verwendeten Kulturflasche, konnte eine hohe Reproduzierbarkeit der Testergebnisse erzielt werden.

Die Untersuchung frisch entnommener, primärer Tumorzellen erfolgt in der Regel innerhalb eines Versuchsaufbaus an einem Tag. Nachdem das Tumorgewebe in das Labor transportiert wurde, werden alle Zellen bis zum Einsetzen in das Messgerät identisch behandelt, wobei hervorzuheben ist, dass die Zellen vorher nicht kultiviert werden. In das Messgerät werden alle Messkanäle mit statistisch gleichen Zellpopulationen bestückt. Die Variation in Folge unterschiedlicher Kulturbedingungen vor der Messung dürfte somit bei Untersuchungen von Primärtumoren nicht die gleiche Bedeutung haben, wie bei Zelllinien. Sollten mit diesen Zellen Messungen an verschiedenen Versuchstagen erfolgen, so wäre dieser Aspekt jedoch zu beachten.

Dennoch birgt der Transport des Tumorgewebes die Gefahr, dass es aufgrund unterschiedlicher Transportbedingungen zu einer negativen Beeinflussung der

Vergleichbarkeit der Ergebnisse kommt. In einem Projekt außerhalb der vorliegenden Arbeit wird dieser Fragestellung nachgegangen. Dabei werden vor allem die Faktoren Temperatur, Transportmedium sowie Transportdauer untersucht. Frühe Experimente mit Zelllinien zeigten, dass sich zwar die metabolische Aktivität der Zellen durch unterschiedliche Transportbedingungen beeinflussen lässt, die Chemosensitivität bleibt jedoch die gleiche. Um vor Abschluss dieser Experimente das Risiko der Verfälschung durch die Transportbedingungen zu minimieren, wird für alle untersuchten Tumorproben ein einheitliches Transportverfahren verwendet. Dieses zeichnet sich durch ein einheitliches Medium und eine einheitliche Dauer aus. Zusätzlich wird mit Hilfe einer dicken Styroporisolation versucht, die Temperatur konstant zu halten. Auf diese Weise können zumindest die drei wesentlichen Faktoren Dauer, Medium und Temperatur können auf diese Weise relativ konstant gehalten werden.

Mit dem Ausschluss einer unterschiedlichen Behandlung der Zellen vor der eigentlichen Messung konnte mit Hilfe von Zelllinien in einem Referenzexperiment eine hohe Reproduzierbarkeit des Testsystems aufgezeigt werden.

6.1.3 Verlässlichkeit

Untersuchungen zur Verlässlichkeit des Testverfahrens sollten Aufschluss darüber geben, ob die Ansäuerungsrate eine sinnvolle Messgröße ist, um die Chemosensitivität von Tumorzellen aufzuzeigen. Um zu untersuchen, ob die Ansäuerungsrate mit der Proliferation der Zellen korreliert, wurden parallel zum ChemoSelect[®]-Test zwei Proliferationstests durchgeführt (Kapitel 5.1.4). Der Kristallviolett-Test (CV-Test) ist ein einfacher Test, in welchem mit Hilfe einer unspezifischen Proteinfärbung die Menge an Gesamtprotein quantifiziert wird. In diesem Test werden adhärente Zellen in Mikrotiterplatten kultiviert, je nach Fragestellung behandelt und nach einer gewissen Inkubationszeit die Menge an Gesamtprotein quantifiziert. Da sich apoptotische und nekrotische Zellen durch eine reduzierte Adhäsion auszeichnen, werden diese in einem folgenden Waschschritt entfernt, während lebende Zellen zurück bleiben. Auf diese Weise lässt sich eine Aussage bezüglich einer Zytotoxizität treffen (Kramer und Carver, 1986). Der zweite Proliferationstest, der MTS-Test, ist eine Abwandlung des MTT-Tests und

quantifiziert die durch Dehydrogenasen bewirkte Umsetzung der Tetrazoliumkomponente MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazoliumsalz) in ein Formazansalz. Die Aktivität dieser Dehydrogenasen ist von der Stoffwechselaktivität der Zellen abhängig und wird durch eine colorimetrische Messung des farbigen Produkts quantifiziert.

Die Wirkung dreier unterschiedlicher Chemotherapeutika (Cisplatin, Gemcitabin und Oxaliplatin) auf SW620 Zellen wurde parallel mit diesen beiden Verfahren sowie dem ChemoSelect[®]-Test jeweils nach 24 h und 72 h Inkubation bestimmt. Trotz unterschiedlicher Messparameter ergaben alle drei Testverfahren eine hohe Vergleichbarkeit. Alle drei Chemotherapeutika zeigten eine Wirkung auf SW620 Zellen, wobei der Effekt nach 72 h einheitlich stärker war als nach 24 h. Die deutlichsten Unterschiede zwischen den Ergebnissen der verglichenen Methoden ergaben sich für Cisplatin, ein Therapeutikum, das für besonders toxische Nebeneffekte bekannt ist (Sasaki et al., 1989). Während mit allen Methoden eine Sensitivität gegenüber Cisplatin gefunden wurde, war das Ausmaß der Wirkung bei der Messung im Cytosensor etwas größer als in den anderen Tests festgestellt. Die Übereinstimmung der Ergebnisse bezüglich Gemcitabin und Oxaliplatin war größer. Bei analogen Experimenten mit einer zweiten Zelllinie, HCT 116, konnte die gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse der drei untersuchten Testverfahren bestätigt werden.

Die meisten Chemosensitivitätstests messen Effekte von Chemotherapeutika mit Inkubationszeiten von mehreren Tagen. Nach dieser Zeit sind Effekte deutlich sichtbar und mit Hilfe der verwendeten Endpunktbestimmung auch erkennbar. Die Messung mit dem Cytosensor hat durch die kontinuierliche und nicht zeitversetzte Datenerfassung den Vorteil, dass Daten zu jedem beliebigen Zeitpunkt berechnet und bereits während der Messung eingesehen werden können. Auf diese Weise können Trends von Wirkungen so früh wie möglich detektiert werden. Eine kurze Messzeit hat neben einer höheren Praktikabilität den Vorteil, dass Zellselektions- und Zelldifferenzierungsprozesse innerhalb des Testaufbaus nur begrenzt stattfinden können. Mit zunehmender Zeit steigt die Gefahr, dass Normalzellen präferentiell wachsen und dass sich Tumorzellen differenzieren. Zusätzlich bietet ein Test mit kurzer Inkubationszeit die Möglichkeit, schwierig zu kultivierende Zellen zu untersuchen. Solche Zellen lassen sich in Testverfahren mit langen Kulturperioden

nicht untersuchen. Besonders Zellen aus Gastro-Intestinal- oder Hals-Nasen-Ohren-Tumoren lassen sich nach der Entnahme nur begrenzt kultivieren und sterben bereits nach kurzer Zeit ab. Eine kurze Messung bietet die Möglichkeit, die *in vitro* schnell nachlassende Restaktivität solcher Zellen zu nutzen, und auch mit solchen Zellen Chemosensitivitätsbestimmungen durchzuführen.

Für einen breit einsetzbaren Chemosensitivitätstest ist es notwendig, dass Wirkungen von Chemotherapeutika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen gemessen werden können. Auf grundlegenden Versuchen aufbauend, wurden in dem bereits optimierten Testmedium (SeleX) ausgedehnte Versuche durchgeführt, bei denen beispielhaft ausgewählte Chemotherapeutika der wichtigsten Wirkstoffgruppen untersucht wurden (Kapitel 5.4). Unterschiedliche Zelllinien verschiedener Tumorentitäten wurden hierzu herangezogen, wobei die praktisch vollzogene, klinische Applikation der Therapeutika auf spezifische Tumorentitäten keine Rolle spielte. Im Cytosensor wurde jeweils die maximale Konzentration eingesetzt, die in Patienten während der Therapie zu beobachten ist (maximale Serumkonzentration, c_{\max}). Im CV-Test hingegen wurde eine Dosis-Eskalation durchgeführt, um aufzuzeigen, ob c_{\max} in einem Bereich liegt, in welchem einerseits eine Wirkung festzustellen ist, diese Wirkung andererseits aber auch spezifisch ist. Eine Wirkung wurde dann als spezifisch definiert, wenn mindestens eine Zelllinie gefunden wurde, bei der keine Wirkung beobachtet werden konnte. Außerhalb dieser Arbeit werden weitere Chemotherapeutika untersucht, sodass für jedes zu testende Chemotherapeutikum Informationen darüber vorliegen werden, in wie weit sie im ChemoSelect[®]-Test zu messen sind.

Für alle exemplarisch aus verschiedenen Wirkstoffklassen gewählten Chemotherapeutika konnte jeweils mindestens eine Zelllinie identifiziert werden, die sich bei eingesetzter Konzentration (c_{\max}) im ChemoSelect[®]-Test als sensitiv gegenüber dem Chemotherapeutikum erwies. Ebenso fand sich eine andere Zelllinie, die bei diesen Bedingungen eine Resistenz zeigte. In allen Fällen stimmten die Ergebnisse der beiden Testverfahren überein. Als Grenzwert wurde für die Einteilung als sensitiv bzw. resistent für den ChemoSelect[®]-Test ein Wert von ca. 90% Aktivität der entsprechenden Kontrolle gewählt, während dieser für den CV-Test bei ca. 85% lag. Die Werte im ChemoSelect[®]-Test reichten in diesem Versuchsteil von 37-79% für Sensitivitäten und 94-105% für Resistenzen. Im CV-Test lagen die Sensitivitäten zwischen 54 und 68% und die Resistenzen zwischen 87 und 112%. Eine genaue

Definition des Grenzwertes erfordert eine klinische Korrelationsstudie. Im Rahmen einer solchen Studie kann der Grenzwert verschoben werden und die Ergebnisse können so bei verschiedenen Bedingungen korreliert werden. Der Grenzwert, bei dem die beste Korrelation erzielt wird, sollte dann zukünftig herangezogen werden.

Potentiell sind mit dem Testverfahren zwei unterschiedliche Aussagen zu treffen. Zunächst kann eine qualitative Aussage getroffen werden, die aussagt, ob eine Wirkung eintritt, oder nicht. Eine Therapieentscheidung kann an eine solche Aussage gekoppelt werden und würde dazu führen, dass nur wirksame Therapien beim Patienten zum Einsatz kommen. Es ist zu erwarten, dass in einigen Fällen mehr als eine Therapie *in vitro* wirksam ist. Um aus mehreren wirksamen Therapien die optimale Therapie herauszufinden, wäre es notwendig, eine qualitative Aussage zu treffen. Erst mit dieser kann schließlich die Frage nach der optimalen Therapie beantwortet werden. Gerade die quantitative Aussage stellt eine große Herausforderung für das Testverfahren dar. Dabei ist es von Bedeutung, den Grenzwert im Testverfahren für jedes Therapeutikum zu definieren. Die dargestellten Messkurven der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Therapeutika deuten an, dass Wirkungen im ChemoSelect[®]-Test unterschiedlich schnell und stark ausfallen können. Im Rahmen einer klinischen Validierung ist zu überprüfen, ab welchem Restaktivitätswert im Test eine Wirkung im Patienten eintritt. Dabei ist es vorstellbar, dass dieser Grenzwert für die unterschiedlichen Therapeutika nicht einheitlich ist. Erst eine klinische Studie kann darüber Aufschluss geben, ob sich mit diesem Test eine solche quantitative Aussage über eine Wirkung machen lässt. Während klinische Daten von Fallbeispielen der Vergangenheit andeuten, dass die qualitative Aussage mit diesem Test gemacht werden kann, gibt es zur quantitativen Aussage noch keine Erfahrungswerte.

Es konnte gezeigt werden, dass Ergebnisse des ChemoSelect[®]-Tests mit denen des CV-Tests vergleichbar sind. Die Konzentration c_{max} erwies sich als geeignet, um bei Zelllinien *in vitro* zwischen Sensitivitäten und Resistenzen zu unterscheiden.

6.1.4 Anwendbarkeit

Eine grundsätzliche Limitation des Einsatzes von Chemosensitivitätstests ist durch das begrenzte Tumorgewebe gegeben, das für derartige Untersuchungen verfügbar

ist. Unterschiedliche Zellmaterialien, die sich sowohl in der Größe des operativ entfernten Gewebes als auch in der durchschnittlich darin enthaltenen Zellzahl unterscheiden, können für einen solchen Test verwendet werden. Der ChemoSelect[®]-Test eignet sich prinzipiell für die Untersuchung zur Chemosensitivität jeder Art von Krebs. Aufgrund der Problematik des Normalzelleinflusses, welche besonders bei Hämoblastosen die Gefahr der Verfälschung der Ergebnisse birgt, wurde die Anwendung des Tests bisher auf solide Tumoren beschränkt. Als Untersuchungsmaterial können dabei Primärtumoren, Metastasen, Gewebeflüssigkeiten (Ascites, Pleuralfüssigkeit) oder Biopsieproben verwendet werden. Obwohl es Erfahrungswerte über die in unterschiedlichen Tumorarten enthaltene Zellzahl gibt, lässt sich nicht generell sagen, wie groß ein Gewebestück sein muss, um auf Chemosensitivität hin untersucht zu werden. Erfahrungswerte belegen, dass sich beispielsweise aus Eierstockkarzinomen eine große Zellzahl pro Volumen isolieren lässt, während dies bei Kolorektal- oder Brustkarzinomen nicht gegeben ist. In einem Vergleich der Zellzahlen von Ovarialkarzinomen und Kolorektalkarzinomen zeigte sich, dass, obwohl die Gewebemenge ähnlich war, im Ovarialkarzinom durchschnittlich fünfmal so viele Zellen enthalten sind, wie in Kolorektalkarzinomen (Kapitel 5.3). Verschiedene Tumorentitäten eignen sich somit unterschiedlich gut für die Chemosensitivitätstestung. Zu dem grundsätzlichen Problem der Gewebemenge kommt, dass es im Rahmen einer Tumoroperation üblich ist, dass ein Teil des Gewebes für die Pathologie zur Verfügung gestellt wird. Der prätherapeutische Test konkurriert somit mit etablierten diagnostischen Maßnahmen, die jedoch in der Regel mit sehr kleinen Gewebeteilen auskommen. Bei geringer Zellzahl muss der Test auf wenige zu untersuchende Substanzen reduziert werden, was die Aussagekraft entsprechend einschränkt.

Aus diesen Gründen gibt es die Bestrebung, die für den Chemosensitivitätstest benötigte Zellzahl zu verringern. Eine solche Verringerung könnte den Einsatzbereich des Tests maßgeblich vergrößern, wenn beispielsweise eine Zellzahl ausreichen würde, die aus Feinnadelbiopsieproben gewonnen werden kann.

Mit zunächst für die Modellzelllinie HCT 116 durchgeführten Experimenten sollte zum einen der Einfluss der Zellzahl auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse untersucht und zum anderen die Mindestzellzahl herausgefunden werden, mit der eine Messung durchgeführt werden kann (Kapitel 5.1.3). Für die Zelllinie HCT 116 konnte ein Bereich von 10.000 bis 100.000 Zellen pro Messkanal als geeignet definiert werden.

In diesem Bereich waren Messungen durchführbar und die Testergebnisse auswertbar und vergleichbar. Bei 5.000 Zellen pro Kanal zeichnete sich ab, dass die gemessene Ansäuerungsrate zu klein wurde und einen relativ großen Messfehler verursachte. Für eine zweite getestete Zelllinie, SW620, konnte der gleiche Bereich als geeignet definiert werden. Bei der zugrundegelegten Vierfachbestimmung werden pro untersuchter Bedingung mindestens 40.000 Zellen benötigt, wobei dieser Wert mit dem ursprünglichen Medium (RUN) erzielt wurde. Experimente außerhalb dieser Arbeit deuteten darauf hin, dass mit dem optimierten Medium (SeleX) für das Modellsystem HCT 116 bereits 1.000 Zellen pro Messkanal ausreichen, um eine Messung durchzuführen.

Da sich frisch präparierte Tumorzellen primären Ursprungs deutlich von Zelllinien unterscheiden können, wurden weitere Experimente zur Reduktion der Zellzahl an drei exemplarischen Tumoren (ein Kolorektalkarzinom, zwei Eierstockkarzinome) durchgeführt. Diese Experimente erfolgten bereits im überarbeiteten SeleX Medium (Kapitel 5.3).

Für die Untersuchung primärer Tumorzellen im ChemoSelect[®]-Test wurden nach Metzger et al. (2001) zunächst 125.000 Zellen pro Messkanal eingesetzt. Diese Zellen wurden in einem Agarosetropfen von 10 μ l in die Messkammer eingebracht. Bei Untersuchungen der Messkammer im Rahmen der Neuentwicklung des Testgeräts außerhalb dieser Arbeit zeigte sich jedoch, dass das eigentliche Volumen der Kammer lediglich ca. 2,8 μ l beträgt. Es wird angenommen, dass das überschüssige Volumen beim Einsetzen in das Messgerät aus der Kammer gedrückt wird und für die Messung somit unerheblich ist. Versuche mit eingesetzten 3 μ l ergaben, dass dieses Volumen prinzipiell ausreicht, die Präparation - und dabei speziell das Platzieren des Mikrotropfens in die Kammer - mit diesem geringen Volumen jedoch schwierig ist. Aus diesem Grund wurde für Versuche zur Reduktion der Zellzahl zunächst das eingesetzte Volumen von 10 auf 5 μ l reduziert, was einen Kompromiss zwischen der Reduktion des Volumens und der Handhabbarkeit darstellt. Versuche mit Zellen aus drei primären Tumoren zeigten, dass eine Reduktion der Zellzahl von 125.000 auf 25.000 pro Messkanal keinen negativen Einfluss auf die Messung hat. Die gemessenen Aktivitäten waren hier ausreichend, um eine eindeutige Kurve darzustellen. Bei der Reduktion der Zahl von 125.000 auf 50.000 waren die gemessenen Aktivitäten in keinem Fall niedriger. Das Signal von 25.000 Zellen pro Messkammer war etwas geringer, reichte jedoch aus. Die

Messung von 10.000 Zellen pro Kanal wies dagegen in zwei von drei Fällen starke Schwankungen auf und deutet an, dass diese Zellzahl zu niedrig ist, um mit Sicherheit verlässliche Daten zu generieren. Der Verlauf der Ansäuerungsrate der Zellen, und somit die Reproduzierbarkeit, war im Rahmen der üblichen Schwankung mit Zellzahlen zwischen 25.000 und 125.000 Zellen pro Kanal durchaus vergleichbar. Diese Erkenntnisse haben zur Folge, dass statt der bisher eingesetzten $5 \cdot 10^5$ Zellen pro untersuchter Bedingung lediglich noch $1 \cdot 10^5$ Zellen benötigt würden. Mit dieser um den Faktor 5 reduzierten Zellzahl ist es bereits vorstellbar, große Biopsieproben kompakter Tumoren zu bearbeiten. Für die exemplarisch bezüglich der enthaltenen Zellzahl untersuchten Ovarial- und Kolorektalkarzinome bedeutet diese Reduktion einen gewaltigen Fortschritt. Beim Ovarialkarzinom erhöht sich die Zahl der testbaren Bedingungen von durchschnittlich 9,2 auf 46, bei letzterem gar von 1,6 auf 8. Gerade hier wird deutlich, dass erst durch die Reduktion der Zellzahl eine sinnvolle Chemosensitivitätstestung mit mehreren Versuchsbedingungen möglich ist.

Zusätzlich zu Untersuchungen zur Optimierung des Verfahrens und der geplanten klinischen Validierung soll das dem ChemoSelect[®]-Test zugrunde liegende Cytosensor Mikrophysiometer überarbeitet werden und eine neue Gerätegeneration für diese Art von Test entwickelt werden. Dabei steht neben einer teilautomatisierten Handhabung besonders eine Erhöhung der Sensitivität im Vordergrund. Eine weitere Reduktion der eingesetzten Zellzahl scheint möglich, wenn im Rahmen der Entwicklung des neuen Messgerätes eine Miniaturisierung der Kammer erreicht und der Messchip sensitiver gemacht werden kann.

6.1.5 Ausblick: Klinische Validierung

Die dargestellten Daten deuten darauf hin, dass das vorgestellte *in vitro* Testsystem in der Lage ist, die Proliferation von Tumorzellen zu messen und Chemosensitivitäten aufzuzeigen. Wie jedoch an unterschiedlichen Stellen bereits angedeutet, wird sich letztlich erst durch eine klinische Validierung zeigen, wie hoch die Vorhersagekraft und damit verbunden der Wert des Tests ist. Im Rahmen einer solchen Studie kann auch der Grenzwert genau definiert werden, ab welchem ein Testergebnis ein Ansprechen bzw. ein Nicht-Ansprechen eines Tumors auf Chemotherapiebehandlung repräsentiert.

Um eine solide, aber dennoch einfache Validierung zu ermöglichen, entstand ein Konzept für eine klinische Studie, das aus verschiedenen Elementen zusammengesetzt ist, die aufeinander aufbauen. Zunächst soll eine Korrelationsstudie durchgeführt werden, die ausschließlich zur Beobachtung dienen soll und keinen Einfluss in die Therapieentscheidung nimmt. In dieser Studie werden Patienten nach einem Schema behandelt, das sich im klinischen Alltag bei der Behandlung dieser speziellen Tumorerkrankung als Standard etabliert hat. Parallel zu dieser Behandlung, deren Erfolg beobachtet wird, werden operativ entfernte Tumoren im ChemoSelect[®]-Test auf ihre Sensitivität gegenüber den eingesetzten Substanzen untersucht. Nach einem gewissen Beobachtungszeitraum werden Ansprechraten auf die Therapie erhoben und mit *in vitro* Chemosensitivitätsdaten korreliert. Eine Einteilung erfolgt nach den Kategorien richtig positiv, falsch positiv, richtig negativ und falsch negativ. Dieses Vierfelderdiagramm lässt schließlich eine Aussage über die Vorhersagekraft des Tests zu, die sich in eine Vorhersagekraft bezüglich Sensitivitäten und Resistenzen, sowie eine Gesamtvorhersagekraft unterteilen lässt. Zusätzlich kann die Rate der Auswertbarkeit der Testergebnisse erhoben werden.

Aus praktischen Gründen wurde für diese Studie eine Tumorentität gewählt, die sich aufgrund einiger Charakteristika besonders gut für die Chemosensitivitätstestung eignet. Es handelt sich dabei um den fortgeschrittenen Eierstockkrebs (Ovarialkarzinom). Das Tumorgewebe dieses Karzinoms, das im Rahmen der Therapie operativ entfernt wird, zeichnet sich durch eine große Kompaktheit und Homogenität des Gewebes aus. Die Kompaktheit äußert sich in einem hohen Gehalt an Tumorzellen, was für die Chemosensitivitätsbestimmung mit dem heutigen Test wichtig ist. Diese Zellen lassen sich mit der etablierten Methode einfach aus dem Gewebe herauslösen und zeichnen sich durch ein gutes Wachstum *in vitro* aus. Die Homogenität bezieht sich auf die Durchsetzung des Tumors mit Normalzellen, die bei dieser Krebsart niedrig ist. Potentielle Verfälschungen durch den Einfluss von Normalzellen werden hier also weitgehend ausgeblendet.

Um innerhalb kurzer Zeit eine Aussage bezüglich des Ansprechens der Patientinnen treffen zu können, sollen besonders fortgeschrittene Karzinome untersucht werden. Bei Patientinnen mit solchen Karzinomen ist der Tumor in der Regel nicht mehr vollständig zu entfernen. In Folge wird ein Nicht-Ansprechen auf die Chemotherapie durch das Auswachsen im Körper verbliebener Tumorzellen rasch sichtbar. Das

Ansprechen wird zum einen mit Hilfe klassischer, bildgebender Verfahren verfolgt, zum anderen wird es durch die Aufzeichnung des Tumormarkers CA 125 ergänzt. Dieser Tumormarker ist auf einem Großteil der Ovarialkarzinome und auch im Serum der Patientinnen nachzuweisen und korreliert mit dem Fortschreiten der Erkrankung. Dadurch eignet sich dieses Molekül sehr gut für die Verlaufsbeobachtung beim Ovarialkarzinom (Rustin et al., 2001).

Eine grundsätzliche Validierung des Tests kann durch diese Studie erreicht werden. Eine darüber hinaus gehende Festigung der Aussage bezüglich der Vorhersagekraft des Tests ist möglich, wenn gezeigt werden kann, ob Patienten eine Behandlung nach dem Testergebnis im Vergleich zur Behandlung nach dem Ermessen des Arztes einen Vorteil bietet. Dies ist bei Patienten mit Erkrankungen möglich, für die keine Standardtherapie existiert. Eine entsprechende Studie würde also in den Therapieplan eingreifen und wäre somit entsprechend problematischer durchzusetzen.

Eine Möglichkeit, diese Aussage mit einer einfach durchführbaren Studie zu erreichen bietet das Konzept einer Fallstudie. Eigentlich handelt es sich dabei wiederum um eine Korrelationsstudie, bei der nach dem Ermessen des Arztes behandelt wird. Das Ziel ist es jedoch, die Patientenpopulation ausreichend groß zu definieren, sodass genügend Fälle eingeschlossen sind, in welchen der Arzt zufällig mit dem Chemotherapeutikum behandelt, das sich im Test als wirksam gezeigt hat. Die Ansprechrate dieser Fälle ist dann mit der Ansprechrate aller anderen Fälle zu vergleichen, in denen nicht die Therapie gewählt wurde, die nach dem Testergebnis als optimal anzusehen war. Auf diese Weise lässt sich zeigen, ob der ChemoSelect[®]-Test in der Lage ist, eine Verbesserung des klinischen Ansprechens in der Tumortherapie zu bewirken.

6.2 Herceptin-Test

Seit den 70er Jahren arbeiten Forscher an der Idee, einen diagnostischen Test zu entwickeln, der vor einer Therapie aufzeigen kann, welche Therapeutika für den individuellen Patienten wirksam und somit zu verabreichen sind. Bisher waren diese Bemühungen auf Untersuchungen der Wirkung von Chemotherapeutika beschränkt, da diese das Hauptgebiet der medikamentösen Tumortherapie darstellten.

Entwicklungen der letzten Jahre belegen jedoch, dass zukünftig Krebsmedikamente mit neuartigen, spezifischen Wirkmechanismen eine zunehmend wichtige Rolle spielen werden. Erste Substanzen dieser Generation von Therapeutika werden bereits in der Therapie eingesetzt. Zusätzlich zur Untersuchung der Möglichkeiten des ChemoSelect®-Tests, ein Ansprechen auf Chemotherapien vorherzusagen, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich auch solch neuartige, spezifische Therapeutika in den diagnostischen Test integrieren lassen. Optimalziel wäre ein Test, der in der Lage ist, unter allen verfügbaren Therapieformen und Therapeutika diejenigen auszuwählen, die beim individuellen Patienten zu einem optimalen Ergebnis führen.

Beispielhaft für diese neuartigen, spezifischen Krebstherapeutika wurde der monoklonale Antikörper Herceptin untersucht. Dieser therapeutische Antikörper war einer der ersten, der für die klinische Anwendung zugelassen wurde. Herceptin wird heute in der Therapie des metastasierenden Mammakarzinomes eingesetzt (Baselga et al., 1996). Der Antikörper richtet sich gegen den Wachstumsfaktor-Rezeptor Her2/neu, der zur Familie der EGF-Rezeptoren zählt. Bei 20-30% der Mammakarzinome lässt sich eine Her2/neu-Überexpression feststellen (Slamon et al., 1987). Patientinnen werden für eine Therapie mit Herceptin zugelassen, wenn mit Hilfe eines diagnostischen Verfahrens eine Her2/neu-Überexpression oder eine entsprechende Genamplifikation nachgewiesen werden konnte. Das Beispiel Herceptin macht also deutlich, wie ein diagnostischer Test Einfluss auf die Therapie nehmen kann. Als Diagnostika sind dabei zwei Verfahren zugelassen: Ein immunhistochemischer Test (HercepTest, DAKO), welcher die Proteinexpression quantifiziert sowie ein Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungstest (FISH-Test, Vysis), welcher eine entsprechende Genamplifikation nachweist (Dowsett et al., 2000). Obwohl diese Verfahren heute erfolgreich eingesetzt werden, ist die Ansprechrate bei Patientinnen, die durch diese Testverfahren ausgewählt wurden, nicht sehr hoch (Slamon et al., 1987). Hinzu kommt, dass diese Testverfahren nur eine Aussage über den Einsatz von Herceptin treffen. Chemotherapeutika, die heute stets in Kombination mit dem Antikörper verabreicht werden, werden nach einem Standardschema ausgewählt und individuelle Eigenschaften des Tumors bleiben unberücksichtigt (Pegram und Slamon, 1999).

Für Sensitivitätsuntersuchungen wurden Modellsysteme mit aus Mammakarzinomen stammenden Zelllinien untersucht, die sich im Grad ihrer Her2/neu-Expression

unterschieden (Kapitel 5.5.1). Zwei Zelllinien, SK-BR-3 und BT-474, konnten mit Hilfe des immunhistochemischen HercepTests als stark Her2/neu überexprimierend bestätigt werden, was Angaben aus der Literatur entspricht (deFazio et al., 2000), (Tari et al., 2002). Diese Zelllinien wurden nach den Kriterien des Herstellers des HercepTests als 3+ eingestuft, was die höchste Einstufung darstellt und einen entsprechenden Tumor für eine Therapie mit Herceptin qualifizieren würde. Eine weitere Zelllinie, MCF7, konnte als schwach Her2/neu exprimierend charakterisiert werden (1+). Auch dieses Ergebnis stimmt mit berichteten Ergebnissen überein (deFazio et al., 2000). Ein Tumor dieser Klassifizierung würde in der Klinik keine Therapie mit dem Antikörper erfahren.

Versuche zur Wirksamkeit von Herceptin wurden vorab im CV-Test durchgeführt, um herauszufinden, ob und nach welcher Zeit ein Effekt sichtbar wird (Kapitel 5.5.2). Mit diesen Versuchen sollte auch die Dosis ermittelt werden, ab welcher ein maximaler inhibitorischer Effekt zu beobachten ist. Für die Zelllinien SK-BR-3 und BT-474 konnte im CV-Test bereits nach 24 h eine Wirkung detektiert werden. Diese Inhibition verstärkte sich mit zunehmender Inkubationszeit und war bei der Zelllinie SK-BR-3 besonders bei kürzeren Inkubationszeiten deutlicher sichtbar. Eine Erklärung für diesen Unterschied im Ansprechen wäre in einem relativen Unterschied der Rezeptorexpression zu suchen. Obwohl die immunhistochemische Färbung keine quantitative Aussage über die Höhe der Expression zulässt, fällt auf, dass die Färbung der Membran bei SK-BR-3-Zellen stärker erscheint (Abbildung 22). In einer Arbeit von Lewis und Kollegen konnte gezeigt werden, dass sich die beiden Zelllinien bezüglich der Expression des Her2/neu-Rezeptors unterscheiden. Mit Hilfe der FACS-Analyse wurde zwar für beide Zelllinien eine klare Überexpression nachgewiesen, doch war diese bei SK-BR-3-Zellen deutlich stärker ausgeprägt (Lewis et al., 1993). Unterschiede im Grad der Rezeptorexpression könnten also für ein unterschiedliches Ansprechen verantwortlich sein.

Die beobachtete Inhibition von SK-BR-3 Zellen durch Herceptin bestätigt Erkenntnisse von Bunn und Kollegen (2001). Sie fanden im MTT-Test nach fünf Tagen Inkubation eine deutliche, dosisabhängige Inhibition des Wachstums. In der vorliegenden Arbeit war ein dosisabhängiger inhibitorischer Effekt zu beobachten. Ab einer Konzentration von ca. 1 µg/ml war eine Sättigung erreicht und der Effekt maximal. Die Zelllinie MCF7, die keine Überexpression des Rezeptors zeigte, wurde in ihrem Wachstum durch Herceptin nicht inhibiert, sondern wies mit zunehmender

Inkubationszeit und Dosis eine leichte Stimulation auf. In Untersuchungen von Lewis und Kollegen (1993) vermochten Antikörper gegen Her2/neu ebenfalls das Wachstum von SK-BR-3 und BT-474-Zellen zu inhibieren, während kein solcher Effekt auf MCF7-Zellen gefunden wurde. Dieser Effekt wurde im CV-Test nach fünf Tagen Inkubationszeit nachgewiesen. In diesen Versuchen wurde allerdings nicht Herceptin, sondern der nahe verwandte Antikörper, 4D5, in einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet. Für Versuche im Cytosensor wurde aufgrund der Erkenntnisse aus dem CV-Test eine Dosis von 4 µg/ml eingesetzt, die sicherstellen sollte, dass ein maximaler Effekt verursacht würde. Bei dieser Konzentration wurde wiederum bei den Her2/neu überexprimierenden Zelllinien SK-BR-3 und BT-474 eine geringe Wirkung beobachtet, wobei die Zelllinie MCF7, die keine Überexpression aufwies, bei gleichen Bedingungen nicht inhibiert wurde. Vielmehr konnte auch in diesem Test eine geringfügige Stimulation beobachtet werden. Da der im Cytosensor beobachtete Effekt von Herceptin in keinem Fall sehr groß war, wurde eine Inkubationszeit von 24 h untersucht. Mit dieser verlängerten Inkubationszeit war der beobachtete Effekt etwas größer als nach 16 h.

Die Wirkung von Herceptin beruht auf einem multifaktoriellen Ereignis. Obwohl der Mechanismus in seiner Gesamtheit noch nicht verstanden ist, spielen wohl folgende Faktoren eine Rolle: Die Herabregulierung des Rezeptors, die Verhinderung der Ausbildung von Rezeptordimeren zur Signalleitung, die Induktion von p27, eine Inhibition der Angiogenese, sowie Immunmechanismen wie die antikörperabhängige Zytotoxizität (Baselga et al., 2001). Es ist sicher, dass sich Effekte wie die Angiogeneseinhibition oder Immunmechanismen naturgemäß nicht in den untersuchten Testsystemen nachweisen lassen. Unklar ist, zu welchem Grad sich die anderen aufgeführten Mechanismen *in vitro* ereignen können. Eine Quantifizierung der Wirkung von Herceptin sollte also nicht dazu verwendet werden, einen Vergleich mit anderen Substanzklassen darzustellen, deren Effekte *in vitro* zu einem anderen Anteil abzubilden sind. Welchen Anteil die darstellbaren Teilwirkungen an der gesamten Wirkung des Antikörpers haben, ist mit diesen Untersuchungen noch nicht zu sagen. Im Falle Herceptin sollte sich die Aussage des Tests somit darauf beschränken, ob eine Wirkung zu beobachten ist oder nicht.

In klinischen Studien mit Herceptin stellte sich schnell heraus, dass der Effekt, den Herceptin auslöst, mit Effekten von Chemotherapeutika zu kombinieren ist (Pegram und Slamon, 1999). Die Taxane (Docetaxel, Paclitaxel) haben sich dabei zum

Standard entwickelt, während sich jedoch auch andere Substanzen in der klinischen Erprobung befinden. Ergänzend zu Experimenten zur Wirkung von Herceptin sollte daher untersucht werden, ob sich in diesem Testsystem auch kombinatorische Effekte von Herceptin und Chemotherapeutika nachweisen lassen.

In Modellsystemen wurden kombinatorische Effekte von Herceptin und Paclitaxel im CV-Test sowie im CS-Test untersucht. Herceptin wurde in einer Konzentration von 4 µg/ml eingesetzt (Kapitel 5.5.3). Paclitaxel wurde im CV-Test einer Dosis-Eskalation unterworfen, während es im Cytosensor-Test mit der Konzentration 1/10 c_{\max} verwendet wurde. Diese verringerte Konzentration wurde gewählt, um sicherzustellen, dass neben den starken Effekten von Paclitaxel ein geringer Effekt von Herceptin nicht verdeckt würde. Die Zelllinie SK-BR-3 erwies sich als sensitiv gegenüber Paclitaxel. Auch mit der auf 1/10 c_{\max} reduzierten Konzentration konnte ein deutlicher Effekt beobachtet werden. Bei gleichzeitiger Inkubation mit Herceptin war dieser Effekt noch größer und es wurde ein additiver Effekt der beiden Substanzen bewirkt. Die Zelllinie BT-474 erwies sich hingegen bei einer Inkubation von 24 h als resistent gegenüber Paclitaxel. Dennoch führte die Kombination der beiden Substanzen zu einem Effekt, der deutlich größer war als der Effekt von Herceptin alleine. In diesem Falle war also ein Synergismus der Substanzen zu beobachten, wenngleich der Effekt relativ gering war. Auch für die Zelllinie MCF7 bestätigten sich Erkenntnisse aus Versuchen zur alleinigen Wirkung von Herceptin. Bei diesen Zellen führte die zusätzliche Gabe von Herceptin mit dem Chemotherapeutikum dazu, dass ein minimaler inhibierender Effekt zu einem leicht stimulierenden Effekt wurde.

Generell widerspricht die Erkenntnis, dass Herceptin einen Effekt auf die Zelllinie MCF7 verursachen kann nicht den Erwartungen, da bei dieser Zelllinie eine geringe Expression des Rezeptors gefunden wurde. Eine spezifische Bindung kann daher stattfinden. Es überraschte dennoch, dass Herceptin bei dieser Modellzelllinie zu einer Stimulation führte. Obwohl im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt, ist es zu erwarten, dass bei Rezeptor-negativen Zelllinien kein Effekt zu beobachten sein wird. Die Untersuchung weiterer Zelllinien mit geringer Rezeptorexpression sollte Aufschluss darüber geben, ob die beobachtete Stimulation mit einem bestimmten Phänotyp geringer Expression korreliert, oder ob es sich bei der für MCF7 gefundenen Stimulation um einen Einzelfall handelt. Sollte sich dies bestätigen, so würde sich ein Eignungstest als noch wichtiger erweisen, da ein dem

therapeutischen Ziel entgegenstehender, antagonistischer Effekt unbedingt zu vermeiden ist.

Der Cytosensor-Test eignet sich also grundsätzlich für die Untersuchung von Sensitivitäten gegenüber Herceptin. Die gemessenen Effekte sind dabei geringer als die, die man üblicherweise für Chemotherapeutika findet. Um dennoch vorhandene Effekte sichtbar machen zu können, wurde bereits für die hier durchgeführten Untersuchungen die Inkubationszeit auf 24 h erhöht. Überträgt man die Ergebnisse des CV-Tests auf den Cytosensor-Test, so ist zu erwarten, dass bei längerer Inkubationszeit deutlichere Effekte sichtbar werden. Eine solche Verlängerung der Messzeit ist jedoch auf dem heute zur Verfügung stehenden Messgerät, dem Cytosensor Mikrophysiometer, nur mit sehr großem Aufwand zu bewerkstelligen und mit einer sehr hohen Ausfallrate verbunden. Dies wird in der überarbeiteten, neuen Version des Messgerätes, wie sie bereits entwickelt wird, deutlich einfacher sein. Für diese Art von Untersuchungen auf der heute erhältlichen Maschine ist es daher wichtig, die Auflösungsgrenzen zu untersuchen, die das Messsystem limitieren. Je geringer der gemessene Effekt, desto wichtiger ist es, dass Variationen der Messung gering ausfallen. Die in den hier durchgeführten Experimenten dargestellten Wirkungsintensitäten sind in Anbetracht der dargestellten Schwankungsgröße sicherlich grenzwertig und eine eindeutige Aussage ist somit nicht zu treffen. Dennoch deuten die Ergebnisse an, dass es lohnenswert ist, das Verfahren weiter zu untersuchen und auf die Fragestellung zu optimieren. Diese Optimierung könnte nach den Erkenntnissen dieses Kapitels eine Verlängerung der Inkubationszeit, sowie eine Minimierung des Messfehlers beinhalten.

6.3 Abschlussbetrachtung

Durch die vorliegende Arbeit konnte der ChemoSelect[®]-Test optimiert werden. Der Test erwies sich als sehr gut geeignet, um Chemosensitivitätstestungen durchzuführen. Der ChemoSelect[®]-Test bietet im Vergleich zu anderen Testverfahren Vorteile, die insbesondere in der kurzen Messdauer, der niedrigen benötigten Zellzahl, der kontinuierlichen und nicht zeitversetzten Datengenerierung, sowie der grundsätzlichen Eignung für jede Art von Tumorgewebe bestehen. Eine

Weiterentwicklung des Verfahrens erscheint unter Berücksichtigung der Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit lohnenswert.

Der Wirkungsnachweis tumorspezifischer Therapeutika mit Hilfe des ChemoSelect[®]-Tests scheint am Beispiel von Herceptin möglich. Dennoch ist in diesem Fall anzumerken, dass der gemessene Effekt unter Berücksichtigung der heute erzielten Variationen grenzwertig ist. Eine Verlängerung der Messzeit würde aller Voraussicht nach zu einer Vergrößerung dieses Effektes führen. Dies soll mit einer neu entwickelten Maschine möglich sein.

Wichtige Fragen, die sich im Zusammenhang mit der Chemosensitivitätstestung stellen, wurden in der vorliegenden Arbeit nicht, oder nur teilweise adressiert, werden jedoch in anderen Projekten der Firma CellControl behandelt. Dazu gehören folgende Themenbereiche: 1) Das Projekt Tumorheterogenität bearbeitet die Frage, in wie weit Ergebnisse, die in einem Chemosensitivitätstest mit Tumorzellen aus einer Lokalisation erzielt wurden, auf Ergebnisse von Tumorzellen aus anderen Lokalisationen übertragbar sind (z. B. Primärtumor / Metastasen). 2) Das Thema Normalzelleinfluss wurde im Zusammenhang mit der Optimierung kurz angeschnitten. Hier stellt sich die Frage, welchen Einfluss in untersuchten Tumorproben enthaltene Normalzellen auf eine Chemosensitivitätstestung haben können. 3) Ferner kann auch die Art des Gewebetransports, sowie die anschließende Aufarbeitung des Gewebes Einfluss auf Sensitivitäten und Resistenzen der daraus isolierten Tumorzellen nehmen. Diese drei Themenschwerpunkte stellen für die nächste Zeit den Hauptfokus der wissenschaftlichen Aktivitäten der Firma CellControl dar.

Wenn klinische Daten die Vorhersagekraft des Tests belegen, könnte der ChemoSelect[®]-Test ergänzend zu anderen diagnostischen Verfahren eingesetzt werden. Das Ziel ist dabei die Erhebung aller auf die Therapie Einfluss nehmenden Faktoren und eine auf diesen Faktoren basierende Therapieentscheidung. Eine wichtige Rolle wird die Interaktion zwischen Onkologen, Pathologen und Forschern spielen, die solche neue diagnostische Möglichkeiten aufzeigen.

7 Literaturverzeichnis

Babarina, A., Waldenmaier, D. W., Kischkel, F. C. (2003). Medium und Verfahren zur Messung der Wirksamkeit einer Tumortherapie, PCT/EP03/12428

Baselga, J., Albanell, J., Molina, M. A., Arribas, J. (2001). Mechanism of action of trastuzumab and scientific update. *Semin Oncol* 28, 4-11.

Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, C. C., Dantis, L., Sklarin, N. T., Seidman, A. D., Hudis, C. A., Moore, J., *et al.* (1996). Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 14, 737-744.

Bunn, P. A., Jr., Helfrich, B., Soriano, A. F., Franklin, W. A., Varella-Garcia, M., Hirsch, F. R., Baron, A., Zeng, C., Chan, D. C. (2001). Expression of Her-2/neu in human lung cancer cell lines by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization and its relationship to in vitro cytotoxicity by trastuzumab and chemotherapeutic agents. *Clin Cancer Res* 7, 3239-3250.

Cortazar, P. und Johnson, B. E. (1999). Review of the efficacy of individualized chemotherapy selected by in vitro drug sensitivity testing for patients with cancer. *J Clin Oncol* 17, 1625-1631.

Coussens, L., Yang-Feng, T. L., Liao, Y. C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P. H., Libermann, T. A., Schlessinger, J., Francke, U., *et al.* (1985). Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 230, 1132-1139.

deFazio, A., Chiew, Y. E., Sini, R. L., Janes, P. W., Sutherland, R. L. (2000). Expression of c-erbB receptors, heregulin and oestrogen receptor in human breast cell lines. *Int J Cancer* 87, 487-498.

Di Fiore, P. P., Pierce, J. H., Kraus, M. H., Segatto, O., King, C. R., Aaronson, S. A. (1987). erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 237, 178-182.

Dills, W. L., Jr. (1993). Nutritional and physiological consequences of tumour glycolysis. *Parasitology* 107 Suppl, S177-186.

Dowsett, M., Cooke, T., Ellis, I., Gullick, W. J., Gusterson, B., Mallon, E., Walker, R. (2000). Assessment of HER2 status in breast cancer: why, when and how? *Eur J Cancer* 36, 170-176.

Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., Zimmermann, J., Lydon, N. B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 2, 561-566.

Figgitt, D. P. und Wiseman, L. R. (2000). Docetaxel: an update of its use in advanced breast cancer. *Drugs* 59, 621-651.

- Foon, K. A. und Bhattacharya-Chatterjee, M. (2001). Are solid tumor anti-idiotypic vaccines ready for prime time? Commentary re: U. Wagner et al., Immunological consolidation of ovarian carcinoma recurrences with monoclonal anti-idiotypic antibody ACA125: immune responses and survival in palliative treatment. *Clin. Cancer Res.*, 7: 1154-1162, 2001. *Clin Cancer Res* 7, 1112-1115.
- Fukuoka, M., Yano, S., Giaccone, G., Tamura, T., Nakagawa, K., Douillard, J. Y., Nishiwaki, Y., Vansteenkiste, J., Kudoh, S., Rischin, D., *et al.* (2003). Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 21, 2237-2246.
- Goa, K. L. und Faulds, D. (1994). Vinorelbine. A review of its pharmacological properties and clinical use in cancer chemotherapy. *Drugs Aging* 5, 200-234.
- Hamburger, A. W. und Salmon, S. E. (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197, 461-463.
- Huang, P., Chubb, S., Hertel, L. W., Grindey, G. B., Plunkett, W. (1991). Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res* 51, 6110-6117.
- Kaufmann, M. (1984). Biochemical short-term predictive assay: Results of correlative trials in comparison to other assays. (Heidelberg, Springer-Verlag).
- Kern, D. H. und Weisenthal, L. M. (1990). Highly specific prediction of antineoplastic drug resistance with an in vitro assay using suprapharmacologic drug exposures. *J Natl Cancer Inst* 82, 582-588.
- Knox, R. J., Friedlos, F., Lydall, D. A., Roberts, J. J. (1986). Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA. *Cancer Res* 46, 1972-1979.
- Koechli, O. R., Sevin, B. U., Perras, J. P., Angioli, R., Steren, A., Rodriguez, M., Ganjei, P., Averette, H. E. (1994). Growth characteristics of nonmalignant cells in the ATP cell viability assay. *Oncology* 51, 35-41.
- Kohn, K. W. (1977). Interstrand cross-linking of DNA by 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and other 1-(2-haloethyl)-1-nitrosoureas. *Cancer Res* 37, 1450-1454.
- Kramer, S. M. und Carver, M. E. (1986). Serum-free in vitro bioassay for the detection of tumor necrosis factor. *J Immunol Methods* 93, 201-206.
- Lewis, G. D., Figari, I., Fendly, B., Wong, W. L., Carter, P., Gorman, C., Shepard, H. M. (1993). Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother* 37, 255-263.
- McConnell, H. M., Owicki, J. C., Parce, J. W., Miller, D. L., Baxter, G. T., Wada, H. G., Pitchford, S. (1992). The cytosensor microphysiometer: biological applications of silicon technology. *Science* 257, 1906-1912.

- Meininger, V., Binet, S., Chaineau, E., Fellous, A. (1990). In situ response to vinka alkaloids by microtubules in cultured post-implanted mouse embryos. *Biol Cell* 68, 21-29.
- Metzger, R., Deglmann, C. J., Hoerrlein, S., Zapf, S., Hilfrich, J. (2001). Towards in-vitro prediction of an in-vivo cytostatic response of human tumor cells with a fast chemosensitivity assay. *Toxicology* 166, 97-108.
- Morgan, S. L., Baggott, J. E., Vaughn, W. H., Austin, J. S., Veitch, T. A., Lee, J. Y., Koopman, W. J., Krumdieck, C. L., Alarcon, G. S. (1994). Supplementation with folic acid during methotrexate therapy for rheumatoid arthritis. A double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 121, 833-841.
- Nowell, P. und Hungerford, D. A. (1960). A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132, 1197.
- Osieka, R., Pannenbacker, R., Schmidt, C. G. (1984). Macromolecular DNA-damage in murine and human leukemic and lymphoid cells after in vitro exposure to ASTA Z 7557 (INN mafosfamide). *Invest New Drugs* 2, 161-168.
- Owicki, J. C. und Parce, J. W. (1992). Biosensors based on the energy metabolism of living cells: the physical chemistry and cell biology of extracellular acidification. *Biosens Bioelectron* 7, 255-272.
- Pegram, M. D. und Slamon, D. J. (1999). Combination therapy with trastuzumab (Herceptin) and cisplatin for chemoresistant metastatic breast cancer: evidence for receptor-enhanced chemosensitivity. *Semin Oncol* 26, 89-95.
- Plosker, G. L. und Faulds, D. (1993). Epirubicin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in cancer chemotherapy. *Drugs* 45, 788-856.
- Raymond, E., Faivre, S., Woynarowski, J. M., Chaney, S. G. (1998). Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin Oncol* 25, 4-12.
- Reinartz, S., Kohler, S., Schlebusch, H., Krista, K., Giffels, P., Renke, K., Huober, J., Mobus, V., Kreienberg, R., DuBois, A., *et al.* (2004). Vaccination of patients with advanced ovarian carcinoma with the anti-idiotypic ACA125: immunological response and survival (phase Ib/II). *Clin Cancer Res* 10, 1580-1587.
- Rustin, G. J., Marples, M., Nelstrop, A. E., Mahmoudi, M., Meyer, T. (2001). Use of CA-125 to define progression of ovarian cancer in patients with persistently elevated levels. *J Clin Oncol* 19, 4054-4057.
- Salmon, S. E., Hamburger, A. W., Soehnlen, B., Durie, B. G., Alberts, D. S., Moon, T. E. (1978). Quantitation of differential sensitivity of human-tumor stem cells to anticancer drugs. *N Engl J Med* 298, 1321-1327.
- Sasaki, Y., Tamura, T., Eguchi, K., Shinkai, T., Fujiwara, Y., Fukuda, M., Ohe, Y., Bungo, M., Horichi, N., Niimi, S., *et al.* (1989). Pharmacokinetics of (glycolate-0,0')-diammine platinum (II), a new platinum derivative, in comparison with cisplatin and carboplatin. *Cancer Chemother Pharmacol* 23, 243-246.

- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., Boyd, M. R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 48, 4827-4833.
- Sevin, B. U., Peng, Z. L., Perras, J. P., Ganjei, P., Penalver, M., Averette, H. E. (1988). Application of an ATP-bioluminescence assay in human tumor chemosensitivity testing. *Gynecol Oncol* 31, 191-204.
- Sevin, B. U., Perras, J. P., Averette, H. E., Donato, D. M., Penalver, M. (1993). Chemosensitivity testing in ovarian cancer. *Cancer* 71, 1613-1620.
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177-182.
- Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., *et al.* (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344, 783-792.
- Tari, A. M., Lim, S. J., Hung, M. C., Esteva, F. J., Lopez-Berestein, G. (2002). Her2/neu induces all-trans retinoic acid (ATRA) resistance in breast cancer cells. *Oncogene* 21, 5224-5232.
- Thuro, H. C. (2001). In-vitro-Chemosensitivitätstest: Maßgeschneiderte Chemotherapie durch prätherapeutische Testung. Beilage in. *Der Onkologe* 7, 1-8.
- Tomasz, M., Lipman, R., Chowdary, D., Pawlak, J., Verdine, G. L., Nakanishi, K. (1987). Isolation and structure of a covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA. *Science* 235, 1204-1208.
- Wada, H. G., Fok, K., Parce, J. W., Nola, T., Robinson, W., McConnel, H. M. (1992). Application of the microphysiometer to the detection of HIV mediated effects on host cell metabolism and anti-HIV activity. In Poster (Molecular Devices).
- Warburg, O. (1956a). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269-270.
- Warburg, O. (1956b). On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314.
- Weisenthal, L. M. und Kern, D. H. (1991). Prediction of drug resistance in cancer chemotherapy: the Kern and DiSC assays. *Oncology (Huntingt)* 5, 93-103; disc 104, 111-104, 117-108.
- Weiss, R. B. und Issell, B. F. (1982). The nitrosoureas: carmustine (BCNU) and lomustine (CCNU). *Cancer Treat Rev* 9, 313-330.
- Wiseman, L. R. und Spencer, C. M. (1998). Paclitaxel. An update of its use in the treatment of metastatic breast cancer and ovarian and other gynaecological cancers. *Drugs Aging* 12, 305-334.

Xu, J. M., Song, S. T., Tang, Z. M., Jiang, Z. F., Liu, X. Q., Zhou, L., Zhang, J., Liu, X. W. (1999). Predictive chemotherapy of advanced breast cancer directed by MTT assay in vitro. *Breast Cancer Res Treat* 53, 77-85.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

5FU	5'-Fluorouracil
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSS	Ausgewogene Salzlösung (<i>Balanced salt solution</i>)
C_{\max}	Maximale Serumkonzentration (in Patienten)
CV	Kristallviolett (<i>Crystal violett</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	Durchflusszytometer (<i>Fluorescence activated cell scanner</i>)
FCS	Fötale Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
MCB	Arbeitszellbank (<i>Master cell bank</i>)
MTS	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium Salz)
MTT	(3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RKI	Robert Koch Institut
WCB	Hauptzellbank (<i>Working cell bank</i>)

8.2 Zusammensetzung des SeleX-Mediums

Komponente	Konzentration (mg/l)
Alanin, L-	4,45
Arginin, L-, HCL	147,5
Asparagin, L-, H2O	7,5
Asparaginsäure, L-	6,65
Cystin, L-	24
Cystein, L-, HCL H2O	17,56
Glutaminsäure, L-	7,35
Glutamin, L-	292,2
Glycin	18,75
Histidin, L-, HCl H2O	31,48
Hydroxyprolin, L-4-	20
Isoleucin, L-	54,45
Leucin, L-	59,05
Lysin, L-HCl	91,25
Methionin, L-	17,24
Phenylalanin, L-	35,48
Prolin, L-	17,25
Serin, L-	26,25
Threonin, L-	53,45
Tryptophan, L-	9,02
Tyrosin, L-	38,7
Valin, L-	52,85
Glucose	5.000
Inosit, myo-; Inosit, meso-	12,6
Biotin, D-	0,00365
Calcium D-Pantothenat	2,24
Cholinchlorid	8,98
Glutathion, L-, reduziert	1
Nicotinsäureamid	2,02
Pyridoxin, HCL (Vit. B6)	2,031
Thiaminchlorid, Thiamin HCL (Vit. B1)	2,17
Tocopherolsuccinat DL-alfa	0,01
Vitamin A-acetat	0,1
Vitamin B 12 (Cyanocobalamin)	0,68
Vitamin C (Ascorbinsäure)	2
Vitamin D2	0,1
Phenolrot	8,1
Calciumchlorid, 2 H2O	154
Eisen (III) nitrat, 9 H2O	0,05
Eisen (II)-Sulfat , 7 H2O zur Analyse	0,417
Kaliumchlorid	311,8
Kupfer (II) sulfat, 5 H2O	0,00125
Magnesiumsulfat, 7 H2O	100
Magnesiumchlorid, 6 H2O	61
Natriumchlorid	6999,5
Na2HPO4	14,29
Zinksulfat, 7 H2O	0,43

8.3 Veröffentlichung



Available online at www.sciencedirect.com



Toxicology and Applied Pharmacology 192 (2003) 237–245

Toxicology
and Applied
Pharmacology

www.elsevier.com/locate/taap

Rapid in vitro chemosensitivity analysis of human colon tumor cell lines

Dirk S. Waldenmaier, Alexandra Babarina, and Frank C. Kischkel*

Department of Cell Biological Diagnostic, CellControl Biomedical Laboratories AG, 82152 Martinsried, Germany

Received 12 February 2003; accepted 27 May 2003

Abstract

In oncology, diagnostic assays have the potential to individualize treatment. Due to a large number of chemotherapeutic agents available, a chemosensitivity assay would be of great value for patients receiving chemotherapy. However, no broadly accepted test exists to date. Our work aims at establishing a chemosensitivity test using a microphysiometer, a device that measures the extracellular acidification rate of cells. The test assesses chemosensitivity by comparing the acidification rate of cells treated with cytostatic agents with that of nontreated cells. We performed experiments with two human colon tumor cell lines, HCT 116 and SW620, and cytostatic agents commonly used in therapy of colon carcinoma. We showed that a chemosensitivity test can be reproducibly performed using a microphysiometer. Suitable media and conditions for the assay were found. Test results were further correlated with the crystal violet assay and a tetrazolium salt assay. In comparison, cytostatic effects were rapidly and most clearly displayed with the microphysiometer. Our results suggest that microphysiometry is a promising platform for chemosensitivity testing.

© 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Chemosensitivity; Cancer; Microphysiometer; Chemotherapy; Cytostatic agent; Colon

Introduction

As many cytostatic agents have been developed since the 1940s, chemotherapy plays an important role in cancer therapy today. The majority of patients with cancer will require treatment with cytostatic agents at some point in the course of their disease. While determining sensitivity and resistance of an individual organism prior to treatment has been the standard for infectious diseases for years, in chemotherapy the drug regimen is still defined by tumor histology rather than a tumor's sensitivity to a given agent. Due to individual susceptibilities, tumors of the same histology do not necessarily respond identically to the same drug regimen. A diagnostic assay that is capable of predicting a response to a given cytostatic agent could therefore help to improve the clinical outcome of cancer patients. Since the

1950s, scientists have been working on setting up a chemosensitivity test on the basis of a number of different technologies. So far no such diagnostic assay is broadly accepted by oncologists.

Functional chemosensitivity assays work by directly analyzing effects of therapies on living tumor cells obtained from the patient. To find out about potential cytostatic effects these tests measure distinct characteristics of the cell, such as colony-building ability (Salmon et al., 1978), permeability of the cell membrane (Weisenthal et al., 1983), activity of enzymes (Xu et al., 1999), production of ATP (Sevin et al., 1988), or DNA synthesis (Kern and Weisenthal, 1990). Yet another variable correlating with the metabolic activity of the cells is the extrusion of protons resulting in an acidification of the medium surrounding the cell. A microphysiometer such as the Cytosensor by Molecular Devices uses a biosensor chip to measure the extracellular acidification rate of cells that are brought into the machine (Owicki and Parce, 1992). The acidification rate is thought to reflect the metabolic activity of the cells. An effective cytostatic agent is able to reduce the metabolic

* Corresponding author. Department of Cell Biological Diagnostic, CellControl Biomedical Laboratories AG, Am Klopferspitz 19, 82152 Martinsried, Germany. Fax: +49-89-895275-11.

E-mail address: frank.kischkel@cellcontrol.de (F.C. Kischkel).

activity of cells and therefore leads to a decreased acidification rate, which can be measured in the microphysiometer (Parce et al., 1989).

We are currently investigating the value of a chemosensitivity test that utilizes a microphysiometer. We have been able to show that such a test is capable of measuring cell proliferation and chemosensitivity reproducibly and our results correlated with those of other viability assays.

Methods

The microphysiometer method. The microphysiometer method was described by McConnell et al. (1992) and Wada et al. (1992). We performed experiments with a modified preparation as described by Metzger et al. (2001). Cells were suspended in medium used for the experiment without serum and mixed with melted agarose cell entrapment medium after cooling down to 37°C (Molecular Devices). The cell entrapment medium consisted of low-melting-point agarose and Hepes in a balanced salt solution (BSS). This medium was mixed with the cell suspension in ratio 2:1, pipetted into the capsule cups, and the pellets were allowed to set for 8 min at 4°C. The cell number per channel was 50,000 for all experiments except for the analysis of different cell numbers. Cells were assembled in sensor chambers and perfused with the appropriate medium containing 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 100 µg/ml kanamycin, and 2.5 µg/ml fungizone with or without fetal calf serum (FCS) at a flow rate of 45 µl/min. For all but those experiments for Fig. 1, RUN medium supplemented with 10% FCS was used. To assess the extracellular acidification rate the perfusion was repeatedly stopped for 30 s throughout the experiment. One data point of extracellular acidification rate was generated every 2 min. Before application of the cytostatic drugs, cells were allowed to adapt to the medium for 2 h. The cells were generally exposed to the drug for 14 h. For the experiments for Fig. 3 cells were incubated with cytostatic agents for 24 and 72 h.

Analysis of data obtained with the microphysiometer. The extracellular acidification rate of the cells was measured in -µV/s. One data point is generated every 2 min. For the reason of comparability we used five data points to normalize the curves to 100%. Normalization took place shortly after the cells adapted to the medium for 2 h and the administration of the drug started. The period of evaluation was 14 h from the point of normalization. For the comparison of microphysiometer measurements with other methods (see Fig. 3), the period of incubation were 24 and 72 h. Of four full-time runs performed per substance, at least two were evaluated. Measurements showing technical problems, most of which were caused by air bubbles in the sensor chamber, were excluded from evaluation. Fifteen individual data points were averaged, and the mean value was used as a single endpoint to represent 30 min of measurement. Of

two to four individual full-time measurements taken into evaluation, we calculated and displayed the mean values and standard deviations (SD) of these 30-min data points. Only every third of such data points is displayed in Fig. 3. To assess the percentage value of a cytostatic effect, the last data point representing 30 min of measurement of the probe treated with the cytostatic drug was divided by the last data point of the control curve.

Materials. For MTS analysis we used the CellTiter 96 aqueous non-radioactive cell proliferation assay from Promega Corporation (Madison, WI). Crystal violet, RNase, and propidium iodide were obtained from Sigma (Taufkirchen, Germany). Culture media, FCS, and antibiotics (penicillin/streptomycin, kanamycin, and fungizone) were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA). For experiments with the microphysiometer, we used modified low-buffered RPMI 1640 medium (RUN medium) without sodium bicarbonate. This medium was purchased from PAN Biotech, (Aidenbach, Germany) and contained 1.4 g/L NaCl to maintain osmolarity. For some experiments RUN medium was substituted by a modified BSS containing (in mM) 138 NaCl, 10 glucose, 5 KCl, 1.3 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 0.77 Na₂HPO₄ × 2 H₂O, and 0.23 NaH₂PO₄ × 2 H₂O. Cell entrapment medium and disposable materials were obtained from Molecular Devices (Sunnyvale, CA). Capsule transwells were obtained from Corning (Schiphol-Rijk, The Netherlands).

Cytostatic drugs. For experiments with cytostatic drugs, we used oxaliplatin from Sanofi Winthrop (Gentilly Cedex, France) in a concentration of 3.6 µg/ml. Cisplatin was purchased from Sigma and used in a concentration of 3.8 µg/ml. The final concentration of gemcitabine from Lilly, (Indianapolis, IN) was 22.5 µg/ml. All concentrations mentioned represent the average peak plasma concentration (c_{max}) achieved in patients during therapy.

Cell culture. Two human colon tumor cell lines were used for the experiments. HCT 116 and SW620 were obtained from ATCC (Manassas, VA). HCT 116 cells were cultured in Mc Coy's 5A medium containing 10% FCS at 37°C and 5% CO₂. SW620 cells were cultured in Leibowitz L15 medium containing 10% FCS at 37°C in the absence of CO₂.

MTS assay. The tetrazolium salt assay (MTS) was performed as described by the supplier. Cells were plated in a flat-bottom 96-well plate in a 1:2 dilution of 50,000 to 1,563 cells in 200 µl medium per well. Cytostatic drugs were administered in concentrations as described above and plates were incubated at 37°C and 5% CO₂ in culture medium. SW620 cells were kept in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS. After incubation times of 22 and 70 h, 20 µl of MTS solution was added to each well and incubation was continued for 2–3 h. Absorbance was measured at a wavelength of 490 nm in a microtiter plate reader.

For evaluation, only cell densities with control wells showing exponential growth were used. For these wells the signal of the cells treated with cytostatic agents was divided by the signal of the corresponding control cells after average background subtraction.

Crystal violet assay. Cells were plated and treated as described for the MTS assay. The crystal violet assay was performed according to a protocol modified from Kramer and Carver (1986). After a period of 24 or 72 h, culture medium was removed and plates were washed with 200 μ l PBS per well. One hundred microliters of a solution containing 0.5% crystal violet in 25% methanol were added to each well and incubated for 5 min. Plates were washed with tap water, dried, and cells were lysed with 100 μ l 2% sodiumdeoxycholate per well. Absorbance was measured at 570 nm (reference wavelength 630 nm) in a microtiter plate reader. Evaluation was performed as described for the MTS assay.

Cell cycle analysis. We used a Becton Dickinson FACS Scan flow cytometer for cell cycle analysis. To guarantee comparable conditions with the cells in the microphysiometer, cells for cell cycle analysis were treated equally for these experiments. Cells were immobilized in cell entrapment medium and seeded into 12-well plates at 8 spots of each containing 50,000 cells per well. After 16 h of incubation, cells were released from agarose by resuspending, fixed with cold 70% ethanol, and kept at -20°C for a minimum of 2 h. For analysis, ethanol was removed and cells were resuspended in 100 μ l PBS containing 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ propidium iodide and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase. After a 30-min incubation at room temperature, the cells were measured for DNA content.

Results

Comparison of different testing media

Any kind of medium can potentially be used for experiments with the microphysiometer. In order to maximize the acidification rate measured, it is suggested to use a low-buffered medium. Most experiments use a low-buffered medium based on RPMI 1640, which can be obtained from the manufacturer of the Cytosensor microphysiometer. In most published experiments in which a microphysiometer is used, this medium has been utilized. On the other hand some experimenters use a less complex formulation of running medium. A BSS has proven to be sufficient for some applications, especially for those with short incubation times. In our experiments we compared the influence of BSS medium on the measurement with that of RUN medium, a formulation based on RPMI.

For the chemosensitivity analysis we used three different cytostatic agents. Cisplatin and oxaliplatin, both alkylating

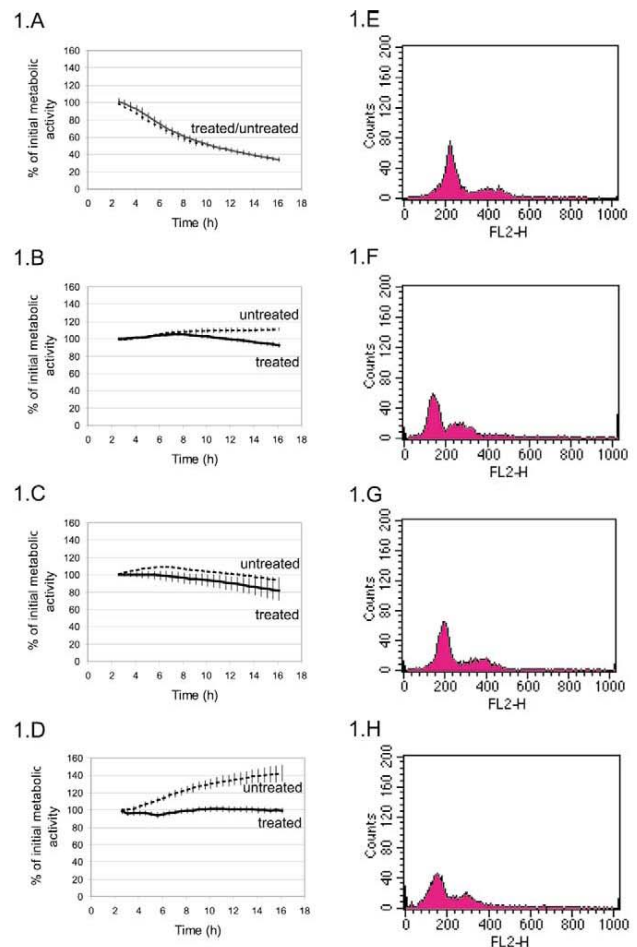


Fig. 1. (A–D) Effect of oxaliplatin on HCT 116 cells measured with the Cytosensor microphysiometer with different media. (E–H) Results of cell cycle analysis of control cells kept in corresponding medium. Different media were used for experiments as follows: A and E. BSS without FCS; B and F. BSS + 10% FCS; C and G. RUN without FCS; D and H. RUN + 10% FCS.

agents, inhibit DNA synthesis primarily by causing intra-strand cross-links in DNA (Culy et al., 2000), while gemcitabine acts as a nucleotide analogue (Huang et al., 1991). Though using different mechanisms, both classes of drugs inhibit DNA replication, which takes place during the S-phase of the cell cycle. In order to display an effect of these cytostatic agents it is therefore essential to examine cells that pass through that cell cycle phase. The main restriction point in the cell cycle of mammalian cells is at the end of G1 (Lewin, 2000). Culture conditions can largely influence the length of G1 and are therefore critical for the cell to enter S-phase (Lewin, 2000). Fetal calf serum containing several growth factors is commonly used in cell culture to enhance proliferation of cells. In addition to examining different basal media in the microphysiometer, we investigated the effect of FCS on the test results.

As shown in Fig. 1, the metabolic activity of HCT 116 cells in BSS without FCS, both untreated and treated, de-

Table 1
Variation among microphysiometric measurements of HCT 116 cells treated with oxaliplatin

Cytosensor	Day 1	Day 2	Day 3	Interday mean (%)	Interday variation (%)
3	70%	72%	72%	71	1
4	70%	75%	72%	72	3
5	71%	78%	71%	73	4
8	67%	66%	76%	70	6
Intermachine mean (%)	70	73	73		
Intermachine variation (%)	2	5	2		
Mean of all runs (%)	72				
Variation of all runs (%)	3				

Note. Data represent metabolic activity of treated cells in relation to nontreated cells after an incubation of 14 h. Values were calculated as described under Methods and are expressed as percentages.

creased by 60% within 14 h of measurement. A cytostatic effect could not be observed in this setting. Adding FCS to the BSS resulted in a higher final metabolic activity of the cells. When this medium was used, the incubation with oxaliplatin resulted in a decrease of acidification rate by ca. 20% of the final metabolic activity of control cells. Keeping the cells in RUN medium resulted in a minor increase followed by a minor decrease of metabolic activity over time. An incubation with oxaliplatin led to a ca. 15% decreased acidification rate relative to untreated cells at the end of the run. Those cells kept in RUN medium supplemented with FCS showed the highest metabolic activity throughout the experiment. The metabolic activity of these cells increased by ca. 40% within 14 h. In this setting of RUN medium supplemented with 10% FCS, the metabolic activity of treated cells at the end of the run was 70% of the controls. This represents the most prominent effect observed.

The same experiment was performed with SW620 cells (data not shown). With acidification rate curves showing a slightly different profile, the same rank order with the largest viability and effect of oxaliplatin was RUN + 10% FCS > RUN \cong BSS + 10% FCS > BSS.

Cell cycle analysis using flow cytometry showed that the addition of FCS increased the percentage of cells in G2 phase, indicating that the cells are proliferating to a higher degree (Fig. 1). Moreover, cells kept in RUN medium showed a higher percentage of G2 than cells kept in BSS. These results could be verified for the other human colon tumor cell line, SW620 (data not shown).

On the basis of these findings we used RUN medium with FCS for all of the following experiments.

Intermachine, interday variation

To assess reproducibility of a chemosensitivity test using a microphysiometer, we compared a reference experiment several times on four different machines (intermachine) and on 3 different days (interday). We chose HCT 116 cells and oxaliplatin for a reference model due to a clear increase of

metabolic activity over time and a clear cytostatic effect observed.

The cytostatic effect calculated as described under Methods was characterized by a SD ranging from 2 to 5% among four machines on the same day, indicating that hardware is not critical for the comparability of the system.

Measurements performed on different days showed that acidification rates and their progression over time differed slightly among some measurements. The SD of measurements performed on 3 different days was equal to the SD among measurements on the same day and did not exceed 6% as shown in Table 1. The main difference of these measurements was a different proliferation of both untreated and treated cells. We discovered that the cultivation of the cells before the experiment largely influenced the cellular behavior in terms of acidification rates. In particular, the confluence of the cells in the culture flask and the time since splitting affected proliferation and response patterns. If the cells for an experiment were derived from a culture flask with a confluence below ca. 60%, the metabolic activity did not rise over time and no clear cytostatic effect could be observed. Cells from flasks with a confluence between 60 and 80% showed a higher increase of metabolic activity over time with a minor cytostatic effect. The most comprehensive results could be observed with cells from flasks of 80 to 90% confluence. These cells showed a significant increase of metabolic activity during measurement and the largest cytostatic effect was observed in this setting. When using cells that were seeded on the day prior to the experiment, we found in some cases an inferior increase of metabolic activity over time compared to experiments with cells from flasks that were seeded at least 2 days prior to the experiment. We chose a minimal culture time of 2 days between seeding and the experiment to ensure reliable data. These findings indicate that interday variation is mainly caused by a different pre-treatment of the cells, mainly cell cultivation. Culture conditions are therefore critical for chemosensitivity testing of cell lines with this system. By keeping culture conditions constant we were able to repeatedly

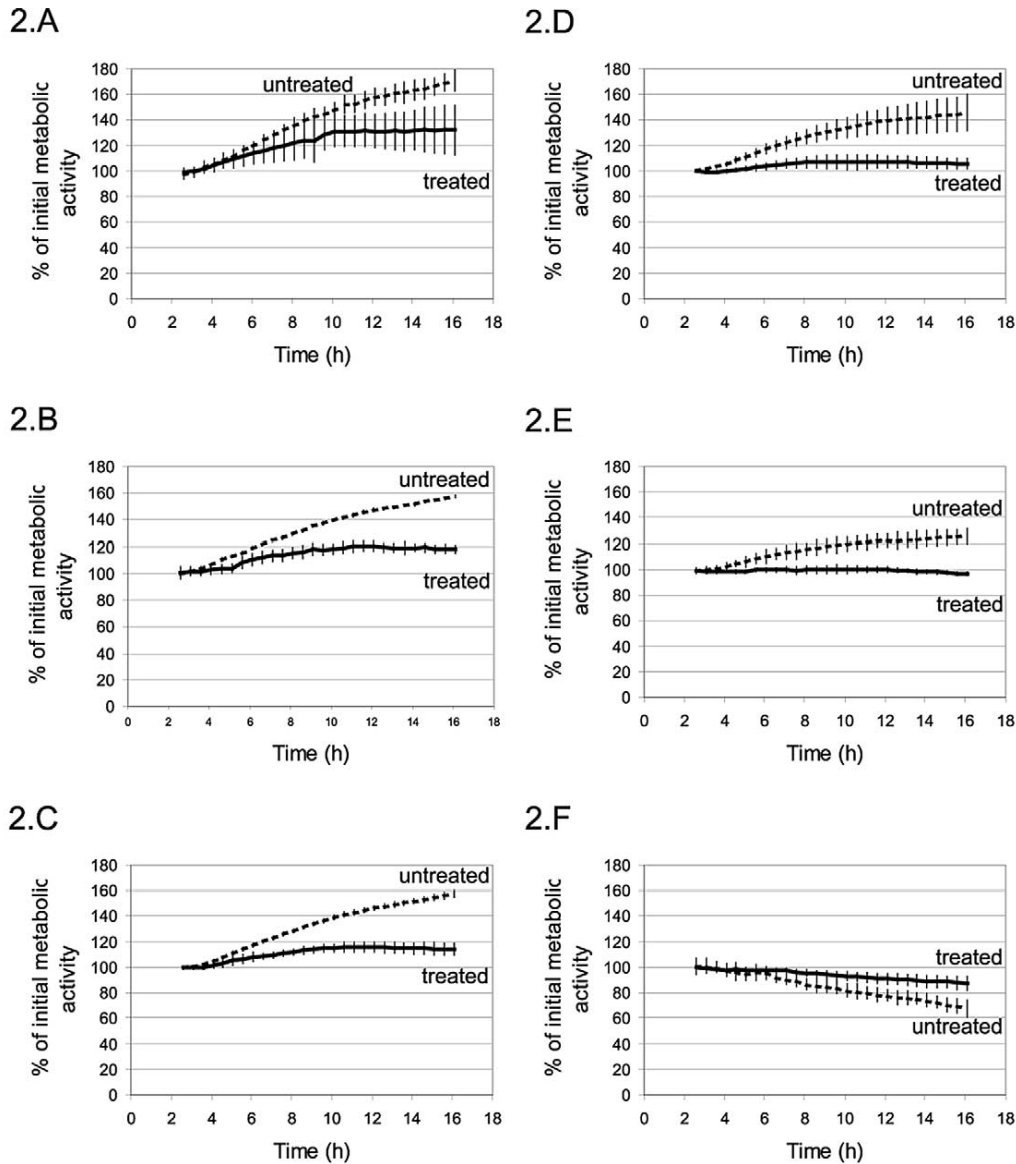


Fig. 2. Measurement of HCT 116 cells with oxaliplatin at different cell densities. (A) 5,000 cells per well, (B) 10,000 cells per well, (C) 25,000 cells per well, (D) 50,000 cells per well, (E) 100,000 cells per well, (F) 250,000 cells per well.

show a characteristic response profile and a variation between 1 and 6%.

Effect of oxaliplatin on different cell numbers

To define the limitations of the test system in terms of the cell number we investigated the influence of the cell number on results of the chemosensitivity test. We performed measurements with the microphysiometer using cell numbers ranging from 5,000 to 200,000 cells per chamber (Fig. 2). For the two cell lines tested, a range of 10,000 to 100,000 cells per chamber proved to be eligible. Below 10,000 cells per chamber the acidification rate data were noisy due to a low signal measured. With cell numbers exceeding 100,000

per chamber, the metabolic activity decreased largely over time and no significant inhibition of the acidification rate by oxaliplatin could be observed. In the range of 10,000 to 100,000 cells per chamber, the signal measured rose with the cell number. In this range the progression of the acidification rates over time as well as the cytostatic effect was independent of the cell number. The same range of cell number could be defined for SW620 cells (data not shown).

Comparison of microphysiometer measurements with MTS and crystal violet

In order to validate a chemosensitivity test using a microphysiometer, we compared this system with crystal vio-

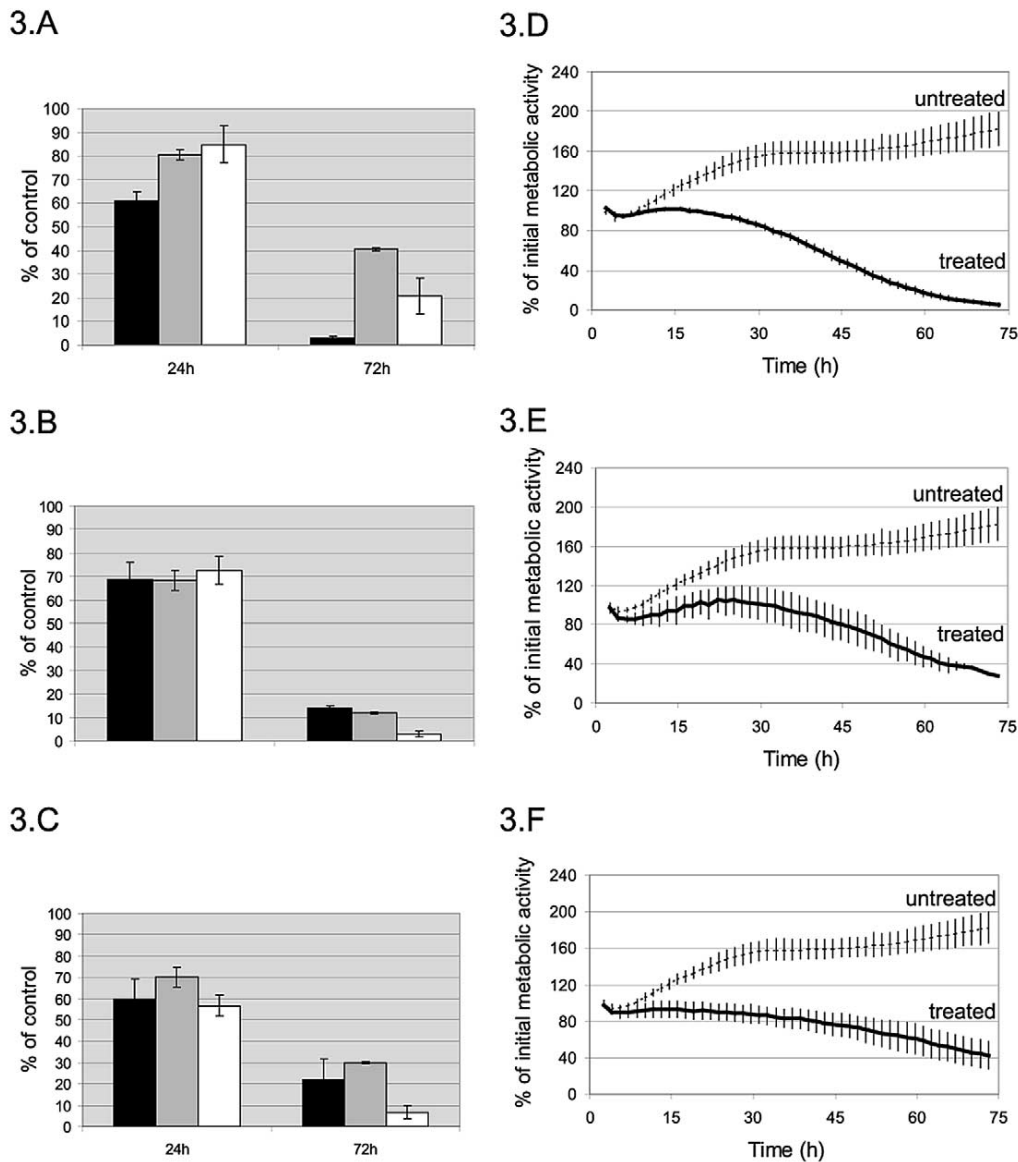


Fig. 3. (A–C) Effects of cytostatic agents on SW620 cells measured with the Cytosensor microphysiometer (■), MTS (□), and crystal violet (□). (D–F) Progression of metabolic activity measured with the Cytosensor microphysiometer. (A and D) cisplatin, (B and E) gemcitabine, (C and F) oxaliplatin.

let and MTS proliferation assays (Cory et al., 1991). Crystal violet and MTS assays are usually performed with incubation periods in the range of days. We compared the results of all three assays for an incubation time of 1 and 3 days.

For the comparison studies we used three cytostatic agents as described under Methods. All three substances showed a significant inhibition of the extracellular acidification rate of SW620 cells after an incubation time of 3 days in all assays (Fig. 3). In the case of cisplatin and gemcitabine, this effect led to a complete regression of the metabolic activity of the cells. Oxaliplatin led to a rapid effect while cisplatin and gemcitabine needed a longer incubation time for a visible effect that was larger in the end. Online data acquisition in contrast to single end point analysis as used

for MTS and crystal violet bares the possibility of visualizing a typical profile of drug action. Characteristic profiles of the acidification rate curves of cells treated with cytostatic agents could be verified with the second colon tumor cell line tested, HCT 116 (data not shown). This finding indicates that different modes of action of the cytostatic agents might be responsible for characteristic profiles of acidification rate curves. The typical curve for cisplatin might represent a strong cytostatic effect that preferentially gets clearer in measurements longer than 1 day. Especially this example shows the importance of defining the cutoff between a notable effect and no effect. For the three substances tested on two human colon tumor cell lines, no discrepancies could be observed among the assays. Never-

theless, the microphysiometer seems to display cytostatic effects more clearly with short periods of incubation compared to crystal violet or MTS due to the continuous data collection. The microphysiometer detected cytostatic effects at least as large as the crystal violet and MTS assay. Monitoring of the online data obtained with the microphysiometer allows the additional verification of a profile characteristic for certain cytostatic agents.

Discussion

In chemotherapy oncologists can choose from a variety of treatment options for their patients. Chemotherapeutic regimens for cancer patients are usually chosen based on statistical results of clinical trials. This way cytostatic agents with the greatest response rates in the patient population tested become routine therapy for a specific tumor type. These response rates describe average results of a specific population but do not consider individual phenotypical and genotypical differences among individual tumors. As a consequence, in many cases multiple rounds of treatment are necessary or the patient even dies before an appropriate treatment can be identified. Especially with an increasing number of antitumor drugs being developed, a diagnostic tool will become essential to choose the best treatment option.

Some diagnostic tools that aim at individualizing cancer therapy are being used by oncologists. The most prominent examples thereof are the ATP viability assay (Sevin et al., 1988) and the tetrazolium salt viability assay (Xu et al., 1999). Other examples are the thymidine incorporation assay (Kern and Weisenthal, 1990; Johnson and Glaubiger, 1983) or the Differential Staining Cytotoxicity assay (DISC) (Wilbur et al., 1992). No test so far is broadly accepted by oncologists. The lack of acceptance is mainly caused by technical limitations as well as missing clinical data on the predictive value of these tests.

We are currently working on a chemosensitivity test that utilizes a microphysiometer. The microphysiometer measures the extrusion of protons that is caused by metabolic action, mainly glycolysis (Owicki and Parce, 1992). Effective cytostatic agents reduce the metabolic activity of cells in the system. Such an effect can be determined by calculating a reduction of the acidification rate of cells over time. Preliminary data from clinical experience indicates a good correlation of the test results with *in vivo* responses (Metzger et al., 2001). The test system can potentially also be used for the prediction of response to target specific drugs (Waldenmaier et al., 2001). A clinical study will be set up within the next months to address the predictive value of the test system.

In this work we have examined the reproducibility and reliability of this test system. We analyzed colon carcinoma cell lines because this type of tumor is subject to chemotherapeutic treatment and primary cells will be assessable

for future experiments. The analysis of this type of tumor will be challenging, with a lot of contaminations occurring during periods of cultivation.

To achieve a good transferability of chemosensitivity test results to the clinic, experimental conditions should be closely related to *in vivo* conditions. The situation in the body is complex, with cell–cell interactions and soluble factors influencing the cellular behavior. An important part of a chemosensitivity assay is the medium in which the cells are kept and exposed to the drug. This medium should guarantee a tumor cell's survival and proliferation by providing all necessary nutritional and hormonal factors to the cells. FCS meets the basic needs of cells in culture.

Most cytostatic agents operate during the S-phase of the cell cycle, when components for division are synthesized. Proliferation is therefore essential for cytostatic agents to become effective. Cell division among mammalian cells critically depends on the presence of mitogens. Arresting cells in the cell cycle by withdrawing such growth factors would therefore prevent the action of cytostatic agents. For this reason we investigated the influence of different media on the measurement of the chemosensitivity of tumor cells with the microphysiometer.

For our experiments we used human colon tumor cell lines HCT 116 and SW620. We performed experiments with two different basal media with and without FCS to examine their impact on the results. As shown in Fig. 1, FCS has a large influence on the metabolic activity of the tumor cells examined. The comparison of measurements in BSS with (Fig. 1.C) and without FCS (Fig. 1.A) in particular showed that FCS is likely to contain important factors that guarantee the maintenance or even an increase of metabolic activity over time. BSS alone led to a large decrease of metabolic activity of the cells over time. A more complex formulation of culture medium on the basis of RPMI 1640 (RUN medium) enhanced the metabolic activity of the cells over time both with (Fig. 1.G) and without FCS (Fig. 1.E) in comparison to BSS. Cell cycle analysis showed a higher percentage of cells in S- and G₂-phase when kept in RUN medium compared to cells kept in BSS. This observation allows the conclusion that the increase of metabolic activity originates from a higher percentage of cells that pass the restriction point of the cell cycle, resulting in an increasing cell number. The addition of FCS to both media resulted in a clear shift toward S- and G₂-phases. Taken together these findings suggest that RUN medium with 10% FCS has the highest potential to demonstrate chemosensitivity effects with a microphysiometer *in vitro*.

Another challenge that chemosensitivity assays have to face is the limited cell number of a tumor sample. The cell number might not be sufficient to run the test for the number of cytostatic agents of choice. This is the main reason for the missing acceptance of most of the chemosensitivity assays available today. To overcome this problem, some tests use tumor cells that have been cultured for several days or weeks before the actual measurement is performed. A cul-

turing step is thought to maximize the cell number. This point is critical with respect to contaminations by microbes or nontumor cells. A culturing period can facilitate some kind of selection in the heterogeneous cell population deriving from a tumor. Fibroblasts, for example, might overgrow tumor cells in culture and increase the fraction of nontumor cells. This selection may lead to results that are not representative for the actual tumor.

To define the limitations of the system regarding the cell number, we performed our experimental setup with different cell numbers. For HCT 116 cells we have defined the optimal cell number to be between 10,000 and 100,000 per channel (Fig. 2). The same range of cell numbers led to reliable data for SW620 (data not shown). In this range, acidification rate curves as well as cytostatic effects measured are comparable. The cell number within this range does not influence the results of the measurement. Due to these findings we performed all further microphysiometer experiments with a cell number of 50,000 cells per channel. Since factors other than the cell number such as the size of the cells, may influence the metabolic activity measured, we note that our data are representative for the two cell lines tested. Other cells might behave differently and show a generally higher or lower metabolic activity. Our experience is that primary tumor cells generally have a lower acidification rate compared with cell lines (data not shown).

In order to examine reproducibility of the microphysiometer assay, we performed a representative experimental setup on four different machines on 3 different days. For this purpose we chose HCT 116 cells and oxaliplatin, a combination with which rapid effect was observed before in a short screening in our lab. The incubation time with the cytostatic agent was 14 h. Among all 12 experiments the mean metabolic activity after treatment with oxaliplatin was 72% of the controls with a standard deviation of 3%. The variation within 1 day, considered intermachine variation, ranged from 2 to 5%. The variation among one machine, considered interday variation, ranged from 1 to 6% (Table 1). Since the mean value as well as the interday and inter-machine variation were in the same range, we conclude that the test setup can be reproducibly performed with the microphysiometer. We found that the progression of metabolic activity over time was critically dependent on culturing conditions of the cells prior to the test. The main variables we found were the confluence of the cells in the culture flask and the time since splitting. These variables have a large impact on the acidification rates of these cells. We observed metabolic activities of untreated cells that did not increase over time with cells from flasks of a confluence below 60% masking a part of the cytostatic effect measured. A similar effect was observed in some experiments when cells were seeded only 1 day prior to experiments. Seeding cells at least 2 days prior to the experiment in a density that resulted in 80–90% confluence on the day of the experiment increased reproducibility. This point should be considered for all viability assays in which cells are cultured. Cell culture

is critical and will be a major challenge in the validation of tests such as the MTS or crystal violet assays.

For a comparison of the results produced with the microphysiometer and other assays, we performed two more viability assays. The MTS viability assay, a modification of the MTT assay, assesses drug effects by measuring the inhibition of the activity of an enzyme that is thought to correlate with the metabolic activity (Cory et al., 1991). Therefore, it measures a signal similar to that measured in the microphysiometer assay. The crystal violet assay mainly measures the loss of adherence of cells as it can occur in apoptosis and necrosis and is therefore limited to highly adherent cells. In this assay the signal measured is the amount of protein stained in remaining attached cells. For the reason of comparability we used the same drug concentration in all three assays. We performed all assays with incubation times of 1 and 3 days with HCT 116 and SW620 colon tumor cell lines and three cytostatic agents. As shown in Fig. 3 for SW620, all three assays detected an effect of the drugs examined and showed a good correlation with differences being larger after an incubation time of 3 days. The comparison of these three assays showed that the microphysiometer performs well. For an incubation time of 1 day, the microphysiometer detects at least an equal chemosensitivity for the three agents examined. Similar results regarding sensitivity of the test system were reported before (Cooke and O'Kennedy, 1999). Cooke and O'Kennedy performed toxicity experiments with coumarin compounds and showed that the Cytosensor method was superior to the MTT assay. These findings are consistent with our results and point to the possibility of setting up a rapid chemosensitivity assay that uses a microphysiometer. Among the three assays examined, continuous data acquisition is a unique feature of the microphysiometer. This feature allows the visualization of a characteristic profile of the acidification rate curve of cells treated with cytostatic agents. The characteristic profile was similar for both cell lines tested (data not shown). Such a profile of the acidification rate curve might be an additional criterion pointing to the detection of cytostatic effects.

As our results suggest, there is a general difficulty to define the incubation time of choice for a chemosensitivity assay. The rank order of the effects of different cytostatic agents might vary among different incubation times. Cisplatin seemed to maximize its effect after a certain time (Fig. 3D), while oxaliplatin showed an earlier and more linear effect (Fig. 3F). For cases such as cisplatin, an effect measured with an assay of short incubation time might be underestimated. It is noteworthy that a test with a shorter incubation time is favorable since a longer incubation time might increase the risk of a contamination by microbes and nontumor cells.

Our further work will focus on the influence of nontumor cells and tumor heterogeneity on the measurement of tumor samples as well as the clinical validation of the chemosensitivity test. The validation will include a clinical study to

answer the main question of the predictive value of the test. We will further work on the application of the technology on target-specific drugs and their combination with cytostatic agents.

Acknowledgments

The authors thank CellControl's laboratory team, namely Sabine Hirsch, Angela Hruschka, Marika Lebar, Sylvia Pierfederici, Susanne Schmidkunz, and Susanne Zapf for expert technical assistance.

References

- Cooke, D., O'Kennedy, R., 1999. Comparison of the tetrazolium salt assay for succinate dehydrogenase with the cytosensor microphysiometer in the assessment of compound toxicities. *Anal. Biochem.* 274, 188–194.
- Cory, A.H., Owen, T.C., Barltrop, J.A., Cory, J.G., 1991. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* 3, 207–212.
- Culy, C.R., Clemett, D., Wiseman, L.R., 2000. Oxaliplatin: a review of its pharmacological properties and clinical efficacy in metastatic colorectal cancer and its potential in other malignancies. *Drugs* 60, 895–924.
- Huang, P., Chubb, S., Hertel, L.W., Grindey, G.B., Plunkett, W., 1991. Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res.* 51, 6110–6117.
- Johnson, G.E., Glaubiger, D.L., 1983. Correlation of cellular tritiated thymidine incorporation with soft agar clonogenicity in chemosensitivity testing of human neuroblastoma cells. *Cancer Treat. Rep.* 67, 163–168.
- Kern, D.H., Weisenthal, L.M., 1990. Highly specific prediction of antineoplastic drug resistance with an in vitro assay using suprapharmacologic drug exposures. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 582–588.
- Kramer, S.M., Carver, M.E., 1986. Serum-free in vitro bioassay for the detection of tumor necrosis factor. *J. Immunol. Methods* 93, 201–206.
- Lewin, B., 2000. *Genes VII*. Oxford University Press, New York.
- McConnell, H.M., Owicki, J.C., Parce, J.W., Miller, D.L., Baxter, G.T., Wada, H.G., Pitchford, S., 1992. The cytosensor microphysiometer: biological applications of silicon technology. *Science* 257, 1906–1912.
- Metzger, R., Deglmann, C.J., Hoerlein, S., Zapf, S., Hilfrich, J., 2001. Towards in-vitro prediction of an in-vivo cytostatic response of human tumor cells with a fast chemosensitivity assay. *Toxicology* 166, 97–108.
- Owicki, J.C., Parce, J.W., 1992. Biosensors based on the energy metabolism of living cells: the physical chemistry and cell biology of extracellular acidification. *Biosens. Bioelectron.* 7, 255–272.
- Parce, J.W., Owicki, J.C., Kercso, K.M., Sigal, G.B., Wada, H.G., Muir, V.C., Bousse, L.J., Ross, K.L., Sikic, B.I., McConnell, H.M., 1989. Detection of cell-affecting agents with a silicon biosensor. *Science* 246, 243–247.
- Salmon, S.E., Hamburger, A.W., Soehnen, B., Durie, B.G., Alberts, D.S., Moon, T.E., 1978. Quantitation of differential sensitivity of human-tumor stem cells to anticancer drugs. *N. Engl. J. Med.* 298, 1321–1327.
- Sevin, B.U., Peng, Z.L., Perras, J.P., Ganjei, P., Penalver, M., Averette, H.E., 1988. Application of an ATP-bioluminescence assay in human tumor chemosensitivity testing. *Gynecol. Oncol.* 31, 191–204.
- Wada, H.G., Owicki, J.C., Bruner, L.H., Miller, K.R., Raley-Susman, K.M., Panfili, P.R., Humphries, G., Parce, J.W., 1992. Measurement of cellular responses to toxic agents using a silicon microphysiometer. *AATEX* 1, 154–164.
- Waldenmaier, D.S., Metzger, R., Kischkel, F.C., 2001. Verfahren zur Prädiktion oder Prognose der Wirksamkeit einer Tumorbehandlung, Patent Number DE 10154540, Germany.
- Weisenthal, L.M., Marsden, J.A., Dill, P.L., Macaluso, C.K., 1983. A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors. *Cancer Res.* 43, 749–757.
- Wilbur, D.W., Camacho, E.S., Hilliard, D.A., Dill, P.L., Weisenthal, L.M., 1992. Chemotherapy of non-small cell lung carcinoma guided by an in vitro drug resistance assay measuring total tumour cell kill. *Br. J. Cancer* 65, 27–32.
- Xu, J.M., Song, S.T., Tang, Z.M., Jiang, Z.F., Liu, X.Q., Zhou, L., Zhang, J., Liu, X.W., 1999. Predictive chemotherapy of advanced breast cancer directed by MTT assay in vitro. *Breast Cancer Res. Treat.* 53, 77–85.

8.4 Lebenslauf

Name	Dirk Waldenmaier
Adresse	Reichenbachstr. 24 80469 München
Geburtstag	05.01.1974
Geburtsort	Berlin
Schulbildung	
Sept. 1980 - Juli 1984	Graubündenerschule, Rotbuchenschule, München
Sept. 1982- Juni 1993	Pestalozzi Gymnasium, München
Studium	
Okt. 1994	Beginn des Diplomstudiums der Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Breisgau. Schwerpunkte: Zellbiologie, Immunbiologie, Mikrobiologie, Betriebswirtschaftslehre
Mai 2000	Diplomprüfungen im Hauptfach Zellbiologie, Nebenfächern Immunbiologie, Mikrobiologie
Aug. 2000	Diplomprüfung im Nebenfach Betriebswirtschaftslehre
Okt. 2000 - Okt. 2001	Diplomarbeit bei der Firma CellControl Biomedical Laboratories AG, Martinsried: <i>„Etablierung eines HER2/neu Diagnostiktests auf der Grundlage sensorbasierender Technologien“</i>
Jan. 2002	Beginn der vorliegenden Dissertation am Department Biologie II der Ludwig-Maximilians-Universität, München unter Anleitung von Prof. Dr. E. H. Weiß. Durchführung der praktischen Arbeiten bei der Firma CellControl Diagnostics GmbH & Co. KG, Martinsried unter Anleitung von Dr. F. C. Kischkel.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben meinen Dank aussprechen:

Frau Prof. Dr. E. Weiß danke ich vielmals für die Erstellung des Erstgutachtens sowie für ihr großes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Dr. F. C. Kischkel danke ich für die Bereitstellung des Themas, sowie für die kontinuierliche, und sehr gute Betreuung meiner Arbeit. Ich danke ihm für zahlreiche Diskussionen, denen es an Tiefgang sicher nicht fehlte.

Ich danke dem gesamten CellControl-Team für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Atmosphäre. Für die praktische Unterstützung und ihr Einbringen bei der Zusammenstellung und Korrektur meiner Arbeit danke ich im Besonderen Dr. A. Babarina. Als gute Seele im Labor sorgte sie stets für eine gute Zusammenarbeit. Dr. N. Behnke danke ich dafür, mir das Vertrauen entgegengebracht zu haben, in seiner Firma an Themen mitzuarbeiten, die sich außerhalb des Labors abspielten. Diese Aktivitäten stellten eine enorme Motivationsquelle für mich dar. A. Nawrath danke ich für ihre Korrekturen und ein angenehmes Rahmenprogramm mit klasse Kaffee.

Ich danke meiner Familie für die treue Begleitung während und die entspannende Ablenkung von der Arbeit nach mühsamen Phasen. Stets wusste ich eine enorme Energiequelle im Hintergrund.

Zu guter Letzt danke ich Nina, die in einer äußerst bewegten Zeit niemals müde wurde, sich meine Geschichten anzuhören. Ob es um Moleküle ging, die man nicht sieht, um zwischenmenschliche Spannungen die manche nicht spüren, um Motivationsengpässe oder Höhenflüge. Nina verstand es stets, mir wieder auf die Beine helfen und mich am Boden zu halten.