

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie
(Direktor Univ. Prof. Dr. med. Martin Burchardt)
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Tumorbiologische Charakterisierung der Tumorprogressions-
faktoren miR-1 und HSP27 im CAM-Modell**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)
der Universitätsmedizin
der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
2017

vorgelegt von:
Arik Reuter
geboren am: 12.04.1996
in: Ludwigslust

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Max P. Baur

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. M. Stope

2. Gutachter: PD Dr. rer. nat. M. Cronauer

Ort, Raum: per Videokonferenz

Tag der Disputation: 15.03.2021

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis.....	V
II. Abbildungsverzeichnis.....	VI
III. Tabellenverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden.....	7
2.1 Material	7
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	7
2.1.2 Chemikalien und kommerzielle Lösungen	10
2.1.3 Puffer und Lösungen	12
2.1.4 Enzyme	13
2.1.5 Antikörper	13
2.1.6 Primer.....	14
2.1.7 Zelllinien & biologische Materialien.....	14
2.1.8 Medien und Zusätze	14
2.2 Zellbiologische Methoden	16
2.2.1 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen	16
2.2.2 Passagieren der Zellen.....	16
2.2.3 Zellzahlbestimmung mittels CASY TT Cell Counter	17
2.2.4 Aussaat und Ernte von Zellen	17
2.3 Proteinbiochemische Methoden	18
2.3.1 Protein-Präparation	18
2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	18
2.3.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	19
2.3.4 Western Blot.....	20
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	21
2.4.1 RNA-Extraktion.....	21
2.4.2 Reverse Transkription	21

2.4.3	Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	22
2.5	HET-CAM-(hen's egg test chorioallantoic membrane)-Assay	23
2.5.1	Brüten der Eier	23
2.5.2	Präparation der Eier	23
2.5.3	Inokulation der Tumoren auf der CAM.....	24
2.5.4	Fotodokumentation und Bildauswertung	24
2.5.5	Tumorpräparation und -lagerung.....	25
2.6	Statistik	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Effekt der Mikro-RNA miR-1 und des Hitzeschockproteins HSP27..... auf die Tumorprogression im <i>in vitro</i> -Zellkulturmodell.....	26
3.2	Tumorwachstum im 3D-Sphäroidmodell und auf der CAM	27
3.3	Interaktion der Tumorzellen mit künstlicher Extrazellulärmatrrix	28
3.4	Einfluss der Ringeigenschaften auf das Tumorwachstum.....	30
3.5	Entwicklung einer Methode zur Induktion des Tumorwachstums..... auf der CAM unter Berücksichtigung der vorherigen Versuche	32
4	Diskussion.....	42
5	Zusammenfassung	51
6	Anhang	52
7	Literaturverzeichnis.....	53

I. Abkürzungsverzeichnis

A.bidest	zweifach destilliertes Wasser	MRT	Magnetresonanztomografie
APS	Ammoniumpersulfat	NFκB	Nekrosefaktor Kappa B
AR	Androgenrezeptor	n.Pröp.	nach Präparation
CAM	Chorioallantoismembran	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
cDNA	komplementäre DNA	PC	Prostatakarzinom
CRPC	kastrationsresistentes PC	PSA	Prostata-spezifisches Antigen
DEPC	Diethylpyrocarbonat	qRT-PCR	quantitative real-time PCR
DNA	Desoxyribonukleinsäure	rel.	relativ
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat	rcf	relative centrifugal force
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	RIPA	Radioimmunopräzipitations-Assay
DRU	digital rektale Untersuchung	RNA	Ribonukleinsäure
EET	Embryo-Entwicklungstag	RNase	Ribonuklease
EGF	endothelial growth factor	RT	Raumtemperatur
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm	SD	Standardabweichung
FGF	fibroblaste growth factor	siRNA	short interfering RNA
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	SPF	spezifiziert pathogenfrei
GnRH	Gonadotropin-releasing Hormon	TGFB1	transforming growth factor beta 1
HET-CAM	hen's egg test chorioallantoic membrane	TNM	Tumor, Nodus, Metastasen
HGFR	hepatocyte growth factor receptor	VEGF	vascular endothelial growth factor
HSP	Hitzeschockprotein	v.Pröp	vor Präparation
MF	Mantelfläche	v/v	Volumen pro Volumen
miR	Mikro-RNA	w/v	Masse pro Volumen
mRNA	Messenger RNA	Zp.	Zeitpunkt

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: HSP27-Expression von PC-3- und PC-3-HSP27-Zellen und.....	
miR-1-Expression von LNCaP- und LNCaP-miR-1-Zellen	26
Abbildung 2: Wachstumskinetiken von LNCaP- und LNCaP-miR-1- sowie.....	
von PC-3- und PC-3-HSP27-Zellen.....	27
Abbildung 3: Transfizierte PC-Zelllinien im 3D-Sphäroidmodell und auf	
der CAM	28
Abbildung 4: Tumorwachstum auf der CAM mit Extrazellulärmatrrix.....	29
Abbildung 5: Tumorwachstum nach Vorbehandlung der CAM	30
Abbildung 6: Effekte unterschiedlicher Ringparameter.....	31
Abbildung 7: Effekte der Silikonringe auf die CAM	31
Abbildung 8: Agaroseringe auf der CAM	32
Abbildung 9: Tumorwachstum aller vier PC-Zelllinien auf der CAM	33
Abbildung 10: Flächenbestimmung der Tumoren (ImageJ).....	36
Abbildung 11: Volumenberechnung der Tumoren	38
Abbildung 12: Einfluss der Tumoren auf die Gefäßausrichtung	39
Abbildung 13: Bestimmung der relativen Gesamtfläche der Gefäße in	
der Aufsicht (ImageJ)	40

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pipettierschema zur Proteinbestimmung nach Bradford.....	19
Tabelle 2: Pipettierschema für SDS-Gel.....	20
Tabelle 3: Master-Mix für STEM-LOOP RT-PCR	22
Tabelle 4: Master Mix für qRT-PCR	22
Tabelle 5: qRT-PCR-Protokoll.....	23
Tabelle 6: Auswertung der optimierten Methode zur Induktion des Tumorwachstums auf der CAM.....	35
Tabelle 7: Flächenbestimmung der Tumoren (ImageJ).....	36
Tabelle 8: Flächenberechnung der Tumoren.....	37
Tabelle 9: Volumenberechnung der Tumoren	38
Tabelle 10: relative Gesamtfläche der Gefäße der CAM in der Aufsicht	41
Tabelle 11: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms [73].....	52

1 Einleitung

Das Prostatakarzinom (PC) stellt die häufigste Tumorerkrankung des Mannes dar und führt von allen Krebserkrankungen am häufigsten zum Tod. So lassen sich 1-2% aller Todesfälle des Mannes auf das PC zurückführen [1]. Ein Hauptrisikofaktor für die Erkrankung bildet neben der genetischen Disposition und der Ethnizität das Alter: 6 von 10 PC werden mit durchschnittlich 65 Jahren diagnostiziert [2].

Die Einteilung des PC und seine Therapiemöglichkeiten erfolgen gemäß der TNM-Klassifikation und orientieren sich an der Größe bzw. dem Stadium des Tumors sowie dem Vorhandensein von Lymphknoten- und Fernmetastasen (siehe Anhang) [3]. Die Behandlungen erfolgen nach Risikoabschätzung und unter Berücksichtigung des Patientenwunsches, wobei Faktoren wie das Patientenalter, das Tumorstadium, der Serum-PSA-Spiegel (PSA, prostataspezifisches Antigen) und der Gleason-Score Beachtung finden.

Für Patienten mit einem lokal begrenzten, klinisch nicht-metastasierten Prostatakarzinom (T1-2 N0 M0) bestehen die Optionen der lokalen Therapie mit kurativer Intention, der aktiven Überwachung (Active Surveillance) sowie des abwartenden Verhaltens bzw. der langfristigen Beobachtung mit sekundärer symptomorientierter Therapie (Watchful Waiting) [3]. So ist beispielsweise für viele harmlose low-grade Tumoren (Gleason Score ≤ 6) das Therapiekonzept der aktiven Überwachung (Active-Surveillance) angemessen, welches regelmäßige engmaschige Kontrollen in Form von digital rektalen Untersuchungen (DRU), Serum-PSA-Bestimmungen, Biopsien und Magnetresonanztomografien (MRT) beinhaltet und die Belastung des Patienten gering hält. [4].

Beim lokal fortgeschrittenen PC (T3-4 N0 M0) sind radikalere Methoden angezeigt. Diese umfassen v.a. die Prostatektomie, die externe Strahlentherapie sowie die Brachytherapie [1, 3]. Kommt es zur Metastasierung des PC (T1-4 N1 und/oder M1), können gegenwärtig lediglich palliative, die Lebensqualität verbessernde Maßnahmen ergriffen werden. Das Fortschreiten der Erkrankung wird hierbei meist durch Hormonentzug verzögert. Dies kann sowohl operativ durch die Entfernung der Hoden als auch medikamentös geschehen. Letzteres erfolgt beispielsweise durch die Gabe von Gonadotropin-releasing Hormon (GnRH)-Antagonisten (Abarelix, Degarelix), GnRH-Agonisten (u.a. Buserelin,

Goserelin, Leuprorelin) oder Antiandrogene (Flutamid, Bicalutamid, Cyproteronacetat). Im Falle der Hormonablation entwickelt sich jedoch nahezu immer nach 12-33 Monaten ein kastrationsresistentes PC (castration resistant prostate cancer, CRPC), welches unbehandelt innerhalb von einem Jahr zum Tod des Patienten führt [3, 5]. Dies unterstreicht deutlich die Relevanz der Erforschung von Resistenzmechanismen und der Weiterentwicklung von Wirkstoffen zur Behandlung des PC.

Das Verständnis über die Genese und Progression des PC hat sich in den letzten Jahrzehnten immens vergrößert. Dabei spielt der Androgen-Rezeptor (AR), der zu den Steroidhormon-Rezeptoren gehört, eine wichtige Rolle. Durch die Bindung von Testosteron bzw. Dihydrotestosteron wechselt er von seinem inaktiven in den aktiven Zustand, wobei er dann die Transkription AR-abhängiger Gene und somit die Proliferation der Prostatazellen vermittelt. [6]. Da folglich Androgene die Voraussetzung für das Wachstum und Überleben maligner Prostatazellen bilden, basieren derzeitige Behandlungen der fortgeschrittenen PC auf dem Entzug dieser Hormone durch chemische oder chirurgische Kastration sowie der Applikation von Antiandrogenen [7]. Der Benefit, welcher für den Patienten durch die Inaktivierung der AR-Funktionalität entsteht, ist jedoch zeitlich begrenzt. Viele Tumoren entwickeln während der Behandlung eine Chemoresistenz [8]. Verkürzte Isoformen des AR, entstanden durch Mutationen, alternatives Splicing und proteolytische Spaltung, verursachen neben anderen Faktoren Resistenzen in der Anti-Krebstherapie [9]. Die Entdeckung komplexer, den AR regulierender Signalkaskaden veränderte mehr und mehr die auf den AR gezielte Therapie. Die Entwicklung neuer Medikamente, welche Co-Faktoren dieser AR-Signalkaskaden inhibieren, nimmt seither an Relevanz für die heutigen PC-Behandlungsoptionen zu [8].

Durch Untersuchungen am AR-Protein-Komplex konnten bereits mehr als 130 AR-bindende Proteine und Co-Regulatoren identifiziert werden. Besonders Hitzeschockproteine (HSP) scheinen die Modulation der Expression und Aktivität des AR zu beeinflussen [10]. Diese sogenannten Chaperone sind stressinduzierte Faktoren, die das Überleben der Zelle durch die Faltung und Stabilisierung anderer Proteine sicherstellen. Solche Situationen entstehen in der Zelle z.B. durch oxidativen Stress, Hypoxie oder Hitzeschock. Doch auch radio- und

chemotherapeutische Behandlungen führen zu einer Induktion dieser Proteine und somit zu erhöhten HSP-Expressionslevel in malignen Geweben [11]. Studien belegen, dass sie auch im PC hochreguliert werden und demzufolge ihre Beteiligung an der Entstehung, Progression und Resistenzentwicklung jener Tumoren [11, 12].

Frühere Arbeiten postulieren zytoprotektive Eigenschaften des kleinen Hitzeschockproteins HSP27, indem es Prozesse wie Zellzykluskontrolle, Zellmotilität, Remodeling des Zytoskeletts und Apoptose kontrolliert [13, 14]. Zudem reguliert dieses Chaperone eine Vielzahl von AR-Funktionen wie seine Stabilität, seinen Transport und seine Transaktivierung [15, 16]. Des Weiteren beeinflusst es die Expression dieses Rezeptors auf mRNA-Syntheselevel. Eine Suppression von HSP27 in der AR-positiven PC-Zelllinie LNCaP durch HSP27-spezifische siRNA, verminderte die AR-Expression sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene. Die Überexpression von HSP27 in AR-negativen PC-3-Zellen erhöhte die AR-mRNA-Transkriptionsrate [8]. Indem HSP27 die Expression verkürzter AR-Isoformen beeinflusst, könnte es grundlegende Bedeutung in der Entwicklung von Chemoresistenzen des PC haben. Seine Überexpression in der PC-Zelllinie 22Rv1 führte zur vermehrten Expression verkürzter AR-Isoformen, sein Knock-Down zu deren Verminderung [8].

Viele Aspekte rund um HSP27 sind jedoch bislang noch nicht genauer beschrieben. Noch unbekannt sind beispielsweise seine Freisetzung und die Effektor-kaskaden [17, 18]. Bereits festgestellt wurde, dass sezerniertes HSP27 Angiogenese induziert und Effekte auf die Regulation der NFκB-Signalkaskade hat [19–21]. Zudem supprimiert es die Freisetzung pro-inflammatorischer und fördert die anti-inflammatorischer Faktoren [22]. Offensichtlich ist es in der Lage weitere Tumorprogressionsfaktoren zu regulieren [14].

Einen dieser Tumorprogressionsfaktoren stellt die Mikro-RNA miR-1 dar. Mikro-RNAs sind kleine, nicht kodierende RNAs einer Länge von rund 22 Nukleotiden, welche mit einer Vielzahl von mRNAs interferieren und so die Fähigkeit besitzen, die Genexpression auf posttranskriptionaler Ebene zu steuern [23, 24]. Auch sie beeinflussen verschiedene Prozesse der Tumorgenese wie Proliferation, Migration, Metastasierung und Apoptose und scheinen Funktionen hinsichtlich der Resistenzentwicklung nach chemotherapeutischen Behandlungen zu haben. Ob

sie pro-onkogene oder tumorsuppressive Eigenschaften besitzen, unterscheidet sich in Abhängigkeit von der Tumorentität [25–27].

Im Gegensatz zu HSP27 wird miR-1 in vielen malignen Tumorentitäten herunter reguliert [28–30]. Sie besitzt tumorsuppressive Eigenschaften, indem sie elementare Vorgänge wie Proliferation, Zellmotilität sowie Angiogenese inhibiert und Prozesse wie die Apoptose stimuliert [31–35]. So wiesen beispielsweise Nasser et al. nach, dass miR-1 in der Lage ist, den pro-onkogenen hepatocyte growth factor receptor (HGFR) zu unterdrücken, auch bekannt als c-MET Rezeptor Tyrosinkinase [36]. Im PC interagiert miR-1 mit dem transforming growth factor beta 1 (TGFB1) und hemmt hierdurch seine Proliferation [14]. Ferner vermindert sie die Expression sowohl der langen als auch kurzen Isoformen des AR, weshalb sie voraussichtlich auch in der Resistenzentwicklung der Tumoren involviert ist [25].

Genauere Untersuchungen zeigten, dass das basale Proteinlevel von HSP27 negativ mit der miR-1-Expression in PC-Zelllinien korreliert. Da Mikro-RNAs Signal- und Effektorkaskaden der Chemoresistenz regulieren, könnten maligne Zellen insofern davon profitieren, als dass sie mittels HSP27-gesteuerter miR-1-Suppression die Medikamentensensitivität beeinflussen [14].

Mithilfe von *in vitro*-Experimenten wurden beide Faktoren bereits umfangreich analysiert [9, 14, 25, 37]. Jedoch können die Ergebnisse dieser Untersuchungen nicht ohne Weiteres auf den Menschen übertragen werden. Prozesse wie Stoffwechselinteraktionen und Metabolisierungsvorgänge können in der Zellkultur nicht simuliert werden. Aus diesem Grund ist es erforderlich, die Resultate in Modellen zu untersuchen, die diese Mechanismen berücksichtigen.

Der HET-CAM-Assay (hen's egg test chorioallantoic membrane) bietet jedoch solche Untersuchungsvoraussetzungen. Die Chorioallantoismembran ist eine extraembryonale Membran, die zwischen dem vierten und fünften Entwicklungstag aus der Fusion des Chorions und der Allantois gebildet wird [38]. Ihre Hauptfunktion ist der Gasaustausch des Embryos, weshalb sie bereits sehr früh stark durchblutet wird und somit eine hohe Dichte an Blut- und Lymphgefäßen aufweist. Da sie zudem leicht zugänglich ist, dient sie v.a. als Modell zur Untersuchung der Angiogenese [39]. Aufgrund des noch nicht vollständig entwickelten Immunsystems des Hühnerembryos ist es möglich, Tumoren auf der

CAM zu inokulieren und Aspekte des angiogenen und metastatischen Potenzials verschiedener Malignitäten zu evaluieren [40].

Der HET-CAM-Assay, entwickelt 1985 von Lüpke, fand erstmals Anwendung als Alternative zum Irritationstest am Kaninchenauge [41]. Heutzutage wird er in diversen Forschungsbereichen genutzt, die onkologische, biologische sowie pharmazeutische Untersuchungen umfassen [40]. Wie *in vitro*-Experimente ist er einerseits leicht und rasch durchzuführen und andererseits vergleichsweise kostengünstig. Überdies gestattet er Untersuchungen in einem physiologischen Umfeld, wie dies sonst nur in Tiermodellen möglich ist. Um die Anzahl der an Säugetieren durchgeführten Versuche zu reduzieren finden befruchtete Hühnereier Anwendung. Da sie am achten Tag der Embryogenese verwendet werden und das Nervengewebe sowie das Schmerzempfinden der Hühnerembryonen zu diesem Zeitpunkt noch nicht entwickelt sind, zählt er nicht zu den Tiermodellen [42].

Der Tumorsuppressor Mikro-RNA miR-1 und das onkogene Hitzeschockprotein HSP27 sind wichtige Regulatoren der Progression solider Tumoren. Sie steuern maligne Prozesse wie Zellwachstum, Apoptose und Metastasierung. Grundlegende molekulare Mechanismen beider Faktoren wurden in den letzten Jahren in *in vitro*-Zellkultursystemen intensiv erforscht. Diese Daten sollen an einem *in vivo*-Modell evaluiert und um weitere tumorbiologisch relevante Erkenntnisse erweitert werden.

Das befruchtete Hühnerei ist ein experimentelles Modellsystem, das einem Säugetierorganismus vergleichsweise nahekommt und die Kultivierung von Säugetierzellen auf der Chorioallantoismembran (CAM) ermöglicht. Die Zellen werden durch das Gefäßsystem des Hühnerembryos versorgt und gestatten Untersuchungen in einem physiologischen Umfeld, die in Zellkulturansätzen nicht möglich wären. Damit kombiniert das CAM-Modell die Vorteile von Tiermodellen mit denen eines Zellkultursystems, wird aber aufgrund der niedrigen Entwicklungsstufe und noch fehlender Schmerzperzeption des Hühnerembryos nicht als Tierversuch eingestuft.

Da es bisher kaum Untersuchungen zur zellulären Wirkung von molekularen Faktoren wie Hitzeschockproteinen oder Mikro-RNAs im CAM-Modell gibt, soll dieses etabliert und für ebensolche experimentellen Fragestellungen eingesetzt

werden. Der Schwerpunkt dieser Analysen liegt auf angiogenetischen Mechanismen, die sich in Zellkultursystemen nicht oder nur indirekt untersuchen lassen. Zwei Projektteile stehen im Mittelpunkt der geplanten Untersuchungen: Zum einen werden zelluläre Wirkungen der Mikro-RNA miR-1 im physiologischen Kontext des CAM-Modells charakterisiert. Darüber hinaus soll der Einfluss des Hitzeschockproteins HSP27 auf die Angiogenese beim PC analysiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät / Verbrauchsmaterial	Hersteller
3M™ OP-Masken	3M Deutschland (Neuss)
15ml Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
50ml Falcon BD	Biosciences (Heidelberg)
96-Well-Rundbodenmikroplatte, unbeschichtet	Corning Inc. (Tewksbury, USA)
Absaugvorrichtung Integra Vacusafe	Integra Biosciences (Zizers, Schweiz)
Absaugvorrichtung VACUSIP	Integra Biosciences (Zizers, Schweiz)
BD Discardit™ - 2-teilige Spritzen 10 ml	Becton Dickinson (Heidelberg)
BD Microlance 3™ Kanülen grün	Becton Dickinson (Heidelberg)
Brutmaschine Thermo de Luxe 200	J. Hemel Brutgeräte (Verl)
Brutmaschine Thermo-Star 310	J. Hemel Brutgeräte (Verl)
Brutschrank function line	Heraeus Instruments (Hanau)
Canon EOS 500D DS126231	Canon (Krefeld)
CASY Model TT – Cell counter and Analyzer	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
CFX96™ Real-Time-PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories (München)
ChemiDoc XRS System	Bio-Rad Laboratories (München)
Elektrophoresesystem Mini-PROTEAN® Tetrasystem	Bio-Rad Laboratories (München)
EVOS XL Cell Imaging System	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Filterpapier	Whatman (Dassel)
Filterspitzen SafeSeal Tips Professional	VWR (Leuven, Belgien)
Fixomull® transparent	BSN medical GmbH (Hamburg)
Gewebekulturflasche 75 cm ²	Sarstedt (Nümbrecht)
Gewebekulturflasche 175 cm ²	Sarstedt (Nümbrecht)
Gewebekulturplatten	Sarstadt (Nümbrecht)

Glaspasteurpipette	VWR International (Darmstadt)
Heizblock QBT 1	CLF Laborgeräte (Emersacker)
HSB 018-11, Folienschere	Karl Hammacher (Solingen)
Inkubator Nuair TM US Autoflow	NuAire (Plymouth, USA)
Invertierter	VWR International (Darmstadt)
Kapillarspitze MultiFlex Round Tip	BioScience (Salt Lake City, USA)
Klebefolie BZO Seal Film für PCR	Biozym (Wien, Österreich)
Locheisen-Satz 14-teilig	BGS technic (Wermelskirchen)
Stereomikroskop MZ75	Leica Camera (Wetzlar)
Magermilchpulver	Sucofin® (Zeven)
Magnetrührer IKA RH basic 2	VWR International (Darmstadt)
Microlance 3 TM Kanülen	Becton Dickinson (Heidelberg)
Mikroskop IT400+	VWR International (Darmstadt)
Mikrozentrifuge-Rotilabo®	Carl Roth (Karlsruhe)
Miniwippe-Schüttler MR1	BioSan (Riga, Lettland)
MW 7809 Mikrowelle	Severin Elektrogeräte (Sundern)
Nitrilhandschuhe Micro-Touch® Nitra-Tex®	Ansell Healthcare (Brüssel, Belgien)
Nitrozellulose-Membran PROTEAN®	Whatman (Dassel)
Novaflex High Intensity Source for Fiber Otic Illumination	World Precision Instruments (Sarasota, USA)
Parafilm M®	Bemis (Wisconsin, USA)
PCR-96-Well TW-MT-Platte weiß	Biozym (Wien, Österreich)
pH-Meter FiveEasy TM FE20	Mettler-Toledo (Schwerzenbach, Schweiz)
Pinzette RS, spitz	Nordwest Dental (Münster)
Pinzette RS, stumpf	Nordwest Dental (Münster)
Pipettierhilfe peqMATE	Peqlab (Erlangen)
Pipettensatz, 0,1-1000 µl	Sartorius AG (Göttingen)
Pipettensatz, 0,1-1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Powerlux Egg Tester Input: 4.5V-DC	Lyon Technologies Inc. (Chula Vista, USA)

PowerPack™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories (München)
Reaktionsgefäß 0,5 ml, 1,5ml, 2,0 ml, Safe Seal	Sarstedt (Nümbrecht)
Rollmischer RS-TR 5	Phoenix Instruments (Garbsen)
Sartorius BP analytical balances Model BP221S Waage	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Schutzhandschuhe Sterling Nitrile KC300	Kimberly-Clark (Roswell, USA)
SDS-PAGE Zubehör Mini-PROTEAN® System	Bio-Rad Laboratories (München)
Serologische Pipette 1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt (Nümbrecht)
SmartHeat SLT Heaters	Minco (Minneapolis, USA)
Spektralphotometer Nano-Drop 2000c	Thermo Scientific (Wilmington, USA)
Sterilbank HERA safe	Heraeus Instruments (Hanau)
Sterilbank safe 2020	Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA)
Tecan readers with i-control microplate reader software / infinite M200 Pro	Tecan Group Ltd, Männedorf (Schweiz)
Thermocycler T3000	Biometra (Göttingen)
Thermoschüttler TS-100	BioSan (Riga, Lettland)
Trans-Blot® SD semi-dry transfer cell	Bio-Rad Laboratories (München)
Trokarkatheter L28, Ø: 8 mm, 10 mm	Vygon (Aachen)
Überkopfschüttler Multi Bio RS-24	BioSan (Riga, Lettland)
Ultraschallgerät Transsonic 460/H	Elma (Singen)
Vortex Mixer peqTWIST	Peqlab (Erlangen)
Vortex Mixer RS-VA10	Phoenix Instrument (Garbsen)
Wasserbad W14	Grant Instruments (Cambridge, Großbritannien)
Wippschüttler UNITWIST-RT	Armin Baack (Schwerin)
Zellkulturplatte CELL + 6 well	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturplatte CELL + 24 well	Sarstedt (Nümbrecht)
Zentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Centrifuge 5810	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Mikro 20	Hettich Lab Technology (Tuttlingen)

2.1.2 Chemikalien und kommerzielle Lösungen

Chemikalie	Hersteller
1,4-Dithiothreitol	Carl Roth (Karlsruhe)
1-Bromo-3-Chloropropan	Sigma-Aldrich (Steinheim)
2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth (Karlsruhe)
2-Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Agarose Standard	Carl Roth (Karlsruhe)
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat	Carl Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Feinchemie K.-H. Kallies KG (Sebnitz)
Calciumchlorid	(Darmstadt)
Complete™ Mini, EDTA-frei	Roche Diagnostics (Mannheim)
Coomassie® Brilliant Blue G 250	Fluka (Buchs, Schweiz)
D(+)-Saccharose	Carl Roth (Karlsruhe)
Desoxycholsäure Natriumsalz	Carl Roth (Karlsruhe)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth (Karlsruhe)
Dikaliumhydrogenphosphat	Carl Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth (Karlsruhe)
Essigäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycerol	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycerol-2-Phosphat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe)
Guanidinhydrochlorid	AppliChem (Darmstadt)
Harnstoff	Carl Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumacetat	Carl Roth (Karlsruhe)
Luminol Natriumsalz	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Matrigel® Matrix	Corning Inc. (Tewksbury, USA)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumacid	Merck (Darmstadt)

Natriumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumvanadat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
ortho-Phosphorsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ponceau-S	Carl Roth (Karlsruhe)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	SERVA Electrophoresis (Heidelberg)
Solidofix® Kältespray	Carl Roth (Karlsruhe)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe)
Thioharnstoff	Merck (Darmstadt)
Trichloressigsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Triton® X-100	Ferak (Berlin)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth (Karlsruhe)
Trypsin Sequencing Grade	Promega (Madison, USA)
Tween® 20	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Wasserstoffperoxid	Carl Roth (Karlsruhe)

Kommerzielle Lösung

10x Rotiblock-Konzentrat	Carl Roth (Karlsruhe)
Geneticindisulfat (G418)	Carl Roth (Karlsruhe)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
peqGOLD TriFast™	Peqlab (Erlangen)
Puromycin	Carl Roth, Karlsruhe
Sensimix SYBR Hi-ROX	Bioline (Luckenwalde)
SuperSignal™ West Dura	Thermo Scientific (Rockford, USA)

2.1.3 Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Herstellung
10% Sodiumdodecylsulfat (SDS)	10% w/v SDS-Pellets
10x Laufpufferstocklösung	192 mM Glycin; 24,8 mM Tris; pH 8,3
1x SDS-Laufpuffer	10% v/v 10x Laufpuffer; 0,1% v/v 10% SDS
10x Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	1,37 M NaCl; 26,8 mM KCl; 101,1 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; 17,6 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
1x Roti Blockierlösung	10% v/v 10x Rotiblock-Konzentrat
10x Tris-buffered saline (TBS)	0,2 M Tris; 1,5 M NaCl; pH 7,6
1x Tris-buffered saline mit Tween 20 (TBS-T)	10% v/v 10x TBS; 0,1% v/v Tween 20
5x Proteinladepuffer	156 mM Tris, pH 6,8; 25% v/v Glycerol; 5% v/v SDS; 12,5% v/v β-Mercaptoethanol; 0,2% w/v Bromphenolblau
Antikörperlösung	5% w/v BSA; 10% v/v 10x TBS; 0,001% v/v Tween 20
Bradford-Reagenz	10% w/v Coomassie® Brilliant Blue G 250; 5% v/v Ethanol; 8,5% v/v H ₃ PO ₄
BSA-Standard in 2D Lysepuffer	100% w/v BSA in 2D Lysepuffer
BSA-Standard in A.bidest	100% w/v BSA in A.bidest
CASY ton	154 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; in A.bidest
Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser	0,1% v/v DEPC, autoklaviert
ECL-Lösung A	25% w/v Luminol Natriumsalz; in 0,1 M Tris; pH 8,6
ECL-Lösung B	110% w/v para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO
Elutionspuffer	200 mM Glycin; 0,2% w/v SDS; 0,1% v/v Tween 20; in 100 mM Tris-HCl; pH 6,8
Guanidinhydrochlorid	0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95% Ethanol
Home-Made Solution	90,99% v/v ECL-Lösung A, 0,027% v/v 30% H ₂ O ₂ , 9,088% v/v ECL-Lösung B
Isotone Natriumchloridlösung 0,9%	B. Braun (Melsungen)

Braun	
Milch-Block	5 ml 1xTBS-T; 5g Magermilchpulver
Poly-L-Lysin Solution	0,01% w/v Poly-L-Lysin in sterilem Wasser
Ponceau-S	0,2% w/v Ponceau S; 3% v/v Trichloressigsäure
RIPA-Lysepuffer-Gebrauchslösung	67% v/v Lysepuffer-Stammlösung; 1 mM Na ₃ VO ₄ ; 20 mM NaF; 20 mM Glycerol-2-Phosphat; 0,1 mM PMSF; 20% w/v Complete™ Mini EDTA-frei
RIPA-Lysepuffer-Stammlösung	50 mM Tris (pH 7,5); 5 mM EDTA (pH 8,0); 150 mM NaCl; 10 mM K ₂ HPO ₄ ; 10% v/v Glycerol; 1% v/v Triton X-100; 0,05% v/v SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris, pH 6,8
Transferpuffer	20% v/v Methanol; 10% v/v 10x Laufpufferstocklösung
Trenngelpuffer	1,5 M Tris, pH 8,8

2.1.4 Enzyme

Enzym	Hersteller
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega (Mannheim)
RiboLock™ RNase	Thermo Scientific (Rockford, USA)

2.1.5 Antikörper

Primärantikörper	Gebrauchs- verdünnung	Hersteller
Anti-HSP27 mouse	1:5000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
Anti-GAPDH rabbit	1:10000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
Sekundärantikörper		
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	1:5000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	1:5000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)

2.1.6 Primer

Primer für qRT-PCR	Sequenz (5' → 3')
miR1 SLOOP	GTCTGATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT, GCACTGGATACGACATACAT
U6 SLOOP	GTCATCCTTGCGCAGG
miR1 FOR	GCCCGCTGGAATGTAAAGAAGTATG
Universal-miR REV	GTGCAGGGTCCGAGGT
U6 FOR	CGCTTCGGCAGCACATATAC
U6 REV	AGGGGCCATGCTAATCTTCT

2.1.7 Zelllinien & biologische Materialien

Zelllinie	Hersteller
LNCaP	American Type Culture Collection (Manassas, USA)
LNCaP-miR-1	Stope et al.
PC-3	American Type Culture Collection (Manassas, USA)
PC-3-HSP27	Stope et al.

Biologische Materialien

SPF Bruteier	Valo BioMedia (Osterholz- Scharmbeck)
--------------	--

2.1.8 Medien und Zusätze

Produkt	Hersteller / Herstellung
10x Trypsin-EDTA 0,5/0,2 % in DPBS	PAN Biotech (Aidenbach)
2x Trypsin	20% v/v 10x Trypsin-EDTA in DPBS
DPBS	PAN Biotech (Aidenbach)
Einfriermedium	70% v/v RPMI 1640 mit Phenolrot 20% v/v FCS 10% v/v DMSO
Fetales Rinderserum (FCS)	Invitrogen (Darmstadt)
Penicillin/Streptomycin	10000 U/ml Penicillin 10 mg/ml Streptomycin / PAN Biotech

	(Aidenbach)
Pyruvat	PAN Biotech (Aidenbach)
Medium RPMI 1640 mit Phenolrot	PAN Biotech (Aidenbach)
Vollmedium (RPMI+ / + / +)	RPMI 1640 mit Phenolrot 1% Penicillin/Streptomycin 1% Pyruvat 10% FCS (hitzeinaktiviert)

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Die für diese Arbeit verwendeten PC-Zelllinien LNCaP, LNCaP-miR-1, PC-3 und PC-3-HSP27 wurden zur längerfristigen Lagerung in niedriger Passage bei -140°C eingefroren. Hierfür wurden die Zellen mit Trypsin aus der jeweiligen T75 Zellkulturflasche gelöst, in Vollmedium aufgenommen und durch Zentrifugation (1000U/min, 5min) pelletiert. Anschließend wurden sie in 3ml Einfriermedium resuspendiert und mithilfe des CASY TT Cell Counters gezählt. Pro Kryovial wurden 3×10^6 Zellen zunächst bei -80°C und anschließend bei -140°C gelagert.

Das Auftauen der Zellen erfolgte bei 37°C . Die flüssige Zellsuspension wurde in 8ml Vollmedium aufgenommen und schließlich zentrifugiert (1000U/min, 5min). Nachdem der entstandene Überstand verworfen wurde, konnte das Pellet in 3ml Vollmedium gelöst und resuspendiert werden. Die Zellsuspension wurde in der Folge in eine T75-Zellkulturflasche mit 17ml vorgelegtem Vollmedium überführt und bei 37°C , 5% CO_2 und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.2.2 Passagieren der Zellen

Das Passagieren aller vier Zelllinien erfolgte zweimal wöchentlich. Hierzu wurde zuerst die Konfluenz der jeweiligen T75-Zellkulturflasche lichtmikroskopisch geprüft. Waren 80-90% erreicht, wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Flasche mit 10ml DPBS gewaschen, um nicht anhaftende Zellreste zu beseitigen. Nach Zugabe von 1ml 2x Trypsin wurden die Zellen bei 37°C , 5% CO_2 und gesättigter Luftfeuchtigkeit für 3min inkubiert. Hierdurch lösten sich die adhärenen Zellkontakte und mittels Vollmedium weitere Zellreste, die wiederum der Suspension hinzugeführt wurden. Im Falle von LNCaP- und LNCaP-miR-1-Zellen folgte ein Zentrifugationsschritt (1000U/min, 5min). Der entstandene Überstand wurde verworfen und das verbliebene Zellpellet mit weiterem Vollmedium im Umsetzungsverhältnis 1:3 bis 1:5 gelöst und resuspendiert. Schließlich wurde 1ml der entstandenen Lösung in eine mit 19ml vorgelegtem Vollmedium gefüllte T75-Zellkulturflasche überführt.

Dasselbe Verfahren geschah mit den PC-3 und PC-3-HSP27-Zellen, jedoch ohne Zentrifugation. Das Umsetzungsverhältnis lag hier bei 1:6 bis 1:8 für PC-3 und 1:4 bis 1:6 für PC-3-HSP27 Zellen.

Die stabil transfizierte Zelllinie LNCaP-miR-1 wurde zusätzlich mit dem

Antibiotikum Puromycin, PC-3-HSP27-Zellen mit Gentamycin G148 inkubiert. Damit konnte sichergestellt werden, dass sich Zellen ohne den eingebrachten Vektor und seine Resistenzkassette nicht vermehrten.

2.2.3 Zellzahlbestimmung mittels CASY TT Cell Counter

Das CASY TT Cell Counter System ermöglicht sowohl quantitative als auch qualitative Aussagen zu einer spezifischen Zellsuspension. Der gemessene elektrische Widerstand bildet hierfür die Grundlage, welcher sich bei unbeschädigten Zellen aufgrund ihrer intakten Zellmembran von dem anderer unterscheidet.

Vor einer Messung wurde das System auf die Eigenschaften der jeweiligen Zelllinie geeicht. Dazu wurden von der zu untersuchenden Probe 100µl in 10ml CASYton, einer für das Zellzählen entwickelten Elektrolytsuspension, gelöst, diese dann 15mal resuspendiert und 10mal invertiert. Der angegebene Zelltitert (Zellen/ml) ergab sich aus dem Mittelwert von drei einzelnen Messungen. So konnte in Bezug auf das Gesamtvolumen der Zellsuspension die absolute Zellzahl der Probe errechnet werden.

2.2.4 Aussaat und Ernte von Zellen

Für unterschiedliche Versuche wurden verschiedene Well-Maßstäbe genutzt. Während die Wachstumskinetiken in 24-Well-Platten erfolgten, wurde die Kultivierung der Zellen für Protein- und RNA-Analysen hingegen in 6-Well-Platten vorgenommen. Beide Formate erhielten vor Versuchsbeginn eine Beschichtung aus einer 0,01%igen Poly-L-Lysin-Lösung. Die Zellzahlen für die einzelnen Experimente wurden stets so gewählt, dass in keinem Fall eine Überkonfluenz und / oder Nährstoffmangel über den jeweiligen Zeitraum der Inkubation entstand.

Zur Ernte der Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Wells mit je 1ml DBPS gewaschen und 0,5ml 1x Trypsin für 3min bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die gelösten Zellen wurden nach 7-8-maliger Resuspension in einzelne 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Um möglichst alle Zellen zu ernten, folgten zwei Waschschrte mit jeweils 0,5ml DBPS, die ebenfalls dem Reaktionsgefäß hinzugegeben wurden. Das Gesamtvolumen einer einzelnen Probe betrug nun 1,5ml und konnte quantifiziert werden (Abs. 3.2.3).

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Protein-Präparation

Um Proben für die Proteinanalyse zu generieren, wurden in einer 6-Well-Platte je 400000 Zellen ausgesät und bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 24h erfolgte ihre Ernte (Abs. 2.2.4). Die erhaltene Zellsuspension wurde zentrifugiert (500U/min, 5min), der Überstand verworfen und das Pellet mit 30µl RIPA-Lysepuffer resuspendiert. Es folgte eine Behandlung mit 20 Ultraschallstößen (0,5 Cycle, 55% Amplitude), bevor das Zelllysate bei -20°C aufbewahrt werden konnte.

2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Diesem Verfahren liegt die Komplexbildung des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie-Brilliant-blue G-250 mit kationischen und unpolaren Aminosäureseitenketten der Proteine zu Grunde, welche eine Änderung des Absorptionsmaximums von 470nm auf 595nm zur Folge hat.

In einer 96-Well-Platte wurden pro Well 18µl A.bidest. als Doppelansatz vorgelegt, 2µl der Probe hinzugegeben und mit 300µl Bradford-Reagenz aufgefüllt. Als Referenz diente eine Eichreihe, die durch die Verdünnung eines definierten BSA-Proteinstandards erstellt wurde (Tab. 1). Nach 15-minütiger Inkubation im Dunkeln wurden per Photometer die Extinktion bei 595nm gegen eine Referenzwellenlänge von 360nm gemessen und eine Eichkurve in Form eines Verhältnisses erstellt.

Tabelle 1: Pipettierschema zur Proteinbestimmung nach Bradford

μg BSA	BSA (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) in H ₂ O gelöst	A.bidest. (μl)	Bradford-Reagenz (μl)
0	0	20	300
0,4	2	18	300
0,8	4	16	300
1,2	6	14	300
1,6	8	12	300
2,0	10	10	300
2,4	12	8	300
2,8	14	6	300
3,6	18	2	300

2.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE stellt eine Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese dar, bei der Stoffgemische nach ihrer Molekülmasse im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Das Natriumdodecylsulfat maskiert hierbei die Eigenladung der Proteine. Das Gelsystem bestand aus einem Sammel- und einem Trenngel, die nach einem Schema angefertigt wurden (Tab. 2). Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten, welche in einer Bio-Rad Apparatur mit einem Abstandshalter eingespannt waren, pipettiert. Um ein gerades, luftblasenfreies Gel zu erhalten, wurde A.bidest. auf das Sammelgel gegeben und ein Kamm aufgesetzt, der für die Taschenbildung für die spätere Pipettierung der Proben sorgte. Nach Polymerisation und Aushärtung des Gels konnte der Kamm entfernt und das A. bidest. mit Filterpapier aufgesaugt werden.

Vor dem Übertragen der Proben in die Geltaschen, wurden diese zusammen mit 5x Ladepuffer für 5min bei 95°C erhitzt, anschließend kurz auf Eis abgekühlt und zentrifugiert. Jede Probe wurde in eine separate Tasche überführt. Eine weitere wurde mit PageRuler Prestained Protein Ladder, welcher zur Bildung der Markerbande führte, und alle anderen mit 20 μl 1x Ladepuffer aufgefüllt. Nach 15-minütiger Einlaufzeit bei 80V, liefen die Proben dann für 110min bei 135V in das Gel.

Tabelle 2: Pipettierschema für SDS-Gel

	5 % Sammelgel	10 % Trenngel
A.bidest	2,1ml	2,4ml
Sammelgelpuffer	0,375ml	---
Trenngelpuffer	---	1,5ml
Acrylamid (30%)	0,5ml	2ml
SDS (10%)	30µl	60µl
APS (10%)	30µl	60µl
TEMED	3µl	6µl

2.3.4 Western Blot

Beim Western Blot werden die Proteine auf eine Trägermembran übertragen. Aufgrund von Ladungswechselwirkungen bleiben die Proteine an der Membranoberfläche im Muster der elektrophoretischen Aufteilung haften und sind somit für die Antikörper-Bindung und die Detektion zugänglich.

Zunächst wurde eine Blotschale mit Transferpuffer gefüllt und in ihr drei Filterpapiere, eine Nitrozellulosemembran, das Polyacrylamidgel, sowie drei weitere Filterpapiere in dieser Reihenfolge platziert. Für den Elektrotransfer wurde das Semidry-Blot-System genutzt (0,06A/60min pro Membran). Um zu überprüfen, ob die Proteinübertragung erfolgreich war, wurde die Nitrozellulosemembran für 3min in einer Ponceau-S-Färbelösung auf einem RT-Schüttler geschwenkt, anschließend wieder zweimal mit A.bidest und einmal mit 1xTBS-T gewaschen. Um freie Bindungsstellen zu blockieren, wurde es für 1-2h in eine Suspension aus 0,5g Magermilchpulver und 5ml 1xTBS-T gelegt. Nach einem nächsten kurzen Waschschrift mit 1x TBS-T, folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in einer verdünnten Antikörperlösung über Nacht bei 4°C auf einem Rollmischer. Am nächsten Tag wurde die Nitrozellulosemembran dreimal für 5min mit 1x TBS-T gewaschen und dann in der sekundären Antikörperlösung für ca. 1h bei 4°C auf einen Rollmischer gelegt. Im Anschluss wurde die sekundäre Antikörperlösung verworfen und die Membran dreimal mit 1x TBS-T für je 5min gewaschen. Nach 3-minütiger Inkubation in der Detektionslösung SuperSignal™ West Dura, konnten durch geeignete Apparaturen Signale aufgenommen, gespeichert und mithilfe des Programmes Image Lab™ ausgewertet werden.

Nach der Detektion des Proteins wurde obiges Verfahren für Glycerinaldehyd-3-

Phosphatdehydrogenase (GAPDH), ein House-Keeping-Protein, welches als Referenz und Ladungskontrolle diene, wiederholt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA-Extraktion

Gemäß der Single-Step-Methode wurden die geernteten Proben zentrifugiert (500U/min, 2min) und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde dann mit 500µl Trizol versetzt, welches Guanidiniumthiocyanat und Phenol enthält. Ersteres lysiert die Zellen und inaktiviert RNasen und andere Enzyme. Im Phenol löst sich die RNA. Nach Zugabe von 50µl 1-Bromo-3-Chloropropan, wurde die Suspension 15s gevortext, bei RT für 5min inkubiert und zentrifugiert (12000rcf, 15min, 4°C). Die dabei entstehende Phasenbildung ermöglichte die Isolierung von RNA als wässrige oberste Phase, welches mit 250µl Isopropanol 5-10x invertiert und nach einer 10-minütigen Inkubationsphase bei RT erneut zentrifugiert (12000xg, 10min, 4°C) wurden. Der Überstand wurde verworfen und das feste RNA-Pellet mit 500µl Ethanol (75%ig) gewaschen. Durch leichtes Anschnipsen des Reaktionsgefäßes wurde das Pellet gelöst und ein letztes Mal zentrifugiert (7500xg, 5min, 4°C). Nach Entfernung des überschüssigen Ethanols und anschließender 5-10-minütiger Lufttrocknung, wurde das Pellet in 32µl DEPC-H₂O (RNase-frei) gelöst und resuspendiert. Mittels Spektralphotometer wurde die RNA-Konzentration bestimmt und anhand des Absorptionsquotienten gleichzeitig eine Kontamination ausgeschlossen. Die Proben konnten im Anschluss nach Bedarf bei -20°C eingefroren werden.

2.4.2 Reverse Transkription

Mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase kann die Sequenz einer RNA in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden, welche für die anschließende qRT-PCR benötigt wird.

Für dieses Verfahren wurde die isolierte RNA, ein Master-Mix (Tab. 3) und der Thermocycler T3000 genutzt. Nachdem 1µl RNA (100ng/µl) vorgelegt und mit dem Master-Mix auf ein Gesamtvolumen von 6,5µl aufgefüllt wurde, durchliefen die einzelnen Suspensionen zwei Inkubationsschritte bei 16 und 42°C für je 30min und einen bei 85°C für 5min. Im Anschluss wurden die Proben mit 12,5µl DEPC-H₂O aufgefüllt und nach Bedarf bei -20°C gelagert.

Tabelle 3: Master-Mix für STEM-LOOP RT-PCR

Zusammensetzung	1x Ansatz (μ l)
DEPC-H ₂ O	1,7
5x RT-Buffer	1,5
miR-1 SLOOP	1,0
U6 SLOOP	1,0
0,25mM dNTP	1,0
RiboLock 40U/ μ l	0,05
SuperScript RT 200U/ μ l	0,2

2.4.3 Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCR dient der Vervielfältigung von Nukleinsäuren mithilfe einer DNA-Polymerase. Die Quantifizierung erfolgt durch Fluoreszenz-Messungen, die in Echtzeit erfasst werden und proportional mit der Menge an PCR-Produkten zunehmen.

Von der hergestellten cDNA wurden hierfür 2 μ l im Doppelansatz in eine 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt und mit einem weiteren Master-Mix aufgefüllt (Tab. 4). Für jedes Target wurde eine Kontrolle ohne cDNA eingesetzt.

Tabelle 4: Master Mix für qRT-PCR

Zusammensetzung	1x Ansatz (μ l)
DEPC-H ₂ O	5,2
miR-1 FOR	0,4
U6 FOR	0,4
Universal-miR REV	0,4
U6 REV	0,4
SensiMix SYBR Hi-ROX	8,0

Nach einer initialen Denaturierung der doppelsträngigen DNA folgten in der anschließenden Reaktion drei Phasen (Tab. 5). Die DNA-Polymerase lagerte sich an die nun einsträngig vorliegende DNA an und verband diese mit den spezifischen Primern (Annealing). Dann vervollständigte sie die komplementäre

DNA ausgehend vom Primer in 5'-3'-Richtung (Elongation). Dieser Prozess wiederholte sich in 44 Zyklen. Währenddessen lagerte sich der interkalierende Farbstoff SYBR-Green (Tab. 4) an die doppelsträngige DNA an und sorgte damit für das erwähnte Fluoreszenzsignal.

Tabelle 5: qRT-PCR-Protokoll

	Temperatur (°C)	Zeit (s)
Initiale Denaturierung	95	300
Denaturierung (Phase I)	95	10
Annealing (Phase II)	60	20
Elongation (Phase III)	72	10

2.5 HET-CAM (hen's egg test chorioallantoic membrane)-Assay

2.5.1 Brüten der Eier

Für den HET-CAM-Assay wurden befruchtete SPF (spezifiziert pathogenfrei) Bruteier der Hühnerrasse White Leghorn verwendet. Nach einem Tag der Akklimatisation, wurden sie in einem computergesteuerten Temperatur- und Feuchteregelsystem bei $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ und einer relativen (rel.) Luftfeuchtigkeit von $62 \pm 2,5\%$ gebrütet (EET 0, Embryo-Entwicklungstag 0). Bis zum EET 6 geschah dies unter regelmäßigem Drehen (1U/12h). Für den EET 7 und EET 8 wurde jedes Ei mit dem stumpfen Ende nach oben in die aufrechte Position gebracht, sodass sich dort eine Luftblase bildete.

Spätestens am EET 17 wurden die Eier auf Eis gelegt, um sie durch Hypothermie zu euthanasieren.

2.5.2 Präparation der Eier

Am EET 8 wurde nacheinander jedes Ei in einem erwärmten und desinfizierten Eihalter platziert und mithilfe des Powerlux Egg Testers und eines Bleistiftes die erwähnte Luftblase markiert. Nach kurzer Desinfektion der festen Eierschale wurde in diese mit einer Kanüle ein kleines Loch gestochen und mit einer Pinzette abpräpariert. Des Weiteren wurden spitze Kanten am Rand und Eierschalenreste auf der Eihaut entfernt, sodass schließlich ein ca. 5cm^2 großes rundes Fenster entstand. Durch das Verstreichen von 6-8 Tropfen Natriumchlorid auf der Eihaut konnte die darunterliegende CAM mit ihren Gefäßen sichtbar gemacht, die Eihaut

vorsichtig mit der Pinzette abgezogen und der Rand der Eierschale für die folgende Bilder-Dokumentation markiert werden.

2.5.3 Inokulation der Tumoren auf der CAM

Noch vor der Präparation am EET 8 wurden die Zellkulturflaschen geerntet (Abs. 3.2.4), Zellen derselben Linie vereint und die Gesamtzellzahl ermittelt (Abs. 3.2.3). Dann wurde das größtmögliche Vielfache der benötigten Zellzahl zentrifugiert (1000U/min, 3min) und der Überstand verworfen. Schließlich wurde dem Pellet so viel Vollmedium hinzugegeben, dass 1ml der Zellsuspension die gewünschte Zellzahl für ein Präparat enthielt. Diese einzelnen Milliliter wurden in 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Vor dem Abziehen der Eihaut eines Eies (Abs. 3.5.3) wurde erneut je ein Eppendorf Reaktionsgefäß mit darin enthaltener Zellsuspension zwei Minuten zentrifugiert (100U/min, 2min), in diesen zwei Minuten die Präparation beendet, und das reine Zellpellet in 30µl Corning® Matrigel® Matrix gelöst, gemischt, und auf die CAM pipettiert. Das Präparat wurde abschließend mit einer transparenten Membran (Fixomull® transparent) verschlossen und bei 37 ± 0,5°C und 62 ± 2,5% rel. Luftfeuchtigkeit weitergebrütet.

Nach 168 h (EET 15) täglicher Foto-Dokumentation wurden die Eier auf Eis gelegt, die Tumoren von der CAM präpariert, gemessen und bei -20°C eingefroren.

2.5.4 Fotodokumentation und Bildauswertung

Für spätere Analysen wurden die Eier jeden und die Tumoren am letzten Tag (EET 15) mithilfe eines Mikroskops mit Kameraanschluss fotografiert. Hierzu wurde jedes Ei in einem erwärmten und desinfizierten Eihalter platziert und die transparente Membran abgeschnitten. Die Markierung des Bleistiftes am Tag der Präparation stellte sicher, dass es stets gleich ausgerichtet war. Nach der Aufnahme wurde das Ei erneut mit Fixomull® transparent verschlossen und bis zum nächsten Tag bei 37 ± 0,5°C und 62 ± 2,5% rel. Luftfeuchtigkeit gebrütet.

Alle Aufnahmen wurden mithilfe des Programmes ImageJ (Java) ausgewertet. Zur Vermessung der Tumoren rechnete dieses eine definierte Länge, gegeben durch ein Lineal, in eine Pixelzahl um. Anschließend war es in der Lage, weitere

Strecken bzw. Flächen zu quantifizieren. Die gewonnenen Werte wurden in den nachstehenden Formeln eingesetzt, um die Mantelfläche (MF) bzw. das Volumen (V) des jeweiligen Tumors zu berechnen:

$$MF = \pi(a^2 + h^2) \text{ und } V = \frac{h\pi}{6}(3a^2 + h^2)$$

Um die Gefäße der CAM zu analysieren, wurden gleichgroße runde Areale im Zentrum der Bilder zweier Zeitpunkte ausgewählt, die Gefäßlängen und -breiten in diesen nachgezeichnet und von ImageJ quantifiziert. Da eine Skalierung nicht möglich war, wurden beide Gesamtwerte in Relation gesetzt und dadurch die Veränderung über einen definierten Zeitraum ermittelt.

2.5.5 Tumorpräparation und -lagerung

Nach 168 h (EET 15) wurden die Eier nach erfolgter Fotodokumentation auf Eis gelegt, bis der Tod der Hühnerembryonen eintrat. Mittels Kältespray wurden dann die einzelnen Tumoren stabilisiert und von der CAM mithilfe einer Pinzette und einer Schere präpariert. Die so erhaltenen Präparate wurden auf eine ebene Fläche gebracht und sowohl von oben als auch von der Seite fotografiert. Ein Lineal diente dabei der Skalierung. Schließlich wurden sie in 2,0ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

2.6 Statistik

Alle Daten wurden mittels Microsoft Excel 2010 analysiert. Nach mindestens drei unabhängigen Versuchen pro Experiment wurden die Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben und auf die Kontrolle normiert. Die Auswertung erfolgte mittels studentischen t-Tests. Statistische Signifikanz wurde mit $p \leq 0,0500$ (*), $p \leq 0,0100$ (**) und $p \leq 0,0010$ (***) angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Effekt der Mikro-RNA miR-1 und des Hitzeschockproteins HSP27 auf die Tumorprogression im *in vitro*-Zellkulturmodell

Sowohl die Mikro-RNA miR-1 als auch das Hitzeschockprotein HSP27 beeinflussen Wachstum und Stoffwechselprozesse von Tumorzellen. Während miR-1 tumorsuppressive Eigenschaften besitzt, spricht man HSP27 onkogene Funktionen zu.

Um beide Faktoren genauer analysieren zu können, wurden die etablierten Prostatakrebszelllinien LNCaP und PC-3 stabil mit ihnen transfiziert (Abb. 1) [7, 14].

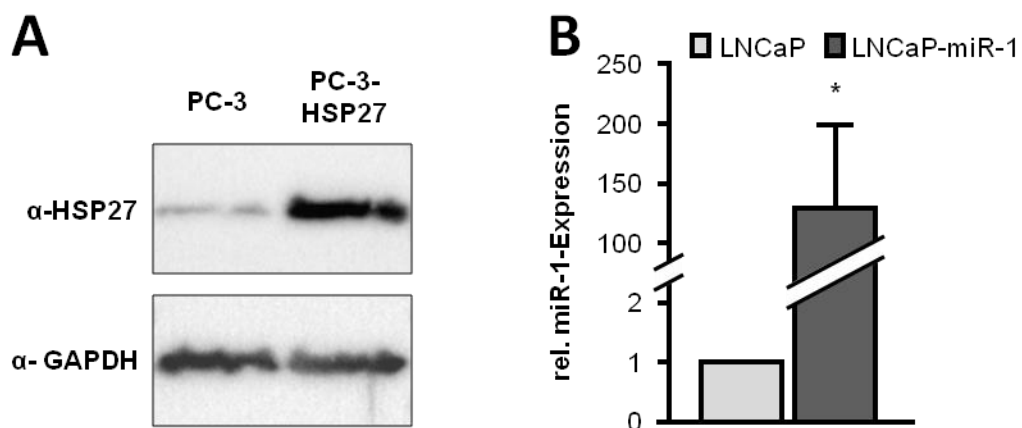


Abbildung 1: HSP27-Expression von PC-3- und PC-3-HSP27-Zellen und miR-1-Expression von LNCaP- und LNCaP-miR-1-Zellen

Überexpression von HSP27 in PC-3-HSP27-Zellen (A) und von miR-1 in LNCaP-miR-1-Zellen (B) im Vergleich zu den nicht transfizierten Zelllinien. Die Experimente der relativen Quantifizierung der miR-1-Expression wurden mit dem Student's *t*-Test ausgewertet und statistische Signifikanz mit $p \leq 0,0500$ (*), $p \leq 0,0100$ (**) und $p \leq 0,0010$ (***) angenommen.

Um den Einfluss des jeweiligen Progressionsfaktors bezüglich des Tumorwachstums zu evaluieren, wurden je 4000 LNCaP- und LNCaP-miR-1- und 2000 PC-3- und PC-3-HSP27-Zellen über 240h inkubiert (Abb. 2).

Verglichen mit der nicht transfizierten Zelllinie zeigte sich für LNCaP-Zellen unter miR-1-Einfluss eine statistisch signifikante antiproliferative Wirkung ($p \leq 0,0100$) ab 192h. Nach 240h unterschieden sich die Zellzahlen um ca. die Hälfte. Dieser Effekt konnte ebenfalls für die PC-3-Zellen unter HSP27-Einfluss beobachtet

werden. Die Zahl der PC-3-HSP27-Zellen war nach 240h um ca. ein Fünftel gegenüber der maternalen Zelllinie reduziert. Dieser Unterschied war bereits ab einer Inkubationszeit von 96h signifikant ($p \leq 0,0100$).

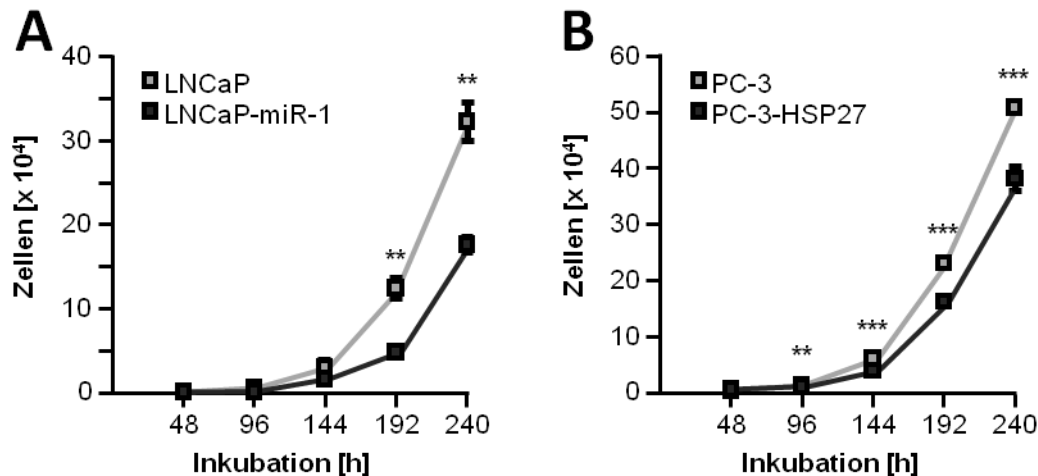


Abbildung 2: Wachstumskinetiken von LNCaP- und LNCaP-miR-1- sowie von PC-3- und PC-3-HSP27-Zellen

Antiproliferative Wirkung von miR-1 in LNCaP-Zellen (A) und von HSP27 in PC-3-Zellen (B). Die Ergebnisse stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten und wurden als Mittelwert \pm SD der absoluten Zellzahl dargestellt. Alle Experimente wurden mit dem Student's t-Test ausgewertet und statistische Signifikanz mit $p \leq 0,0500$ (), $p \leq 0,0100$ (**) und $p \leq 0,0010$ (***) angenommen.*

3.2 Tumorwachstum im 3D-Sphäroidmodell und auf der CAM

So wie die Gewebe im Körper eine räumliche Orientierung einnehmen, sollten auch die Tumorzellen auf der CAM ein dreidimensionales Wachstum aufzeigen.

Dazu wurden am EET 5 je 100000 Zellen aller vier Linien in einer 96-Well-Rundbodenplatte ausgesät und bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am Tag der Präparation (EET 8) wiesen die Zelllinien PC-3 und PC-3-HSP27 zwar verdichtete, jedoch instabile Tumorverbände auf, welche sich schon bei geringer mechanischer Beanspruchung wieder auflösten (Abb. 3c). LNCaP und LNCaP-miR-1 hingegen bildeten Sphäroide, diese ließen sich jedoch nicht ohne weiteres auf die CAM pipettieren (Abb. 3a). Aus einem Trokarkatheter aus Silikon wurden ringartige Formen zurechtgeschnitten, die der Orientierung für die Dokumentation sowie der Begrenzung des zweidimensionalen Wachstums der Tumoren dienen sollten (Abb. 3b, d).

Für keine der vier Zelllinien konnte aber ein dreidimensionales progressives

Tumorwachstum auf der CAM induziert werden.

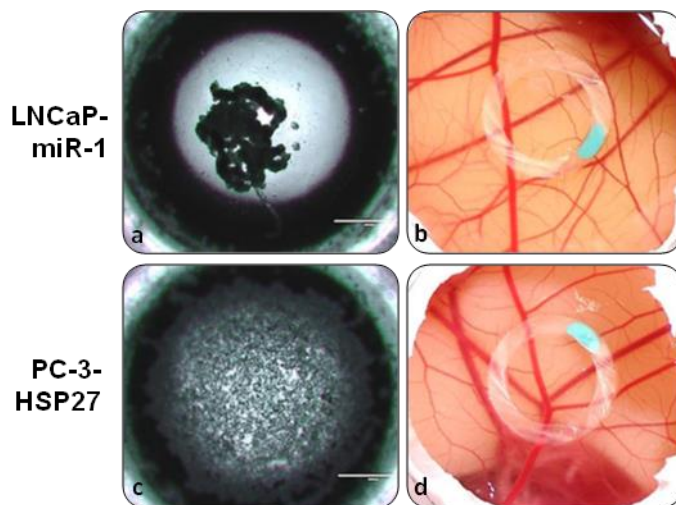


Abbildung 3: Transfizierte PC-Zelllinien im 3D-Sphäroidmodell und auf der CAM

Wachstum von LNCaP-miR-1- und PC-3-HSP27-Zellen in einer 96-Well-Rundbodenplatte nach 72h Inkubationszeit (a, c). Übertragungsversuch der LNCaP-miR-1- und PC-3-HSP27-Sphäroide auf die CAM am Präparationstag (b, d). (Vergrößerung: a, c: 2,5x/0,075; b, d: 0,63x)

3.3 Interaktion der Tumorzellen mit künstlicher Extrazellulärmatrix

Die basalmembranartige Matrix (Corning® Matrigel® Matrix) wird vom Engelbreth-Holm-Swarm- (EHS-) Sarkom der Maus, einem Tumor, von Natur aus reich an Extrazellulärmatrixproteinen, gewonnen. Sie besteht vor allem aus Laminin (60%), Kollagen IV (30%), Entactin (8%), Heparansulfatproteoglykanen und diversen Wachstumsfaktoren. Ab einer Temperatur von 10°C und mehr nimmt die flüssige Corning® Matrigel® Matrix einen gelartigen Zustand an und kann so Tumorzellen stabilisieren.

Eine Versuchsreihe von 18 Eiern wurde in zwei Gruppen entsprechend der Zelllinien LNCaP und PC-3 und diese jeweils in je drei weitere mit unterschiedlichen Zellzahlen (500000, 1000000, 1500000) aufgeteilt. Pro Ei wurden 5µl Matrigel und 5µl Vollmedium mit den entsprechenden Zellen gemischt und anschließend auf die CAM inokuliert.

Es stellte sich dabei heraus, dass mittels Corning® Matrigel® Matrix zwar dreidimensionales Wachstum induziert werden konnte, dieses aber diffus verteilt war (Abb. 4).

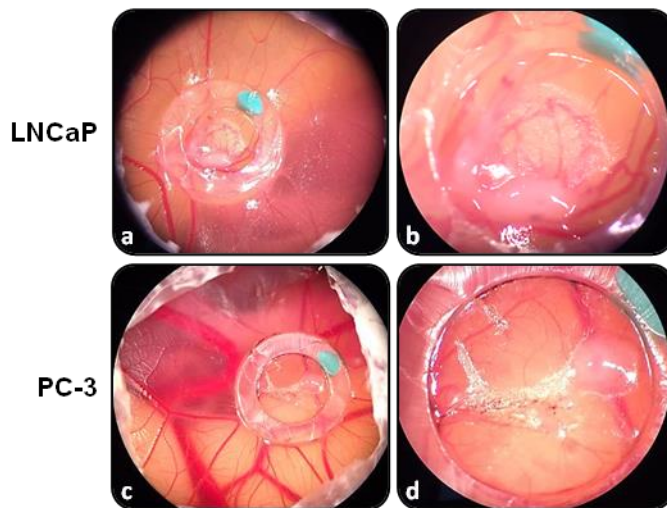


Abbildung 4: Tumorwachstum auf der CAM mit Extrazellulärmatrix

Diffus verteiltes Wachstum von LNCaP- (a, b) und PC-3-Zellen (b, d) mit Corning® Matrigel® Matrix auf der CAM nach jeweils 96h (EET 12). (Vergrößerung: a, c: 0,63x; b, d: 1,6x)

Um das Areal des Tumorwachstums zu begrenzen, wurde vor der Inokulation eine Fläche auf der CAM hergestellt, die der Anheftung der Zellen und der Fokussierung ihres Wachstums dienen sollte. Hierzu wurde eine Versuchsreihe von 20 Eiern in drei Gruppen aufgeteilt. Die CAM der ersten Gruppe (n=4) erhielten keine Vorbehandlung. Bevor die Zellen der zweiten Gruppe (n=10) mit den CAM in Verbindung kamen, wurden 10µl Corning® Matrigel® Matrix in die Mitte der Trokarkatheterringe pipettiert. Das jeweilige Ei inkubierte dann für ca. 30min bei $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ und $62 \pm 2,5\%$ rel. Luftfeuchtigkeit, sodass sich die Extrazellulärmatrix verfestigen konnte. Anschließend wurde es wieder herausgenommen und mit den Zellen inokuliert. Selbiges geschah mit der dritten Gruppe (n=6), jedoch diente hier eine 0,01%ige Poly-L-Lysin-Lösung als CAM-Beschichtung anstelle der basalmembranartigen Matrix.

Über einen Zeitraum von 168h (EET 15) konnte zwar ein Tumorwachstum induziert werden, keine der beiden Vorbehandlungen hatte jedoch Auswirkungen auf dessen Position und Ausbreitung (Abb. 5).

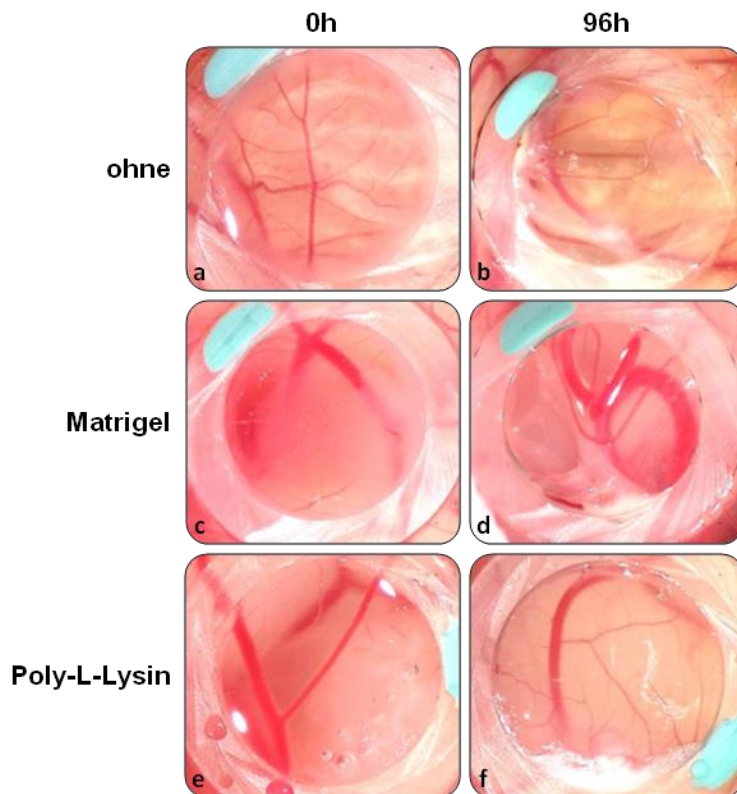


Abbildung 5: Tumorwachstum nach Vorbehandlung der CAM

Tumorwachstum von PC-3-Zellen auf einer CAM ohne (a, b), mit Corning® Matrigel® Matrix- (c, d) und mit Poly-L-Lysin-Beschichtung (e, f) nach 0h (EET 8) und 96h (EET 12). (Vergrößerung: 1,6x)

3.4 Einfluss der Ringeigenschaften auf das Tumorwachstum

Da vermutet wurde, dass die Trokarkatheterringe die Ausbreitung des Tumorwachstums beeinflussen würden, schloss sich ein Experiment mit unterschiedlichen Ringdurchmessern (innen) sowie Ringhöhen an. Dazu wurde eine Versuchsreihe von 45 Eiern in vier Gruppen aufgeteilt. Zellen der Gruppe 1 (n=9) wurden mit Corning® Matrigel® Matrix in Ringe mit einem Durchmesser von 8mm und einer Höhe von 1,5mm, Zellen der Gruppe 2 (n=12) in Ringe mit gleichem Durchmesser, aber einer Höhe von 3mm pipettiert. Die Ringe der Gruppe 3 (n=12) besaßen einen Durchmesser von 10mm und eine Höhe von 1,5mm, während die der Gruppe 4 (n=12) sich von diesen wiederum durch eine Höhe von 3mm unterschieden.

Einige der Ringe mit 3mm Höhe sanken in die CAM ein. Des Weiteren zeigte sich, dass weder die Ringe mit 8mm noch die mit 10mm Durchmesser eine Barriere für das Tumorwachstum darstellten. Es fiel jedoch auf, dass die unebenen Schnittkanten die Transparenz der Ringe verringerte, was die Inspektion der Gefäße darunter erschwerte und die CAM beschädigen konnte. In und um die Ringe herum trübte die CAM ein. Zudem hatte es den Anschein, als ob die rein mechanische Beanspruchung bereits Effekte auf die Gefäße der CAM gehabt hatte, da sich einige parallel um die Ringe anlagerten. (Abb. 6e, f).

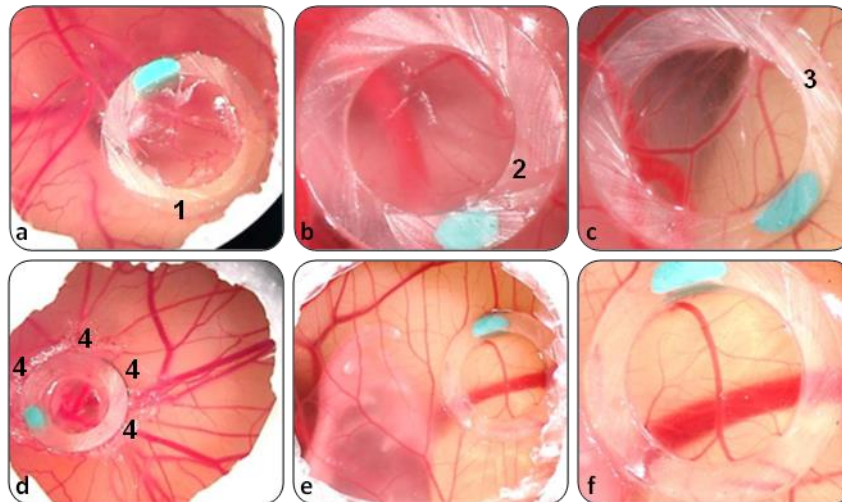


Abbildung 6: Effekte unterschiedlicher Ringparameter

a: Einsinken zu schwerer Ringe (1), b: zu geringe Transparenz der Ringe (2),
 c: scharfe Schnittkanten mit Verletzungspotenzial für die CAM (3),
 d: Eintrübung der CAM im Ring und in dessen unmittelbarer Umgebung (4),
 e, f: Veränderung der Gefäßarchitektur in der CAM
 (Vergrößerung: a: 0,8x; b, c: 1,6x; d, e: 0,63x; f: 1,25x)

Um die Effekte der Trokarkatheterringe selbst auf die CAM beurteilen zu können, folgte ein weiteres Experiment, bei dem auf eine Versuchsgruppe von 4 Eiern je ein Silikonring platziert wurde.

Bereits nach 96h kam es in den Ringen und in deren Umgebungen zu Eintrübungen auf der CAM (Abb. 7).

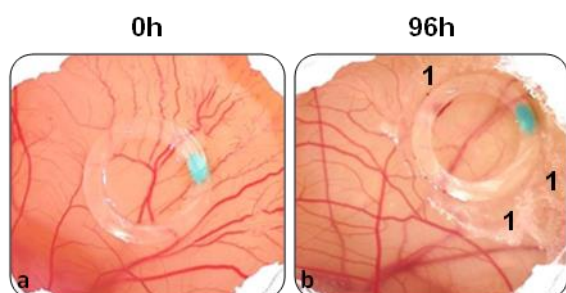


Abbildung 7: Effekte der Silikonringe auf die CAM

Eintrübungen auf der CAM (1) in und um den Trokarkatheterring nach 96h (EET 12) im Vergleich zum 0h-Zeitpunkt (EET 8). (Vergrößerung: 0,63x)

Um die Nachteile der Trokarkatheterringe zu minimieren, galt es eine Alternative zu finden. Eine Option boten aus selbsthergestellten Agaroseplatten mittels Lochreihen gestanzte Ringe unterschiedlicher Durchmesser und Höhen. Agarose bietet den Vorteil, dass die Ringe wesentlich leichter, transparenter und ebener sind. Zudem ist es Zellen nicht möglich, auf Agarose anzuwachsen, für die zweidimensionale Tumorausbreitung eine zusätzliche Barriere darstellt.

So wurde eine Versuchsreihe von 19 Eiern in zwei Gruppen aufgeteilt. Die Zellen der Gruppe 1 (n=9) wurden in Agaroseringe mit einem Durchmesser von 8mm, die der Gruppe 2 (n=10) in Ringe mit 11mm Durchmesser pipettiert und beide über 168h (EET 15) bei $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ und $62 \pm 2,5\%$ rel. Luftfeuchtigkeit gebrütet.

Bereits nach 24h (EET 9) war zu sehen, dass die Agaroseringe unter den Bedingungen in der Brutmaschine ihre Form veränderten. Im Laufe der Inkubation verstärkte sich dieser Effekt und spätestens nach 96h waren sie auf weniger als ein Drittel ihrer Ausgangsgröße geschrumpft (Abb. 8). Somit konnte der Effekt der Ringe auf das Wachstum der Tumorzellen nicht evaluiert und dieser Versuch nicht zielführend ausgewertet werden.

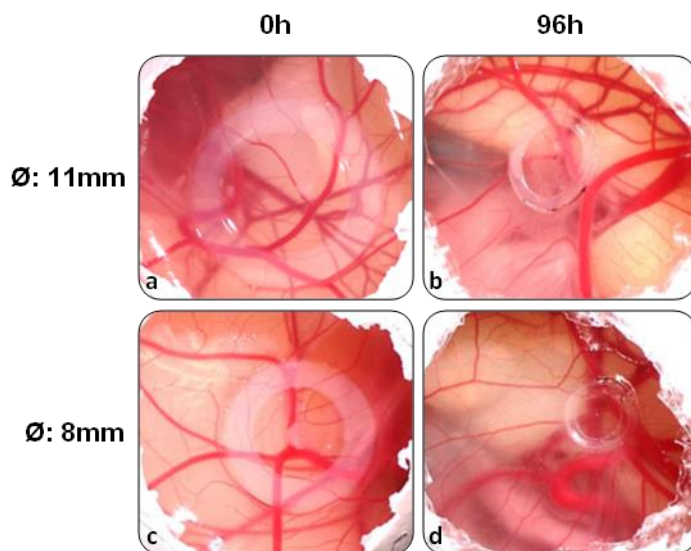


Abbildung 8: Agaroseringe auf der CAM

Formveränderungen der Agaroseringe nach 96 h (EET 12) Brutzeit bei $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ und $62 \pm 2,5\%$ rel. Luftfeuchtigkeit (b, d) im Vergleich zum Ausgangszustand nach der Präparation (EET 8) (a, c). (Vergrößerung: 0,63x)

3.5 Entwicklung einer Methode zur Induktion des Tumorwachstums auf der CAM unter Berücksichtigung der vorherigen Versuche

Die Trokarkatheter- und Agaroseringe führten erwiesenermaßen zu Irritationserscheinungen auf der CAM und waren schlecht zu handhaben. Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnis und angesichts der Tatsache, dass sich mithilfe von Corning® Matrigel® Matrix eher dreidimensionales progressives Tumorwachstum als im 3D-Sphäroidmodell erzielen ließ, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt.

Eine Versuchsreihe von 52 Eiern wurde dazu in vier Gruppen entsprechend der Zelllinien aufgeteilt. Es wurden jeweils 5×10^6 Zellen in $30\mu\text{l}$ Corning® Matrigel® Matrix gelöst, auf der CAM inokuliert und für 168h (EET 15) inkubiert. Die Eier wurden täglich inspiziert und mittels Fotokamera dokumentiert.

Diese Methode ermöglichte die Induktion des reinen Tumorwachstums ohne große Nebeneffekte. Aus diesem Grund wurde eine weitere Versuchsreihe von 52 Eiern gestartet (Abb. 9).

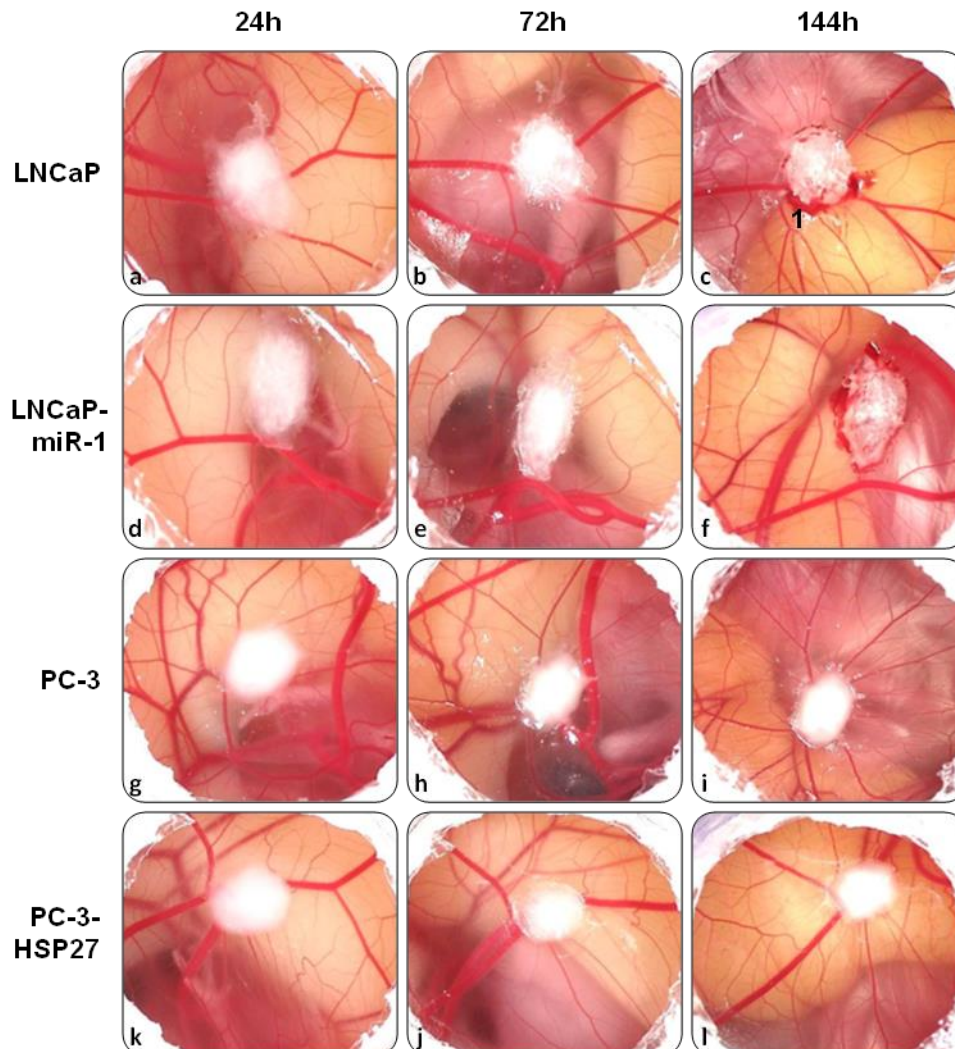


Abbildung 9: Tumorwachstum aller vier PC-Zelllinien auf der CAM

Wachstum von 5×10^6 LNCaP-, LNCaP-miR-1-, PC-3- und PC-3-HSP27-Zellen mit je $30\mu\text{l}$ Corning® Matrigel® Matrix zu den Zeitpunkten 24h (EET 9), 72 h (EET 11) und 144h (EET 14) nach Präparation. Einige Eier zeigten nach gewisser Zeit Blutungen auf der CAM (1). (Vergrößerung: 0,63x)

Bei genauer Betrachtung stellte sich heraus, dass von 28 LNCaP-Tumoren 20 (71%), von 29 LNCaP-miR-1-Tumoren 21 (72%) und von 28 Tumoren der PC-3-Zellen 20 (71%) auf der CAM anwuchsen. Bei der transfizierten Zelllinie belief sich der Wert auf 16 von 19 (84%). Statistisch gesehen, bestand kein signifikanter Unterschied.

Ferner kam es in 12 von 20 (60%) Eiern mit LNCaP-Tumoren zu

Blutungserscheinungen, die nach durchschnittlich 82h auf der CAM zu erkennen waren (Abb. 9). Mit LNCaP-miR-1-Tumoren traten diese bei 14 von 21 (67%) Fällen nach 103h auf. 8 von 20 (40%) CAM mit PC-3-Tumoren zeigten diese Blutungen nach 108h, mit PC-3-HSP27-Tumoren taten dies 8 von 16 (50%) nach 114h. Auch diese Unterschiede waren nicht statistisch signifikant.

Im Verlauf der Beobachtungszeit verstarben zwei Eier der LNCaP-, eins der LNCaP-miR-1-, vier der PC-3- und ebenso vier der PC-3-HSP27-Gruppe. Erwähnenswert ist der Umstand, dass mit Ausnahme eines präparierten Eies keine Blutungen zu erkennen waren. Überdies beinhaltete jede Lieferung außerdem Eier, welche bereits vor dem EET 8 tot, nicht befruchtet oder beschädigt waren. Diese Eier wurden von der Versuchsreihe ausgeschlossen.

Tabelle 6: Auswertung der optimierten Methode zur Induktion des Tumorstwachstums auf der CAM

	LNCaP	LNCaP-miR-1	PC-3	PC-3-HSP27
Versuchszahl (n)	28	29	28	19
Tumor angewachsen (n)	20	21	20	16
Tumor angewachsen (%)	71	72	71	84
Blutung (n)	12	14	8	8
Blutung (%)	60	67	40	50
Blutung (Zeitpunkt (Zp.))	3x48h 4x72h 3x96h 1x120h 1x144h	1x24h 2x48h 2x72h 1x96h 5x120h 1x144h 2x168h	1x72h 4x96h 1x120h 2x144h	1x24h 1x72h 1x 96h 1x120h 3x144h 1x168h
Blutung (Ø-Zp.)	82h	103h	108h	114h
verstorben n.Präp.	2	1	4	4
verstorben (Zp.)	72h, 96h	24h	72h, 120h, 120h, 168h	48h, 48h, 72h, 144h
verstorben mit Blutung	1	0	0	0
verstorben ohne Blutung	1	1	4	4
nicht befruchtet			3	
verstorben v.Präp.			4	
nicht gewertet*			6	

*Gründe: CAM bei der Präparation beschädigt, Mangel an Zellen, Ei beim Transport beschädigt

Um festzustellen, ob sich die Tumoren hinsichtlich ihrer Größe unterscheiden, wurden sie nach 168h (EET 15) von der CAM präpariert, fotografiert und die Bilder mithilfe des Programmes ImageJ (Java) ausgewertet. Diese Vorgehensweise ermöglichte es, den Umfang des Tumors nachzuzeichnen und die Fläche der Aufsicht mithilfe einer Skalierung durch das Programm zu errechnen (Abb. 10).

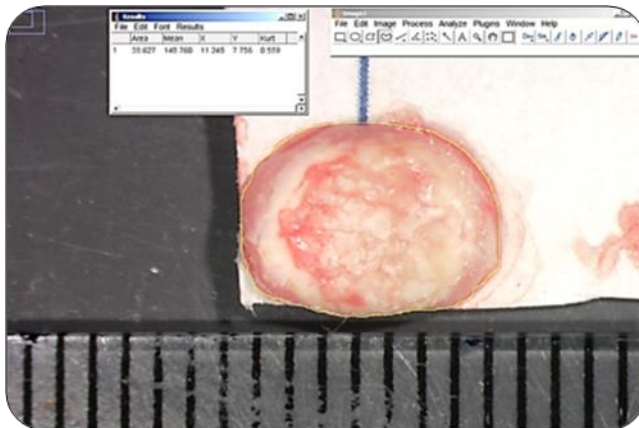


Abbildung 10: Flächenbestimmung der Tumoren (ImageJ)

Der Umfang der präparierten Tumoren wurde nachgezeichnet. Das Programm rechnete eine definierte Länge in eine Pixelzahl um (Skalierung). Dadurch war es in der Lage weitere Strecken bzw. Flächen zu quantifizieren.

Es zeigte sich, dass die Fläche der LNCaP-Tumoren mit durchschnittlich $26,9 \pm 4,5\text{mm}^2$ um $4,5\text{mm}^2$ kleiner war als die der LNCaP-miR-1-Tumoren ($31,4 \pm 6,6\text{mm}^2$). Tumoren der PC-3-Zelllinie unterschieden sich mit $25,7 \pm 6,0\text{mm}^2$ nur um $0,1\text{mm}^2$ von denen der transfizierten ($25,8 \pm 5,1\text{mm}^2$). Statistische Signifikanz war in keiner der beiden Fälle gegeben (Tab. 7).

Tabelle 7: Flächenbestimmung der Tumoren (ImageJ)

	#	LNCaP	LNCaP-miR-1	PC-3	PC-3-HSP27
Fläche (mm ²)	1	25,2	27,5	19,8	31,7
	2	24,4	41,4	31,7	21,1
	3	21,5	37,0	21,8	27,3
	4	31,0	28,9	26,6	36,4
	5	35,5	29,6	28,3	25,2
	6	21,9	28,9	29,0	17,4
	7	27,7	39,6	16,5	22,1
	8	27,3	33,8	15,8	28,3
	9	33,8	22,8	24,5	22,3
	10	29,6	15,4	28,5	25,1
	11	27,1	24,9	29,9	23,6
	12	23,3	42,3	31,8	29,1
	13	22,1	36,3	21,3	
	14			34,6	
Ø-Fläche (mm ²)		26,9	31,4	25,7	25,8
SD (mm ²)		4,5	6,6	6,0	5,1
p-Wert			0,0902		0,9701

Um auch das Wachstum in die Höhe zu berücksichtigen, wurde die Form der Tumoren als Kugelsegment angenommen. Mithilfe einer Formel zur Berechnung der Mantelfläche (MF) dieses geometrischen Körpers konnten die Flächen der

Kugelkappen ermittelt werden ($MF = \pi(a^2 + h^2)$) (Abb. 11).

Auch hier waren die Tumoren der transfizierten größer als die der maternalen Zelllinien. Die Mantelfläche der LNCaP-Tumoren betrug im Durchschnitt $51,3 \pm 8,1\text{mm}^2$, die der LNCaP-miR-1-Tumoren $52,0 \pm 17,3\text{mm}^2$. Mit $47,8 \pm 13,6\text{mm}^2$ war die Fläche der Kugelkappe der PC-3 Tumoren um $3,5\text{mm}^2$ kleiner als die der PC-3-HSP27-Tumoren ($51,3 \pm 13,5\text{mm}^2$). Wiederum sind die auftretenden Unterschiede in den Ergebnissen statistisch nicht signifikant (Tab. 8).

Tabelle 8: Flächenberechnung der Tumoren

	#	LNCaP	LNCaP-miR-1	PC-3	PC-3-HSP27
Mantelfläche (mm ²)	1	61,7	54,0	37,7	62,2
	2	53,2	70,2	67,7	37,2
	3	43,1	63,9	43,5	74,0
	4	50,4	55,0	52,2	69,9
	5	72,4	52,3	53,8	33,9
	6	51,3	57,3	79,4	36,0
	7	52,1	66,4	36,7	41,9
	8	44,6	52,4	39,1	60,0
	9	51,6	43,1	52,7	42,8
	10	43,1	39,4	46,0	57,2
	11	48,3	49,9	46,4	54,1
	12	45,9	60,2	47,3	46,8
	13	49,7	63,5	39,8	
	14			73,9	
Ø-Mantelfläche (mm ²)		51,3	52,0	47,8	51,3
SD (mm ²)		8,1	17,3	13,6	13,5
p-Wert			0,1780		0,9725

Der Tatsache, dass die Tumoren dreidimensionalen Körpern im Raum entsprachen, ist es geschuldet, dass die dritte Ebene der Berechnung hinzugezogen wurde, die Ermittlung der Volumina aller Tumoren. Auch hier wurden ihre Formen als Kugelsegmente angenommen und die entsprechende Formel angewandt ($V = \frac{h\pi}{6}(3a^2 + h^2)$) (Abb. 11).

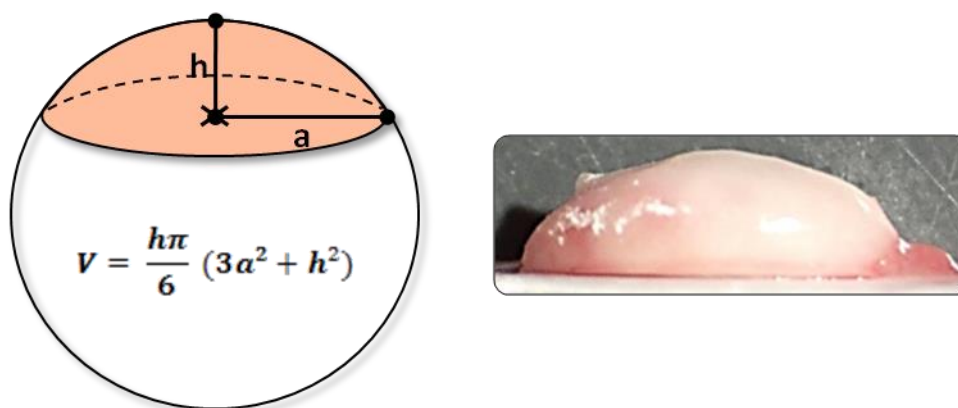


Abbildung 11: Volumenberechnung der Tumoren

Die Form der Tumoren wurde als Kugelsegment angenommen und ihre Volumina mithilfe der Formel zu deren Berechnung ermittelt.

Mit durchschnittlich $43,6 \pm 10,4 \text{ mm}^3$ waren die Volumina der LNCaP-Tumoren um $0,4 \text{ mm}^3$ größer als die der transfizierten Zelllinie ($43,2 \pm 14,7 \text{ mm}^3$). Volumina der PC-3-HSP27-Tumoren waren mit $46,2 \pm 17,8 \text{ mm}^3$ wie zuvor bereits größer als die der PC-3-Tumoren ($41,1 \pm 17,3 \text{ mm}^3$). Wiederum konnten auch hier keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien beobachtet werden (Tab. 9).

Tabelle 9: Volumenberechnung der Tumoren

	#	LNCaP	LNCaP-miR-1	PC-3	PC-3-HSP27
Volumen (mm ³)	1	54,4	42,5	30,6	52,4
	2	45,4	53,4	68,6	27,1
	3	36,5	58,9	36,6	84,6
	4	41,0	44,5	42,8	65,4
	5	72,5	40,3	48,9	24,8
	6	45,4	53,1	67,1	28,5
	7	41,6	57,6	29,5	34,0
	8	38,6	41,1	31,7	53,2
	9	39,0	36,1	45,9	34,9
	10	29,2	32,7	38,6	55,2
	11	40,6	43,9	38,6	52,4
	12	40,0	47,0	40,6	41,8
	13	42,9	53,5	31,9	
	14			64,3	
Ø-Volumen (mm ³)		43,6	43,2	41,1	46,2
SD (mm ³)		10,4	14,7	17,3	17,8
p-Wert			0,4390		0,7228

Bereits nach wenigen Tagen zeigte sich eine Veränderung der Gefäßausrichtung der Tumorpräparate. Zum Zeitpunkt der Präparation (EET 8) war noch ein recht ungeordnetes Netzwerk an Arterien und Venen zu sehen. Jedoch veränderten viele nach der Inokulation der Tumorzellen ihren Verlauf und bewegten sich nunmehr radiär auf den Tumor zu (Abb. 12).

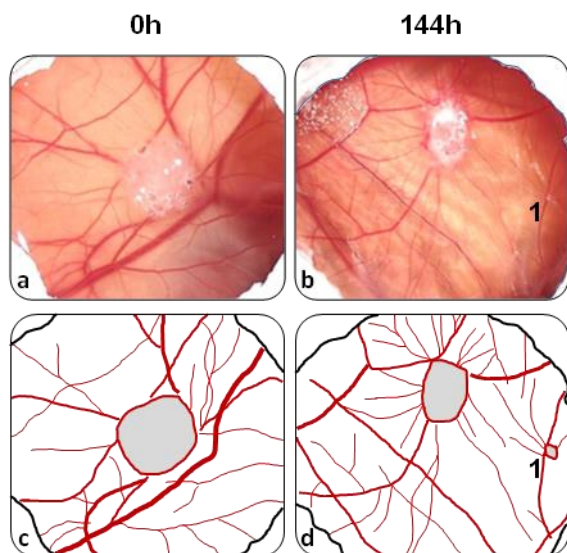


Abbildung 12: Einfluss der Tumoren auf die Gefäßausrichtung

Nach 144h Inkubationszeit (EET 14) richteten sich viele Gefäße speichenradartig um den Tumor aus. Mit 1 gekennzeichnet wurde ein weiterer kleiner Tumor, bei dem dasselbe Phänomen beobachtet werden konnte. c, d: Schematische Zeichnung der obigen Aufnahmen. (Vergrößerung: a, b: 0,63x)

Diese Tatsache warf die Frage auf, ob sich noch mehr als nur die Gefäßausrichtung veränderte. Deshalb wurde anschließend analysiert, inwiefern die relative Gesamtfläche der Gefäße der CAM in der Aufsicht zu- bzw. abnahm. Hierzu wurde ein gleichgroßes rundes Areal im Zentrum der Bilder der Zeitpunkte nach 0h und 144h (EET 8 und EET 14) ausgewählt. Mithilfe von ImageJ konnten die Gefäßlängen und -breiten in diesem nachgezeichnet und quantifiziert werden. Nun wurden die Werte der Zeitpunktes nach 144h (EET 14) 0h (EET 8) zusammengehöriger Zelllinien in Relation gesetzt (Abb. 13).

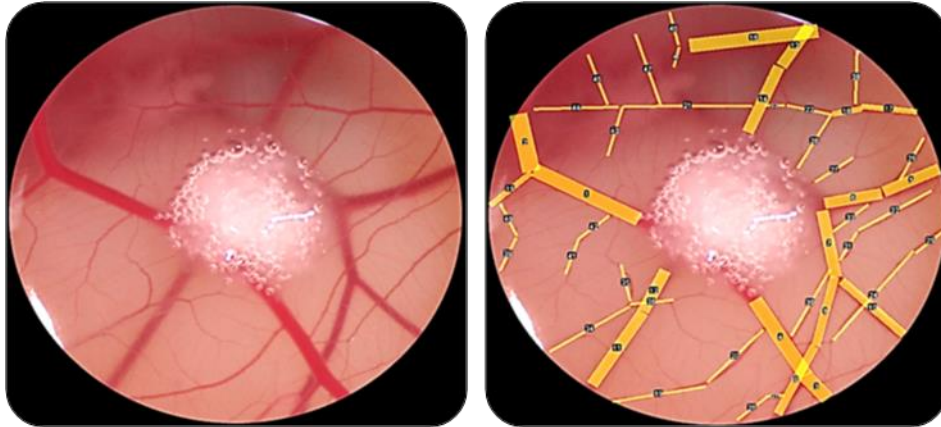


Abbildung 13: Bestimmung der relativen Gesamtfläche der Gefäße in der Aufsicht (ImageJ)

Durch Nachzeichnen der Längen und Breiten der Gefäße konnte die Gesamtfläche der Gefäße in der Aufsicht durch das Programm errechnet und gegen andere Zeitpunkte relativiert werden. (Vergrößerung: 0,63x)

Vergleichend ließ sich feststellen, dass sich die relative Gesamtfläche der Gefäße in der Aufsicht in CAM, die mit LNCaP-Tumoren inokuliert wurden, über 144h (EET 14) um das 1,07-fache veränderte, während sie dies bei LNCaP-miR-1-Tumoren um das 0,99-fache tat. Dieser nennenswerte Unterschied war statistisch signifikant ($p=0,0478$). PC-3-Tumoren führten zu einer Verkleinerung auf das 0,97-fache, PC-3-HSP27-Tumoren auf das 0,98-fache. Hier hingegen ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied (Tab. 10).

Tabelle 10: relative Gesamtfläche der Gefäße der CAM in der Aufsicht

	#	LNCaP	LNCaP-miR-1	PC-3	PC-3-HSP27
	1	1,05	0,81	0,87	0,80
	2	1,04	0,94	0,76	0,77
	3	0,85	0,98	1,10	1,43
	4	0,79	0,77	0,47	0,57
	5	0,97	0,89	0,74	1,00
	6	0,75	0,82	0,90	0,66
	7	1,83	0,63	0,93	1,29
	8	1,58	1,31	0,91	0,86
	9	1,57	0,72	1,50	0,79
rel. Gesamtfläche der Gefäße (144h / 0h)	10	1,13	0,57	0,77	1,57
	11	1,03	0,97	1,03	1,05
	12	0,87	0,78	1,40	0,83
	13	0,74	1,23	0,79	1,12
	14	0,75	0,67	0,69	
	15	0,73	0,73	1,10	
	16	1,18	1,07	0,83	
	17	1,03	1,21	1,11	
	18	1,29	0,78	1,49	
	19		1,06		
	20		0,81		
Ø der rel. Gesamt- fläche der Gefäße (144h / 0h)		1,07	0,99	0,97	0,98
SD		0,32	0,21	0,28	0,30
p-Wert			0,0478		0,8895

4 Diskussion

In vitro-Experimente wie das Zellkulturmodell sind aufgrund der Abwesenheit systemischer Einflussfaktoren sehr gut reproduzierbar. Sie zeichnen sich i.d.R. durch eine leichte Durchführbarkeit und vergleichsweise geringe Kosten aus. Inwiefern die gewonnenen Ergebnisse auf lebende Organismen übertragen werden können, muss jedoch im Einzelfall geprüft werden. Systemische Einflüsse wie beispielsweise die Stoffwechselaktivität benachbarter Gewebe, die Angiogenese oder Entgiftungs- bzw. Transformationsreaktionen bei Medikamenten finden hingegen bei *in vivo*-Experimenten in Tieren Berücksichtigung. Allerdings sind sie meist sehr teuer, zeitaufwändig und zudem seit Jahren im Mittelpunkt ethischer Diskussionen.

Der HET-CAM-Assay stellt als *in ovo*-Experiment einen Kompromiss zwischen diesen beiden Versuchsformen dar. Er ist bereits seit vielen Jahren Bestandteil der medizinischen Forschung [41]. Vorteilhaft erweisen sich auch hier seine zügige und unkomplizierte Durchführbarkeit sowie dessen relativ geringer Kostenaufwand. Zudem gestattet er Untersuchungen in einem physiologischen Umfeld, da der Hühnerembryo einen lebenden Organismus darstellt. In der Anwendung besteht die Gefahr, dass die subjektive Ermittlung des Testergebnisses sich nachteilig auswirkt. Standardisierte Bewertungsschemata vermögen jedoch dies weitgehend auszugleichen.

Auch in präklinischen onkologischen Studien wurde das HET-CAM-Modell bereits eingesetzt. So generierten z.B. Klingenberg et al. Burkitt-Lymphome auf der CAM [43]. Lockman et al. arbeiteten mit Tumorzellen des Ovars und inokulierten diese auf der CAM [44].

Die Zelllinien LNCaP und PC-3 entstammen epithelialen Tumoren der Prostata. Entsprechend der Funktionen von Epithelien als Oberflächenschutzschicht oder Diffusionsbarriere wachsen sie in einer zweidimensionalen Monolayer. Der HET-CAM-Assay erfordert ein dreidimensionales Wachstum der Tumoren. Viele herkömmliche Methoden basieren auf Grundlagen der 2D-Zellkultur, so dass im Laufe der Arbeit diverse Arten der Durchführung des HET-CAM-Assays getestet wurden.

Um den Zellen ihr Wachstum auf der CAM zu erleichtern, wurden sie mit

Vollmedium in einer nicht beschichteten 96-Well-Rundbodenmikroplatte zur Bildung von Sphäroiden ausgesät und inkubiert, um anschließend auf dieser inokuliert zu werden. Es stellte sich heraus, dass PC-3-Zellen nicht in der Lage waren, Sphäroide auszubilden. Mit LNCaP-Zellen war dies zwar erreichbar, jedoch war aufgrund ihrer Instabilität eine Überführung auf die CAM nur bedingt möglich. In der Literatur finden sich Arbeiten, in denen bei Anwendung ähnlicher Methoden analoge Ergebnisse hinsichtlich der Sphäroidbildung mit diesen Zelllinien dokumentiert wurden [45, 46]. Dies unterstreicht die Schwierigkeit, dreidimensionales Tumorwachstum allein mit Epithelzellen zu generieren.

In der Vergangenheit wurden bereits Substanzen entwickelt, die das 3D-Wachstum von Zellen erleichtern sollen. Diese Agenzien unterscheiden sich de facto in ihrer Funktionsweise. Einige wirken auf physikalische Art, indem sie die Zellen zusammenhalten. So verwendeten beispielsweise Korff et al. Methocel™, einen Celluloseether, um Sphäroide aus Endothelzellen zu generieren [47]. Andere wiederum stimulieren die Zellen etwa durch Wachstumsfaktoren, was eine biologisch aktive Funktionsweise erkennen lässt.

Die Art der Wirkung von Corning® Matrigel® Matrix beruht auf beiden Prinzipien. Sie besteht aus Entactin, welches mit Laminin und Kollagen interagiert und so die strukturelle Organisation dieser Extrazellulärmatrixmoleküle gewährleistet. Zudem enthält sie diverse Wachstumsfaktoren wie den endothelial growth factor (EGF) und den fibroblast growth factor (FGF), die u.a. die Proliferation und Differenzierung der Zellen beeinflussen. Matrigel kommt in vielen Bereichen zur Anwendung, sowohl in *in vitro*- als auch *in vivo*-Experimenten [48–51].

Mit diesem Agens konnte in dieser Arbeit ein dreidimensionales tumorartiges Wachstum auf der CAM induziert werden. Da die Tumoren jedoch teilweise recht diffus verteilt wuchsen, wurde vor der Inokulation der Zellen eine Fläche auf der CAM hergestellt, die der Anheftung der Zellen und der Fokussierung ihres Wachstums dienen sollte. Hierzu wurden auf der einen Seite Corning® Matrigel® Matrix und auf der anderen Seite eine Lösung aus Poly-L-Lysin getestet. Letzteres wird bereits seit Jahren zur Beschichtung von Zellkulturmaterialien, wie Zellkulturplatten oder -flaschen, genutzt und verursacht weniger Kosten als die künstliche Extrazellulärmatrix. Auch im CAM-Modell wurde bereits mit Poly-L-Lysin gearbeitet [52, 53]. Des Weiteren gab es eine Kontrollgruppe, deren CAM nicht vorbehandelt wurden. Die Untersuchung ergab, dass es keinen Unterschied

machte, ob die CAM mit Corning® Matrigel® Matrix, Poly-L-Lysin oder überhaupt nicht beschichtet wurde. Da sich die Beschichtung lediglich unter den Zellen befand, hatte sie womöglich keine erkennbaren Auswirkungen auf ihr 3D-Wachstum. Angemerkt sei an dieser Stelle, dass in der Literatur keine Studien gefunden werden konnten, die ähnliche Aspekte eruierten.

Einen weiteren Einfluss auf das Tumorwachstum hatten die Silikonringe der Trokarkatheter, in denen die Zellen auf die CAM inokuliert wurden. Sie dienten einerseits der Orientierung für die tägliche Inspektion und andererseits als Barriere zur Begrenzung der zweidimensionalen Tumorausbreitung und somit der Begünstigung ihres dreidimensionalen Wachstums. Dazu wurden Ringe unterschiedlichen Durchmessers (8 und 10mm) und Höhe (1,5 und 3mm) erprobt. Einige der Ringe mit 3mm Ringdicke sanken in die CAM ein, was den Schluss zulässt, dass sie zu schwer und somit ungeeignet für das CAM-Modell waren. Ferner stellten weder die Ringe mit 8mm noch die mit 10mm Durchmesser eine Barriere für das Tumorwachstum dar. Es fiel jedoch auf, dass die unebenen Schnittkanten eine Verminderung der Transparenz zur Folge hatten, was die Inspektion der Gefäße darunter erschwerte und teils auch die CAM beschädigte. Andere Versuchseier zeigten hingegen Eintrübungen in und um die Ringe. Überdies lagerten sich einige kleine Gefäße parallel um den Ring an, was vermuten lässt, dass die Ringe selbst einen Einfluss auf die Gefäße der CAM hatten.

Angesichts dieser Beobachtungen wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, bei dem ausschließlich Silikonringe ohne Zellen oder Corning® Matrigel® Matrix auf die CAM inokuliert wurden. Erneut ließen sich Eintrübungen in und um den Ring erkennen. Diese wurden als Austrocknungserscheinungen interpretiert, hervorgerufen durch die Ringe selbst, weshalb in nachfolgenden Versuchen auf Silikonringe verzichtet wurde. Alternativ kamen selbsthergestellte Ringe aus Agarose zum Einsatz. Während der Inkubationszeit trockneten die Agaroseringe jedoch aus, schrumpften und veränderten ihre Form. So erwies sich auch dieses Material für den HET-CAM-Assay als ungeeignet. In der Literatur existieren zwei weitere Arbeiten, die über die Inokulation von Tumoren in Silikonringen auf der CAM zeugen. [54, 55]. Jedoch wurden darin keine Aussagen getätigt, ob und in welchem Maße die Ringe Einfluss auf die CAM der Eier hatten.

Unter Berücksichtigung der Erkenntnisse aus den vorherigen Versuchen wurde

daher eine Methode gewählt, bei der gänzlich auf Ringe verzichtet und stattdessen eine Zellzahl von 5×10^6 mit 30µl Corning® Matrigel® Matrix auf der CAM inokuliert wurde. Dieses Vorgehen erwies sich für ein solides Tumorstadium am geeignetsten. Nichtsdestotrotz wurden einige Ausfälle bei der Tumorgenerierung verzeichnet. Das Versterben von Eiern während der Versuchstage ist nach Studium der Literatur wohl bekannt, wird aber kaum thematisiert. Vermutlich lässt es sich auf den Prozess der manuellen Manipulation zurückführen [56].

Bezüglich der Vorgehensweise verwendeten andere Forschungsgruppen ähnliche Durchführungen für ihre HET-CAM-Assays [51]. Wiederum andere wichen von dieser Methode ab und arbeiteten beispielsweise ausschließlich mit Zellen und Ringen [54].

Letztlich bewiesen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass sowohl die transfizierten als auch die nicht transfizierten Varianten der PC-Zelllinien LNCaP und PC-3 in der Verbindung mit Corning® Matrigel® Matrix in der Lage waren, solide Tumoren auf der CAM zu bilden.

Um den Einfluss der Tumorstadiumsfaktoren miR-1 und HSP27 ohne Interaktion mit dem System des Hühnerembryos evaluieren zu können, wurden vorab *in vitro*-Wachstumskinetiken in der 2D-Zellkultur durchgeführt. Diese ließen bereits nach kurzer Inkubationszeit signifikante Unterschiede zwischen den transfizierten und den maternalen PC-Zelllinien erkennen. Nach 240h konnten die LNCaP-miR-1-Zellen nur etwa die Hälfte des Wachstums der LNCaP-Zellen aufweisen. HSP27-transfizierte PC-3-Zellen zeigten ebenfalls eine Hemmung der Proliferation. Der Unterschied zur nicht transfizierten Zelllinie betrug hier jedoch lediglich ein Fünftel.

Die Anwesenheit von miR-1 hatte folglich einen inhibitorischen Effekt auf die Zellproliferation. Eigene Arbeiten zeigten, dass diese antiproliferative Wirkung von miR-1 durch eine Interaktion mit dem Androgenrezeptor (AR) oder dem transforming growth factor beta-1 (TGFB1) erzeugt werden konnte [57]. Der antiproliferative Effekt von HSP27 erschien paradox, da ihm in der Literatur onkogene Funktionen zugesprochen werden. So postulierten beispielsweise Huang et al. eine Hemmung der Proliferationsrate nach Knockdown dieses Hitzeschockproteins in glatten Gefäßmuskelzellen [58]. Womöglich hatte die

Anpassung der Zellen auf die vermehrte Produktion von HSP27 eine negative Auswirkung auf ihre Proliferationsrate.

Im Rahmen der vorliegenden Studie sollten diese Resultate nun *in ovo* überprüft werden. Die Analyse der Tumorflächen der jeweiligen Zelllinien zeigte, dass die durchschnittliche Fläche der LNCaP-Tumoren mit $26,9\text{mm}^2$ um $4,5\text{mm}^2$ kleiner als die der LNCaP-miR-1-Tumoren war. Die Flächen der PC-3-Zelllinien hingegen wichen mit $25,7\text{mm}^2$ und $25,8\text{mm}^2$ kaum voneinander ab. Statistisch gesehen waren diese Unterschiede nicht signifikant und demzufolge konnten die Ergebnisse der *in vitro*-Experimente nicht evaluiert werden. Bedingt durch die Tatsache, dass sich die Zellen im Laufe der Inkubationszeit auf der CAM verdichteten und in die Höhe anstatt in die Breite wuchsen, wurden die Formen der Tumoren in der Folge als Kugelsegmente angenommen und der Durchschnitt ihrer Mantelflächen berechnet.

Bei LNCaP-Tumoren betrug dieser $51,3\text{mm}^2$ und bei LNCaP-miR-1-Tumoren $52,0\text{mm}^2$. Mit $51,3\text{mm}^2$ war auch die transfizierte PC-3-Zelllinie um $3,5\text{mm}^2$ größer als die Vergleichszelllinie ohne HSP27-Überexpression. Diese Unterschiede waren nicht statistisch signifikant.

Da diese Auswertungsmethode zwar die Beurteilung der Höhe, wenn auch lediglich der Außenseite der Tumoren zuließ, wurde anschließend deren durchschnittliches Volumen berechnet. Hierfür wurden ihre Formen erneut als Kugelsegmente angenommen.

Mit $43,6\text{mm}^3$ waren die Tumoren der LNCaP-Zellen um $0,4\text{mm}^3$ größer als die der LNCaP-miR-1-Zellen. Das durchschnittliche Volumen der PC-3-HSP27-Tumoren betrug $46,2\text{mm}^3$ und übertraf das der nicht transfizierten PC-3-Zelllinie um $5,1\text{mm}^3$. Somit traten zwar die tumorsuppressive Wirkung von miR-1 und die onkogene Eigenschaft von HSP27 hervor, aber aufgrund relativ großer Standardabweichungen wiesen diese Unterschiede keine statistische Signifikanz auf. Als Ursache der Divergenz der Ergebnisse wurde angenommen, dass die Art der Datenerhebung womöglich nicht adäquat war und die Messwerte beeinflusste. Es ist anzunehmen, dass eine Optimierung des Verfahrens zur Präparation der Tumoren von der CAM die Chance böte, Streuungen der Messwerte zu vermeiden und die erhobenen Daten zu validieren.

In der Vergangenheit versuchten auch andere Arbeitsgruppen die Maße der Tumoren auf der CAM zu quantifizieren. Busch et al. analysierten hierfür das

Längenmaß, was jedoch mit Blick auf die Dreidimensionalität der Tumoren nicht auf diese Untersuchung übertragen ließ [59]. Skowron et al. untersuchten Größe und Gewicht der Tumoren [60]. Dies kommt zwar dem Prinzip der Volumenberechnung am nächsten, allerdings beruht die Studie da nicht auf der Arbeit mit PC-Zelllinien. Auch hier zeigt sich das Problem der subjektiven Ermittlung der Testergebnisse beim Gebrauch des HET-CAM-Assays.

Voraussetzung für die Proliferation und somit das Größenwachstum der Tumoren ist die Angiogenese, derer ab einer Größe von 1-2mm Tumoren bedürfen. Als Hauptregulator spielt der vascular endothelial growth factor (VEGF) die größte Rolle [19]. Sowohl die Mikro-RNA miR-1 als auch das Hitzeschockprotein HSP27 beeinflussen die Angiogenese von Tumorzellen. miR-1 wirkt inhibitorisch indem es u.a. Wachstumsfaktoren wie den vascular endothelial growth factor A (VEGFA) hemmt [61, 32]. Die angiogenen Effekte von HSP27 in Tumorzellen sind gegenwärtig noch wenig erforscht. Erwiesen ist aber, dass sezerniertes HSP27 angiogene Eigenschaften besitzt, indem es die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie den VEGF fördert bzw. ermöglicht [19].

Auf CAM mit LNCaP-Tumoren traten bei 12 von 20 Eiern (60%) Blutungen im bzw. um den jeweiligen Tumor auf. Von 21 Versuchseiern, deren CAM mit der transfizierten Zelllinie mit miR-1-Überexpression inokuliert wurden, zeigte sich dieses Phänomen bei 14 Eiern (67%) Im Vergleich dazu verursachten PC-3-Tumoren nur in 8 von 20 Fällen (40%) Blutungen, PC-3-HSP27-Tumoren in 8 von 16 Eiern (50%). Diese Beobachtung lässt zum einen eine Interpretation auf Grundlage angiogener Prozesse zu. Es liegt die Vermutung nahe, dass das Blut neugebildeten Gefäßen entstammte, die blind an der Oberfläche der CAM bzw. des Tumors endeten. Zum anderen konnten sie auch die Folge einer Form von Hämorrhagie darstellen. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in anderen Arbeiten indiziert [62, 63].

Nachweislich kam es nach durchschnittlich 82h zu Blutungen auf den mit LNCaP-Tumoren inokulierten CAM. Waren die Zellen hingegen mit miR-1 transfiziert, ließen sich diese erst 21h später beobachten. Auf CAM mit PC-3-Tumoren trat im Durchschnitt nach 108h Blut aus, folglich 6h früher als bei der transfizierten Vergleichszelllinie. Obwohl diese Abweichungen statistisch nicht signifikant waren, deutete sich zumindest die anti-angiogene Funktion der Mikro-RNA miR-1 an. Die

onkogenen Eigenschaften des Hitzeschockproteins HSP27 konnten dagegen nicht zweifelsfrei belegt werden. Voraussetzung für dessen Wirkung ist die Sekretion des Proteins. Inwiefern dieser Vorgang jedoch im CAM-Modell-System den pathologischen Veränderungen in den malignen Zellen des Patienten entspricht, konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenso nicht eruiert werden. Mögliche Ursachen werden einerseits darin gesehen, dass das Protein in den Zellen nicht genügend synthetisiert wurde, andererseits eine unzureichende Freisetzungsrates für die irrelevanten Abweichungen der Messwerte verantwortlich sein konnte.

Obendrein weisen lebende Organismen eine sehr große Individualität auf, was die Ausreißer der statistischen Auswertung erklärt. Mit größeren Versuchszahlen, wie sie beispielsweise für Tiermodelle üblich sind, ließen sich gewiss fundiertere Aussagen über die Einflüsse der beiden Tumorprogressionsfaktoren miR-1 und HSP27 bezüglich des Auftretens von Blutungen auf der CAM treffen.

Neben den erwähnten Blutungen konnte zudem bereits nach kurzer Zeit beobachtet werden, dass die Tumoren Einfluss auf die Ausrichtung der Gefäße in der CAM hatten. Viele kleine Arterien und Venen ordneten sich speichenradartig darum an. Da Tumorzellen auf eine ausreichende Versorgung angewiesen sind, wurde dies als ein Versuch, Anschluss an das Gefäßsystem der CAM zu bekommen, interpretiert. Andere Arbeiten berichteten *ex aequo* von entsprechenden Phänomenen [64, 65, 54]. Womöglich konnten einige Tumoren nicht auf der CAM wachsen, weil ihnen dieser Anschluss nicht rechtzeitig gelang, sie folglich unterversorgt waren und letztlich zu Grunde gingen.

Anschließend wurde untersucht, inwiefern die relative Gesamtfläche der Gefäße der CAM in der Aufsicht im Durchschnitt zu- bzw. abnahm. Über 144h veränderte sich diese in CAM mit LNCaP-Tumoren um den Faktor 1,07, unter Einfluss von miR-1 jedoch nur um 0,99. Diese Divergenz war statistisch signifikant. Im Gegensatz dazu betrug die relative Gesamtfläche der Gefäße der Versuchseier, deren CAM mit PC-3-HSP27-Tumoren inokuliert wurden, nach 144h das 0,98-fache im Vergleich zum 0h-Zeitpunkt und somit 0,1 mehr als in der Gruppe der maternalen Vergleichszelllinie. Diesem Ergebnis wurde keine statistische Signifikanz beigemessen.

Die angeführten Resultate belegen die anti-angiogene Funktion von miR-1. Über die Wirkung von HSP27 hinsichtlich der Zu- bzw. Abnahme der relativen

Gesamtfläche der Gefäße der CAM in der Aufsicht ließen sich nach Abschluss der Untersuchungen noch keine fundierten Aussagen treffen. Anzunehmen ist, dass eine Erhöhung der Anzahl der Versuche die Auswirkung möglicher Ausreißer auf die gemittelten Messwerte minimieren würde.

Der HET-CAM-Assay stellt ein ideales Modell zur Quantifizierung der Angiogenese und Anti-Angiogenese dar, das bereits seit Jahren in diesem Forschungsbereich Anwendung findet [66–68]. Es bestehen allerdings noch weitere Möglichkeiten, um die Angiogenese im CAM-Modell zu beurteilen. So sind das Zählen der Gefäße [69] bis hin zu histochemischen Anfärbungen mittels injizierter Fluoreszenzfarbstoffe [70] probate Mittel, deren Einsatz zu Analysezwecken im Rahmen dieser Arbeit jedoch nur bedingt möglich gewesen wäre.

Obwohl das Ziel dieser Arbeit, die Etablierung des HET-CAM-Assay, erreicht werden konnte, so bedarf ein Teil der Ergebnisse einer genaueren Betrachtung. Wünschenswert wäre eine Vertiefung und womöglich eine Erweiterung der Untersuchungen, um ausstehende Fragen zu klären.

Beispielweise könnten die präparierten und eingefrorenen Tumoren histochemisch und immunhistochemisch analysiert und auch hier tumortypische Prozesse wie Nekrosen, Angiogenese und Hämorrhagien beurteilt werden.

Ein besonderes Interesse sollte tiefergreifenden Untersuchungen der kleineren CAM-Gefäße vor und nach Tumorzellinokulation gelten, da bereits erste Anzeichen von Angiogenese im Bereich von Mikrometern stattfinden. Die makroskopischen Untersuchungen dieser Arbeit erfassten diese Veränderungen nicht. Das Ziel, eine Unterscheidung neuer von bereits bestehenden Kapillaren bedarf anderer Verfahren, wie beispielsweise der Intravitalmikroskopie, die eine international anerkannte Methode zur Analyse von Angiogenese und Mikrozirkulation darstellt [71].

Des Weiteren bestünde die Möglichkeit der *ex ovo*-Präparation. Hierzu wird die Eischale komplett abpräpariert. Dies böte zwar den Vorteil, dass der Embryo und die CAM wesentlich zugänglicher wären, gleichermaßen würde aber die Überlebensrate der Eier vermutlich sinken [72].

Ferner bildet sich die CAM erst am dritten Tag nach Bebrütung und die Hühner schlüpfen nach ca. 20 Tagen. Dieser Umstand limitiert den Beobachtungszeitraum

sehr. Hier wäre ein Wechsel zu Eiern anderer Vogelarten, beispielsweise diverser Gänsearten empfehlenswert, da diese ca. 30 Tage bebrütet werden und somit längerfristige Analysen ermöglichen würden.

5 Zusammenfassung

Der HET-CAM-Assay kombiniert die Vorteile von Zellkultursystemen und Tiermodellen, indem er leicht und rasch durchzuführende, vergleichsweise kostengünstige Untersuchungen in einem physiologischen Umfeld gestattet, ohne zu den Tierversuchen zu zählen. Das schwach ausgebildete Immunsystem des Hühnerembryos und die starke Vaskularisierung der CAM ermöglichen es, onkologische Prozesse wie das Tumorwachstum und die Angiogenese zu analysieren.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Durchführungen des Assays getestet und schließlich eine Methode entwickelt, mit der sowohl maternale als auch gentechnisch veränderte Varianten der PC-Zelllinien LNCaP und PC-3 auf der CAM inokuliert und das Tumorwachstum induziert werden konnten.

Nach der Etablierung dieses Modell-Systems wurden die tumorprogressiven Effekte der Mikro-RNA miR-1 und des Hitzeschockproteins HSP27 *in ovo* evaluiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass beide Faktoren Einfluss auf die Progression der PC-Tumoren auf der CAM hatten. Für miR-1 konnte erstmals die in der Literatur beschriebene tumorsuppressive Wirkung durch die Inhibition der Angiogenese in einem *in vivo*-Modell für das PC nachgewiesen werden. Zudem schien ihre Überexpression einen anti-proliferativen Effekt zu haben. Hinsichtlich der Funktionen von HSP27 deuteten sich Tendenzen an. Auch hier wurden erstmals angiogene Prozesse in einem *in vivo* Modell für das PC analysiert. Diese Untersuchungen bestätigten die postulierten tumorbiologischen Eigenschaften von HSP27 als Onkogen durch die Förderung der Angiogenese, aber auch der Proliferation.

6 Anhang

Tabelle 11: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms [73]

Primärtumor	
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar oder positive Zytologie
T0	Kein Hinweis auf Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	klinisch nicht erkennbarer Tumor, der weder tastbar noch in bildgebenden Verfahren sichtbar ist
T1a	Tumor, zufälliger histologischer Befund ("incidental carcinoma") in 5% oder weniger des resezierten Gewebes
T1b	Tumor, zufälliger histologischer Befund ("incidental carcinoma") in mehr als 5% des resezierten Gewebes
T1c	Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert
T2	Tumor begrenzt auf Prostata
T2a	Tumor befällt die Hälfte eines Lappens oder weniger
T2b	Tumor befällt mehr als die Hälfte eines Lappens
T2c	Tumor in beiden Lappen
T3	Tumor durchbricht die Prostatakapsel
T3a	Extrakapsuläre Ausbreitung (einseitig oder beidseitig)
T3b	Tumor infiltrierte Samenblase(n)
T4	Tumor ist fixiert oder infiltrierte andere benachbarte Strukturen als Samenblasen, z.B. Blasen Hals, Sphincter externus, Rektum und/oder Levatormuskel und/oder ist an der Beckenwand fixiert
Lymphknotenmetastasen	
Nx	regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	kein Befall der regionären Lymphknoten
N1	regionäre Lymphknotenmetastasen
Fernmetastasen	
Mx	Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	nichtregionäre Lymphknoten
M1b	Knochenmetastasen
M1c	andere Lokalisation(en)

7 Literaturverzeichnis

- 1 *Attard G, Parker C, Eeles RA et al.* Prostate cancer. *The Lancet* 2016; 387: 70–82
- 2 *Bashir MN.* Epidemiology of Prostate Cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 2015; 16: 5137–5141
- 3 *Leitlinienprogramm Onkologie.* Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms; Dezember 2016
- 4 *Romero-Otero J, García-Gómez B, Duarte-Ojeda JM et al.* Active surveillance for prostate cancer. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association* 2016; 23: 211–218
- 5 *Hellerstedt BA, Pienta KJ.* The current state of hormonal therapy for prostate cancer. *CA: a cancer journal for clinicians* 2002; 52: 154–179
- 6 *van de Wijngaart DJ, Dubbink HJ, van Royen ME et al.* Androgen receptor coregulators. Recruitment via the coactivator binding groove. *Molecular and cellular endocrinology* 2012; 352: 57–69
- 7 *Stope MB, Schubert T, Staar D et al.* Effect of the heat shock protein HSP27 on androgen receptor expression and function in prostate cancer cells. *World journal of urology* 2012; 30: 327–331
- 8 *Weiss M, Burchardt M, Stope M. B.* Master of puppets in prostate cancer. Heat shock protein 27 is pulling androgen receptor's strings. *Can Cell Microenviron* 2014
- 9 *Stope MB, Bradl J, Peters S et al.* Shortened isoforms of the androgen receptor are regulated by the cytoprotective heat-shock protein HSPB1 and the tumor-suppressive microRNA miR-1 in prostate cancer cells. *Anticancer research* 2013; 33: 4921–4926
- 10 *Chmelar R, Buchanan G, Need EF et al.* Androgen receptor coregulators and their involvement in the development and progression of prostate cancer. *International journal of cancer* 2007; 120: 719–733
- 11 *Stope MB, Klinkmann G, Diesing K et al.* Heat Shock Protein HSP27 Secretion by Ovarian Cancer Cells Is Linked to Intracellular Expression Levels, Occurs Independently of the Endoplasmic Reticulum Pathway and HSP27's

- Phosphorylation Status, and Is Mediated by Exosome Liberation. *Disease markers* 2017; 2017: 1575374
- 12 *Stope MB, Koensgen D, Burchardt M et al.* Jump in the fire--heat shock proteins and their impact on ovarian cancer therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2016; 97: 152–156
 - 13 *Stope MB, Weiss M, Preuss M et al.* Immediate and transient phosphorylation of the heat shock protein 27 initiates chemoresistance in prostate cancer cells. *Oncology reports* 2014; 32: 2380–2386
 - 14 *Stope MB, Stender C, Schubert T et al.* Heat-shock protein HSPB1 attenuates microRNA miR-1 expression thereby restoring oncogenic pathways in prostate cancer cells. *Anticancer research* 2014; 34: 3475–3480
 - 15 *Zoubeidi A, Zardan A, Beraldi E et al.* Cooperative interactions between androgen receptor (AR) and heat-shock protein 27 facilitate AR transcriptional activity. *Cancer research* 2007; 67: 10455–10465
 - 16 *Hassan S, Biswas MHU, Zhang C et al.* Heat shock protein 27 mediates repression of androgen receptor function by protein kinase D1 in prostate cancer cells. *Oncogene* 2009; 28: 4386–4396
 - 17 *Feng J-T, Liu Y-K, Song H-Y et al.* Heat-shock protein 27. A potential biomarker for hepatocellular carcinoma identified by serum proteome analysis. *Proteomics* 2005; 5: 4581–4588
 - 18 *Kardys I, Rifai N, Meilhac O et al.* Plasma concentration of heat shock protein 27 and risk of cardiovascular disease. A prospective, nested case-control study. *Clinical chemistry* 2008; 54: 139–146
 - 19 *Thuringer D, Jego G, Wettstein G et al.* Extracellular HSP27 mediates angiogenesis through Toll-like receptor 3. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2013; 27: 4169–4183
 - 20 *Lee Y-J, Lee H-J, Choi S-H et al.* Soluble HSPB1 regulates VEGF-mediated angiogenesis through their direct interaction. *Angiogenesis* 2012; 15: 229–242
 - 21 *Salari S, Seibert T, Chen Y-X et al.* Extracellular HSP27 acts as a signaling molecule to activate NF- κ B in macrophages. *Cell stress & chaperones* 2013; 18: 53–63
 - 22 *Rayner K, Chen Y-X, McNulty M et al.* Extracellular release of the atheroprotective heat shock protein 27 is mediated by estrogen and

- competitively inhibits acLDL binding to scavenger receptor-A. *Circulation research* 2008; 103: 133–141
- 23 *Gu L, Li H, Chen L et al.* MicroRNAs as prognostic molecular signatures in renal cell carcinoma. A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2015; 6: 32545–32560
- 24 MicroRNA. Neglected Biomarkers. *ARC Journal of Urology* 2017; 2
- 25 *Weiss M, Brandenburg L-O, Burchardt M et al.* MicroRNA-1 properties in cancer regulatory networks and tumor biology. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2016; 104: 71–77
- 26 *Acunzo M, Romano G, Wernicke D et al.* MicroRNA and cancer--a brief overview. *Advances in biological regulation* 2015; 57: 1–9
- 27 *Baranwal S, Alahari SK.* miRNA control of tumor cell invasion and metastasis. *International journal of cancer* 2010; 126: 1283–1290
- 28 *Melkamu T, Zhang X, Tan J et al.* Alteration of microRNA expression in vinyl carbamate-induced mouse lung tumors and modulation by the chemopreventive agent indole-3-carbinol. *Carcinogenesis* 2010; 31: 252–258
- 29 *Migliore C, Martin V, Leoni VP et al.* MiR-1 downregulation cooperates with MACC1 in promoting MET overexpression in human colon cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012; 18: 737–747
- 30 *Novello C, Pazzaglia L, Cingolani C et al.* miRNA expression profile in human osteosarcoma. Role of miR-1 and miR-133b in proliferation and cell cycle control. *International journal of oncology* 2013; 42: 667–675
- 31 *Niu J, Sun Y, Guo Q et al.* miR-1 Inhibits Cell Growth, Migration, and Invasion by Targeting VEGFA in Osteosarcoma Cells. *Disease markers* 2016; 2016: 7068986
- 32 *Letelier P, García P, Leal P et al.* miR-1 and miR-145 act as tumor suppressor microRNAs in gallbladder cancer. *International journal of clinical and experimental pathology* 2014; 7: 1849–1867
- 33 *Nohata N, Sone Y, Hanazawa T et al.* miR-1 as a tumor suppressive microRNA targeting TAGLN2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2011; 2: 29–42

- 34 *Fleming JL, Gable DL, Samadzadeh-Tarighat S et al.* Differential expression of miR-1, a putative tumor suppressing microRNA, in cancer resistant and cancer susceptible mice. *PeerJ* 2013; 1: e68
- 35 *Lu J, Zhao F-P, Peng Z et al.* EZH2 promotes angiogenesis through inhibition of miR-1/Endothelin-1 axis in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* 2014; 5: 11319–11332
- 36 *Nasser MW, Datta J, Nuovo G et al.* Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1. *The Journal of biological chemistry* 2008; 283: 33394–33405
- 37 *Stope MB, Peters S, Großbrummel H et al.* Androgen receptor (AR) inhibitor ErbB3-binding protein-1 (Ebp1) is not targeted by the newly identified AR controlling signaling axis heat-shock protein HSP27 and microRNA miR-1 in prostate cancer cells. *World journal of urology* 2015; 33: 323–327
- 38 *Schlatter P, König MF, Karlsson LM et al.* Quantitative study of intussusceptive capillary growth in the chorioallantoic membrane (CAM) of the chicken embryo. *Microvascular research* 1997; 54: 65–73
- 39 *Wilting J, Birkenhäger R, Eichmann A et al.* VEGF121 induces proliferation of vascular endothelial cells and expression of flk-1 without affecting lymphatic vessels of chorioallantoic membrane. *Developmental biology* 1996; 176: 76–85
- 40 *Yuan Y-J, Xu K, Wu W et al.* Application of the chick embryo chorioallantoic membrane in neurosurgery disease. *International journal of medical sciences* 2014; 11: 1275–1281
- 41 *Luepke NP.* Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 1985; 23: 287–291
- 42 *Liebsch M, Spielmann H.* Currently available in vitro methods used in the regulatory toxicology. *Toxicology letters* 2002; 127: 127–134
- 43 *Klingenberg M, Becker J, Eberth S et al.* The chick chorioallantoic membrane as an in vivo xenograft model for Burkitt lymphoma. *BMC cancer* 2014; 14: 339
- 44 *Lokman NA, Elder ASF, Ricciardelli C et al.* Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. *International journal of molecular sciences* 2012; 13: 9959–9970

- 45 *Nishikawa Y, Okuzaki D, Fukushima K et al.* Withaferin A Induces Cell Death Selectively in Androgen-Independent Prostate Cancer Cells but Not in Normal Fibroblast Cells. *PLoS one* 2015; 10: e0134137
- 46 *Eder T, Weber A, Neuwirt H et al.* Cancer-Associated Fibroblasts Modify the Response of Prostate Cancer Cells to Androgen and Anti-Androgens in Three-Dimensional Spheroid Culture. *International journal of molecular sciences* 2016; 17
- 47 *Korff T, Augustin HG.* Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *The Journal of cell biology* 1998; 143: 1341–1352
- 48 *Billaud M, Donnenberg VS, Ellis BW et al.* Classification and Functional Characterization of Vasa Vasorum-Associated Perivascular Progenitor Cells in Human Aorta. *Stem cell reports* 2017
- 49 *Kaufman G, Skrtic D.* Spatial development of gingival fibroblasts and dental pulp cells. Effect of extracellular matrix. *Tissue & cell* 2017
- 50 *Zhang E, Shi H, Yang L et al.* Ginsenoside Rd regulates the Akt/mTOR/p70S6K signaling cascade and suppresses angiogenesis and breast tumor growth. *Oncology reports* 2017
- 51 *Durupt F, Koppers-Lalic D, Balme B et al.* The chicken chorioallantoic membrane tumor assay as model for qualitative testing of oncolytic adenoviruses. *Cancer gene therapy* 2012; 19: 58–68
- 52 *Al-Jamal KT, Al-Jamal WT, Akerman S et al.* Systemic antiangiogenic activity of cationic poly-L-lysine dendrimer delays tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107: 3966–3971
- 53 *Pacini S, Gulisano M, Vannucchi S et al.* Poly-L-lysine/heparin stimulates angiogenesis in chick embryo chorioallantoic membrane. *Biochemical and biophysical research communications* 2002; 290: 820–823
- 54 *Mangieri D, Nico B, Coluccia AML et al.* An alternative in vivo system for testing angiogenic potential of human neuroblastoma cells. *Cancer letters* 2009; 277: 199–204
- 55 *Nakamura O, Ueki K, Hibi T et al.* Inhibition of neovascularization and tumor growth by dexamethasone. *No to shinkei = Brain and nerve* 1992; 44: 37–41

-
- 56 *Walewska M, Dolka I, Malek A et al.* Experimental tumor growth of canine osteosarcoma cell line on chick embryo chorioallantoic membrane (in vivo studies). *Acta veterinaria Scandinavica* 2017; 59: 30
- 57 *Stope MB, Stender C, Schubert T et al.* Heat-shock protein HSPB1 attenuates microRNA miR-1 expression thereby restoring oncogenic pathways in prostate cancer cells. *Anticancer research* 2014; 34: 3475–3480
- 58 *Huang J, Xie L-d, Luo L et al.* Silencing heat shock protein 27 (HSP27) inhibits the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Molecular and cellular biochemistry* 2014; 390: 115–121
- 59 *Busch M, Grosse-Kreul J, Wirtz JJ et al.* Reduction of the tumorigenic potential of human retinoblastoma cell lines by TFF1 overexpression involves p53/caspase signaling and miR-18a regulation. *International journal of cancer* 2017
- 60 *Skowron MA, Sathe A, Romano A et al.* Applying the chicken embryo chorioallantoic membrane assay to study treatment approaches in urothelial carcinoma. *Urologic oncology* 2017
- 61 *Xie M, Dart DA, Guo T et al.* MicroRNA-1 acts as a tumor suppressor microRNA by inhibiting angiogenesis-related growth factors in human gastric cancer. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association* 2017
- 62 *Xu Z, Zikos D, Tamosiunaite A et al.* Identification of 10 cowpox virus proteins that are necessary for induction of hemorrhagic lesions (red pocks) on chorioallantoic membranes. *Journal of virology* 2014; 88: 8615–8628
- 63 *Feflea S, Cimpean AM, Ceausu RA et al.* Effects of antibodies to EG-VEGF on angiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. *In vivo (Athens, Greece)* 2012; 26: 793–797
- 64 *Avram S, Coricovac D-E, Pavel IZ et al.* Standardization of A375 human melanoma models on chicken embryo chorioallantoic membrane and Balb/c nude mice. *Oncology reports* 2017
- 65 *Deng C, Zhang D, Shan S et al.* Angiogenic effect of intercellular adhesion molecule-1. *J. Huazhong Univ. Sc. Technol.* 2007; 27: 9–12
- 66 *Ribatti D, Nico B, Vacca A et al.* The gelatin sponge-chorioallantoic membrane assay. *Nature protocols* 2006; 1: 85–91

-
- 67 *Xu Q, Liu G-M, Wang F-Y et al.* The Effect of Ruxolitinib on the Expression of VEGF and HIF-1 α in Leukemia HEL Cells. *Sichuan da xue xue bao. Yi xue ban* = Journal of Sichuan University. Medical science edition 2016; 47: 669–673
- 68 *Esteves CL, Sheldrake TA, Mesquita SP et al.* Isolation and characterization of equine native MSC populations. *Stem cell research & therapy* 2017; 8: 80
- 69 *Schimke MM, Stigler R, Wu X et al.* Biofunctionalization of scaffold material with nano-scaled diamond particles physisorbed with angiogenic factors enhances vessel growth after implantation. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 2016; 12: 823–833
- 70 *Nowak-Sliwinska P, Segura T, Iruela-Arispe ML.* The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis* 2014; 17: 779–804
- 71 *Sckell A, Leunig M.* Dorsal Skinfold Chamber Preparation in Mice. Studying Angiogenesis by Intravital Microscopy. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2016; 1430: 251–263
- 72 *Dohle DS, Pasa SD, Gustmann S et al.* Chick ex ovo culture and ex ovo CAM assay. How it really works. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2009
- 73 *Wittekind C.* TNM - Klassifikation maligner Tumoren. 7. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH-Verl; 2010