

Diplomarbeit

**Etablierung und Optimierung eines Systems zur  
Transfektion von miRNA-451 in standardisierte  
artifizielle Tumorsphären**

eingereicht von

**Daniel Martin Hamberger**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Klinik für Neurochirurgie**

**Forschungseinheit für Experimentelle Neurotraumatologie**

unter der Anleitung von

Univ.-Ass.<sup>in</sup> PD<sup>in</sup> Dr.<sup>in</sup> rer nat. Silke Patz und Univ.-Ass. Dr. med. Gord von Campe

Ort, Datum 15.01.2016

## **Eidesstattliche Erklärung**

**Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.**

**Graz am 15.01.2016**

**Daniel Hamberger eh.**

## Danksagungen

Mein Dank gilt der gesamten Forschungsgruppe der Experimentellen Neurotraumatologie. Jedes Teammitglied stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof.<sup>in</sup> Dr.<sup>in</sup> Ute Schäfer und Herrn Prof. Dr. Michael Mokry die mir die Möglichkeit gaben, diese Arbeit in ihrer Forschungsgruppe zu erarbeiten.

Besonders möchte ich auch Frau PD<sup>in</sup> Dr.<sup>in</sup> rer nat. Silke Patz und Univ.-Ass. Dr. med. Gord von Campe für die Betreuung meiner Diplomarbeit danken.

Mein Dank gilt auch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Dagmar und Friedrich Hamberger, die mich in meiner ganzen Studienzeit mit aller Kraft unterstützten.

## Kurzzusammenfassung

**Ziele:** Erstellung eines *in vitro* Tumormodells. Etablierung eines Systems zur effizienten Transfektion einer microRNA.

**Einleitung:** Das Glioblastom hat nach wie vor eine infauste Prognose, deshalb ist die Entwicklung neuer Therapien von großer Bedeutung. miRNAs wecken in der Forschungswelt besondere Interessen. Die vorliegende Diplomarbeit untersucht die Möglichkeiten einer Transfektion einer bestimmten micro RNA (miRNA-451) in Zellen und Gewebe. MiRNA-451 ist im Glioblastom herunterreguliert und wird als tumorsupprimierend angesehen.

**Methoden:** Für die vorliegenden Experimente wurde die Glioblastom-Zelllinie A172 verwendet. Über Hanging-Drop-Kultur werden artifizielle Tumorsphären aus den A172 Zellen generiert. Zunächst wird durch die Verbindung dieser Sphären mit einer organotypischen Kultur (OTC) vom Rattencortex ein *in vitro* Tumormodell etabliert. Durch die Färbung mit DiO kann dabei die Entwicklung des artifiziellen Tumors ständig beobachtet werden. Es werden 2 Systeme vorgestellt mit denen es möglich ist die miRNA-451 in ein Zielgewebe einzubringen, das Tet-on System und das Lipofectin System. Es wird gezeigt welche Möglichkeiten zur Transfektion von miRNA-451 zur Verfügung stehen und welche davon effizient sind. Der Erfolg der Transfektion bzw. der Induktion wird mittels Fluoreszenzmikroskop dargestellt, die Effizienz mittels qRT-PCR quantifiziert.

**Ergebnisse:** Die Analysen zeigen eine hohe Effizienz bei Transfektion mittels Lipofektinen. Für die Induktion beim Tet-on System zeigt sich keine signifikante Erhöhung der miRNA-451 in den Zellen/dem Gewebe. Es wird gezeigt, dass Lipofectine auch von der OTC aufgenommen werden. Eine gewebsspezifische Anwendung ist demnach noch nicht gegeben. Für die ständige Verfügbarkeit von Sphären wird außerdem ein Protokoll für die Kryopreservation etabliert.

**Diskussion:** Obwohl die Effizienz der Lipofection gezeigt wird ist es nötig die Spezifität dieses Systems zu steigern um einen therapeutischen Ansatz entwickeln zu können. Das *in vitro* Modell ist in seinem jetzigen Ansatz noch nicht ausgereift und bedarf weiterer Entwicklung.

## Abstract

**Aim:** The design of an *in vitro* tumour model. Establishment of an efficient system for transfection of miRNA- 451 into cells/tissue.

**Introduction:** The prognosis of the glioblastoma still remains bad. Therefore it is highly important to develop new therapeuticall strategies. miRNAs are very interesting tools in current research. This thesis examines opportunities to transfect miRNA-451 into cells and tissue. This miRNA is down regulated in glioblastoma and is well known as tumour suppressor.

**Methods:** The glioblastoma cell-line A172 was used for the experiments. We created artificial tumour spheroids using a hanging-drop cell culture assay. First we establish an *in vitro* tumour model by connecting the tumour spheroids to organotypical cultures of rat cortex. DiO staining reveals the possibility to constantly observe the development of the artificial tumour *in vitro*. Two possible systems for transfection of miRNA-451 into cells and tissue were shown: the tet-on system and the lipofectine system. Opportunities for efficient transfection were shown and the most efficient method presented. Successful transfection is controlled by fluorescence microscopy. Efficiency of transfection is quantified by qRT-PCR analysis.

**Results:** Analysis shows a high efficiency of miRNA transfection using lipofectines. Induction of cells of tet-on system shows no significant increase of miRNA-451 in the cells/tissue. Successful uptake of miRNA by OTC using lipofectines was shown. However no tissue specific uptake of miRNAs was observed. For permanent availability of spheroids, a protocol for cryopreservation is established.

**Discussion:** Although transfection efficiency using the lipofectine system was shown, increasing specificity is necessary to develop therapeutic strategies. The *in vitro* tumour model is not yet enough elaborated. Further development is required for regular usage.

# Inhaltsverzeichnis

## Inhalt

Danksagungen .....	ii
Kurzzusammenfassung .....	iii
Abstract .....	iv
Inhaltsverzeichnis .....	v
Wichtige Abkürzungen .....	vii
Abbildungsverzeichnis .....	viii
1 Einleitung .....	1
1.1 Einführung .....	1
1.2 Das Glioblastoma multiforme .....	1
1.3 Micro-RNA .....	3
1.3.1 Die Micro-RNA 451 .....	4
2 Material und Methoden .....	5
2.1 Allgemeines .....	5
2.1.1 Die Zelllinie A172 .....	5
2.1.2 Splitting der Zellen .....	6
2.1.3 Pelletieren von Zellen und Sphären für PCR .....	6
2.1.4 Zellzahlbestimmung .....	6
2.2 Das Hanging-Drop Verfahren .....	7
2.2.1 Etablierung der Maße .....	8
2.2.2 Einfrieren von Hanging-Drop-Spheres .....	10
2.3 Die organotypische Kultur (OTC) .....	14
2.4 In Vitro-Tumormodell .....	16
2.4.1 DIO Färbung von Tumorsphären mit vorkultivierten OTCs .....	16
2.4.2 DIO Färbung von Tumorsphären mit frischen OTCs .....	17
2.5 Etablierung eines Systems zur Einbringung der MiRNA 451 in Zielgewebe .....	18
2.5.1 Das Tet-on/Tet-off System .....	18
2.5.2 Die Lipofection mit MiRNA 451 Mimics .....	21
2.6 MiRNA Isolierung und PCR .....	25
2.6.1 miRNA Isolierung .....	25
2.6.2 Photometrische Quantifizierung und cDNA-Synthese .....	25

2.6.3	qRT-PCR .....	25
3	Ergebnisse .....	26
3.1	Ergebnisse der Einfrierexperimente .....	26
3.1.1	Kein Unterschied in Vitalität .....	26
3.1.2	IMARIS-Auswertung der Sphärengrößen .....	26
3.1.3	Morphologische Veränderungen nach Einfrieren .....	27
3.2	Ergebnis der Erstellung eines In-Vitro Tumormodells .....	30
3.3	Ergebnis der Etablierung eines Systems zur Einbringung der miRNA 451 33	
3.3.1	Ergebnisse zum Tet-on System .....	33
3.3.2	Ergebnisse zur Transfektion mittels Lipofectin System .....	39
4	Diskussion .....	46
5	Literaturverzeichnis .....	49
6	Appendix .....	56
6.1	Hergestellte Reagenzien .....	56
6.2	Auswertung der Sphärengrößen über das IMARIS-Programm (Siehe 3.1.2) .....	57

## Wichtige Abkürzungen

- A172 Glioblastomzelllinie A172
- DiO 3,3'-Dioctadecyloxacarbocyanin-Perchlorat
- FACS Fluorescence activated cell sorting
- mRNA Messenger-RNA
- miRNA Mikro-RNA
- OTC organtypische Kultur
- PBS Phosphat-buffered-Saline, ein Puffer
- PCR Polymerase-chain-reaction
- RNase Ribonuklease

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1 Gezeigt wird die Herstellung einer Hanging Drop Kultur. ....	8
Abbildung 2-2 Vergleich der Sphärengrößen zur Etablierung einer geeigneten Größe. ....	9
Abbildung 2-3 Vergleich von einer Sphäre aus 5000 Zellen mit einer Sphäre aus 10000 Zellen im Verlauf .....	10
Abbildung 2-4 Aufbau des Versuchs zum Vergleich von aufgetauten und frischen Tumorsphären .....	14
Abbildung 3-1: 7-Tage Überleben von Hanging drop Sphären in der 48-Well-Platte im Vergleich.....	28
Abbildung 3-2: 7-Tage Überleben von Hanging drop Sphären in der Ultra-low-attachement-Well-Platte im Vergleich .....	29
Abbildung 3-3 Zellanomalien bei aufgetauten Sphären.....	30
Abbildung 3-4: Entwicklung <i>in vitro</i> -Tumormodells bei Verbindung einer HD-Sphäre mit einer bereits fertigen OTC im zeitlichen Verlauf.....	32
Abbildung 3-5: : Entwicklung des <i>in vitro</i> -Tumormodells bei Verbindung einer HD-Sphäre mit einer OTC bei gleichzeitiger Einbettung in Plasma und Thrombin im zeitlichen Verlauf. ....	33
Abbildung 3-6 Transduzierte A172-Zellen nach Induktion im Vergleich .....	34
Abbildung 3-7 Transduzierte Hanging-drop Sphären nach Induktion im Vergleich .....	35
Abbildung 3-8: Vergleich der Effizienz von Induktionszeitpunkten und Dauer bei Tet451 transfizierten Sphären .....	37
Abbildung 3-9: Vergleich der Effizienz von Induktionszeitpunkten und Dauer bei TetC transfizierten Sphären.....	37
Abbildung 3-10 Vergleich nicht transfizierter A172 Zellen bei Anwesenheit von Doxycyclin im Medium.....	38
Abbildung 3-11 qRT-PCR Ergebnis von transduzierten A172 Zellen 2 Tage nach Induktion mit Doxycyclin .....	39
Abbildung 3-12 Konzentrationsreihe von DY-547 an Zellen.....	40
Abbildung 3-13: A172 Zellen 2 Tage nach Transfektion.....	41
Abbildung 3-14 Hanging-Drop-Sphären 2 Tage nach Transfektion.....	42

Abbildung 3-15 Organtypische Kulturen 2 Tage nach Transfektion. ....	43
Abbildung 3-16 qRT-PCR Ergebnis zur Transfektion der A172 Zellen.....	44
Abbildung 3-17 qRT-PCR Ergebnis zur Transfektion der Hanging-Drop Sphären .....	45
Abbildung 3-18 qRT-PCR Ergebnis zur Transfektion der OTCs.....	46

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

Trotz der ständigen Verbesserung in der Therapie maligner intrakranieller Tumore ist die Prognose für Betroffene meist schlecht. Gerade hochgradige Gliome sind trotz neuester Therapiemethoden mit einer sehr geringen Lebenserwartung assoziiert. Die Glioblastome bilden in dieser Gruppe die häufigste und bösartigste Variante. Durch die Erforschung neuer zielgerichteter oder lokaler Therapiemöglichkeiten wird versucht, nicht nur das Überleben zu verlängern, sondern auch die Auswirkungen der Therapie selbst zu minimieren. Die miRNA-451 ist aufgrund der Ergebnisse neuerer Forschung als ein interessanter Kandidat für die Entwicklung einer zielgerichteten Tumorthherapie des Glioblastoma multiforme anzusehen.

In dieser Diplomarbeit wurden verschiedene Möglichkeiten untersucht die miRNA-451 effizient in Tumorgewebe einzubringen. Dazu wurde das Model der organotypischen Kultur von Rattencortex in Kombination mit einer artifiziellen Tumorsphäre aus einer Glioblastomzelllinie gewählt. Dadurch kann man die Ausbreitung der Zellen aus dem artifiziellen Tumor *in vitro* beobachten. Dabei werden hier organotypische Hirnschnittkulturen der Ratte und über das Hanging Drop Verfahren hergestellte größenstandardisierte Tumorsphären eingesetzt. Diese Methode erlaubt uns verschiedene Möglichkeiten der miRNA Transfektion des Tumors zu erproben und die Folgen für das Gewebe abzuschätzen.

## 1.2 Das Glioblastoma multiforme

Das Glioblastoma multiforme ist der häufigste maligne Hirntumor des Erwachsenen. Lehrmeinung ist derzeit, dass das Glioblastom aus Gliazellen hervorgeht. Nach der WHO-Klassifikation wird es ausnahmslos als Grad IV eingestuft (1). Umgekehrt sind alle astrozytären Neoplasien mit dem Grad IV als Glioblastome anzusehen (2). Der überwiegende Anteil entsteht als primäre Form *de novo*, was allerdings nicht bedeutet, dass sie aufgrund einer einzelnen Mutation entstehen. Vielmehr weisen sie wie andere Neoplasien eine Vielzahl genetischer Mutationen auf. Die sekundären Glioblastome entwickeln sich

langsam aus weniger malignen Neoplasien wie anaplastischen oder diffusen low-grade-Astrozytomen. Dabei betrifft das primäre Glioblastom vor allem ältere Personen, während das sekundäre eher im mittleren Lebensalter vorkommt (3).

Die Inzidenz liegt je nach Autor und Land zwischen 2,96-4,67 per 100.000 Personen pro Jahr, dabei sind mehr Männer als Frauen betroffen.(3) (4)

Glioblastome sind zumeist telencephal und überwiegend im Lobus frontalis und Lobus temporalis, seltener in hinteren Hirnabschnitten, lokalisiert.

Sie wachsen diffus infiltrierend. Im Falle eines Hinüberwachsens auf die kontralaterale Hemisphäre über den Balken, werden sie aufgrund ihres Aussehens in der Bildgebung, als Schmetterlingsgliome bezeichnet (5) .

Makroskopisch ist der Tumor gut abgrenzbar, obgleich in der Bildgebung meist ein ausgeprägtes perifokales Ödem sichtbar ist.

Mikroskopisch ist das Glioblastom außerordentlich vielgestaltig, was auch zu seinem Beinamen multiforme geführt hat. Die Zellen sind meist astrozytär differenziert.

Die Zellmorphologie geht dabei von sehr kleinen Zellen bis zu Riesenzellen. Dabei finden sich ausgeprägte Kernpleomorphien. Man erkennt histologisch außerdem eine erhöhte Mitoseaktivität der Zellen. Es lassen sich Tumorzellen erkennen die perifokal strichförmig oder radiär um eine Nekrose angeordnet sind. Neben den nekrotischen Bereichen finden sich oft Areale mit Einblutungen. Es kann durch die mikrovaskuläre Proliferation auch zur Ausbildung Glomerulum ähnlicher Gefäßproliferate evtl. mit thrombosierte Gefäße kommen (6). Prinzipiell sind Glioblastome sehr gut vaskularisiert. Die Gefäße weisen aber hochgradige Wandschichtstörungen auf und sind deshalb überaus vulnerabel. Im Falle eines Nachweises anaplastisch entarteter mesenchymaler Anteile, ausgehend von den Fibroblasten der Blutgefäße wird der Tumor als Gliosarkom oder gliosarkomatöser Misch tumor bezeichnet (7). Auch in der Ausprägung und der Art genetischer Mutationen unterscheiden sich die Arten des Glioblastoms. Die häufigste Mutation sowohl bei primären als auch sekundärem Glioblastom ist die Loss of Heterozygosity (LOH 10q), welche typischerweise mit anderen genetischen Mutationen vorkommt (3).

Klinisch zeigt sich das Glioblastom je nach Lage und Größe sehr unterschiedlich. Aufgrund der knöchernen Begrenzung des Schädels führen intrakranielle Raumforderungen zwangsläufig zu einer Steigerung des Hirndrucks. Dies zeigt

sich anhand von Symptomen wie häufigen Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen. Durch das rasche Wachstum entwickeln sich neurologische Symptome relativ schnell, meist im Zeitraum von wenigen Wochen. Dabei kommt es durch Kompression von neuronalen Strukturen zu neurologischen Auffälligkeiten wie Hörverlust, sowie motorische und sensible Ausfälle. Auch das Auftreten epileptischer Anfälle ist möglich. Wie oben erwähnt kann es durch die vulnerablen Tumorgefäße außerdem zu Blutungen kommen, welche dann durch die plötzliche Erhöhung des intrakraniellen Druckes starke Symptome verursacht.

Differentialdiagnostisch sind alle anderen Formen maligner Raumforderungen auszuschließen, insbesondere andere höhergradige Gliome. Die Diagnose wird nach stereotaktischer oder navigationsgestützter Biopsie oder nach Tumorextirpation gestellt. Entscheidend für die endgültige Diagnose eines Glioblastoms ist der histologische Befund (2) (1).

Die Prognose ist auch trotz Therapie infaust. Die 5-Jahresüberlebensrate für das Glioblastom liegt bei unter 5% (8). Dabei ist diese Prognose abhängig von der Behandlung, der Lage und dem Alter des Patienten. Neben den üblichen Behandlungsverfahren wie der möglichst radikalen Entfernung des Tumors unterstützt durch Radio und/oder Chemotherapie stehen derzeit nur wenige Alternativen zur Verfügung.(9)

Aufgrund der überaus schlechten Prognose trotz bestmöglicher Therapie und den Auswirkungen der Therapie selbst, ist es von großer Bedeutung eine alternative Behandlung zu finden und zu etablieren.

### **1.3 *Micro-RNA***

Bei der Untersuchung des LIN 4 Gens entdeckten Lee et al. im Jahr 1993, dass das Gen nicht für ein Protein codierte sondern identifizierten stattdessen zwei Transkripte 22 und 61 Nukleotide (nt) groß, welche komplementäre Sequenzen zur 3`UTR Region der LIN-14 mRNA aufwiesen (10). Das 61nt Transkript stellt den Rest der pre-miRNA dar während das 22nt Molekül die eigentliche miRNA ist. Diese aus ca. 22 Nukleotiden bestehenden micro-RNAs regulieren posttranskriptionell die Genexpression indem sie komplementär an die mRNA binden (11).

Das Transkript eines miRNA Gens, die sogenannte pri-miRNA wird zunächst im Nukleus von dem Enzym Drosha III RNase und seinem Bindungspartner DGCR8 (DiGeorge-syndrome-critical-region-gene-8) gespalten um die precursor-miRNA (pre-miRNA) zu erhalten. Diese wird im Zytosol von der Dicer RNase III zu einem miRNA/miRNA\* Paar geteilt. Ein Strang bildet mit dem Argonaute protein (Ago) einen Komplex, welcher dann von der miRNA zum jeweiligen Zieltranskript geführt wird (12). Jedoch wurden inzwischen auch schon andere Wege der Biosynthese von miRNA gefunden.

Mittlerweile wurden mehr als 2500 miRNAs beim Menschen identifiziert. Im Internet existiert bereits eine miRNA Datenbank, die miRBase ([www.miRBase.org](http://www.miRBase.org)) (13, 14). Derzeit wird davon ausgegangen, dass mehr als die Hälfte der Protein-codierenden Gene des Menschen über die 3'-UTR Bindung von miRNAs beeinflusst werden. (15) Aufgrund jüngster Forschung wissen wir, dass miRNAs je nach Gewebe als Tumorsuppressor oder Onkogen wirken können. (16)

### **1.3.1 Die Micro-RNA 451**

Für die Biosynthese der miRNA-451 wird die Dicer RNase nicht benötigt. Die pre-miRNA-451 wird allein durch das katalytische Zentrum des Argonaute-2 Proteins prozessiert (17) (18).

Zunächst wurde die Funktion der miRNA-451 bei der Erythropoese im Zebrafisch, bei der Maus sowie beim Menschen beschrieben (19). Es konnte aber auch ein Einfluss auf die Tumorgenese gezeigt werden. Dabei konnte je nach Tumorart ein Anstieg (20) (19) oder eine Herunter-Regulierung der miRNA-451 während der Tumorgenese gezeigt werden (21) (22). Speziell im Glioblastoma multiforme konnte ein Einfluss der miRNA-451 auf Migration und Proliferation im Sinne einer Tumorsuppression gezeigt werden. (21). Eine Herunter-Regulierung der miRNA-451 korreliert mit einer schlechteren Prognose. Die miRNA-451 ist an der Balance zwischen Proliferation und Migration im Glioblastom beteiligt. Das erreicht sie durch eine direkte Beeinflussung des CAB39 (Calcium-bindendes-Protein 39) welches über die LKB1 (Liver Kinase B1) die AMPK (AMP-aktivierte Proteinkinase) aktiviert. (23)

## **1.4 Tumorsphären**

Um einheitliche Bedingungen für unsere Experimente zu schaffen wurde ein Verfahren verwendet, das ursprünglich aus der embryonalen Stammzellbiologie stammt, die Hanging-drop-Kultur (Siehe 2.2). Dadurch erhalten wir größenstandardisierte Sphären, die alle eine nahezu gleiche Anzahl an Zellen enthalten. Mit dieser Methode kann man embryonale Stammzellen in neuronale Zellen differenzieren (24). Komplexe Vorgänge von Zelladhäsion und parakriner Signaltransduktion erlauben eine Differenzierung und Bildung von Tumoreigenschaften, welche wirklichen Neoplasien angenähert sind. Wir wollen also damit einen neoplastischen Prozess *in-vitro* simulieren. Die Hanging-Drop-Methode wird auch zur standardisierten Testung von Medikamenten *in-vitro* verwendet (25).

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Allgemeines**

Alle Zellkulturversuche wurden an Werkbänken des S3-Labors des Zentrums für medizinische Grundlagenforschung (ZMF) in Graz unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Werkbänke wurden dabei vor Benutzung mit 70% Ethanol desinfiziert und nach Benutzung im geschlossenen Zustand mind. 60min mit UV-Licht bestrahlt.

#### **2.1.1 Die Zelllinie A172**

Bei den beschriebenen Versuchen wird die Zelllinie A172 verwendet. Diese wurde uns von der Cell Culture Facility des ZMF zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um eine Glioblastomzelllinie, welche 1973 aus dem Glioblastom eines männlichen Patienten extrahiert wurde (26).

Die Zellen wurden standardmäßig bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> als Monolayer kultiviert. Als Medium wurde Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10% Rinderserum und 1% Nicht-essentiellen-Aminosäuren (NEAA), verwendet. Zur Vorbeugung bakterieller Kontamination der Kulturen wurde das Medium zusätzlich mit 1% Penizillin und Streptomycin (P/S-Lösung) versetzt. Im folgenden Teil wird diese Zusammensetzung als Vollmedium bezeichnet, auf Abweichungen und Zusätze wird entsprechend hingewiesen.

### **2.1.2 Splitting der Zellen**

Bedingt durch das schnelle Wachstum der A172-Zellen war es nötig die Zellzahl durch Zellsplitting ca. alle 3 Tage zu reduzieren.

Nach Absaugen des alten Mediums wird die Kulturflasche 1x mit ca.10-15ml PBS (Phosphate Buffered Saline) gewaschen. Anschließend wird 1ml Accutase™ bei einer 75cm<sup>2</sup> (=12ml Medium) und 2ml bei einem 175cm<sup>2</sup> (=24ml Medium) Kulturflasche zugegeben und für 5min bei 37°C kultiviert. Die Zellen lösen sich so vom Boden ab und liegen in der Accutase™ gelöst vor. Durch Zugabe von 5ml Vollmedium wird aufgrund des Serums die Aktivität des Enzyms gestoppt. Nach durchmischen der Zellsuspension mit der Pipette wird je nach Bedarf, ein Teil davon in einen oder mehreren Kulturflaschen und/oder Wells aufgeteilt. Überflüssige Zellsuspension wird verworfen. Die Kulturflaschen werden dann mit frischem Medium bis zum erforderlichen Volumen aufgefüllt und in den Inkubator rücküberführt.

### **2.1.3 Pelletieren von Zellen und Sphären für PCR**

Die Zellen oder Sphären werden von der Oberfläche der Kulturflasche oder Platte mittels Accutase™ abgelöst. Nach Auflösung in ca. 5ml Nährmedium wird die Suspension in ein 15ml Falcon-Röhrchen überführt und anschließend für 5min mit 1000rpm zentrifugiert. Das Medium wird abgesaugt. Dann wird etwa 1-1,5ml Medium zugesetzt und die Suspension in ein beschriftetes 1,5ml Tube überführt. Dieses wird bei 13.000rpm 5min lang zentrifugiert. Das Medium wird anschließend möglichst vollständig abgesaugt und das entstandene Zellpellet mitsamt Tube in Flüssigstickstoff übertragen. Anschließend erfolgt die Lagerung bis zur weiteren Verwendung im -80°C Gefrierschrank.

### **2.1.4 Zellzahlbestimmung**

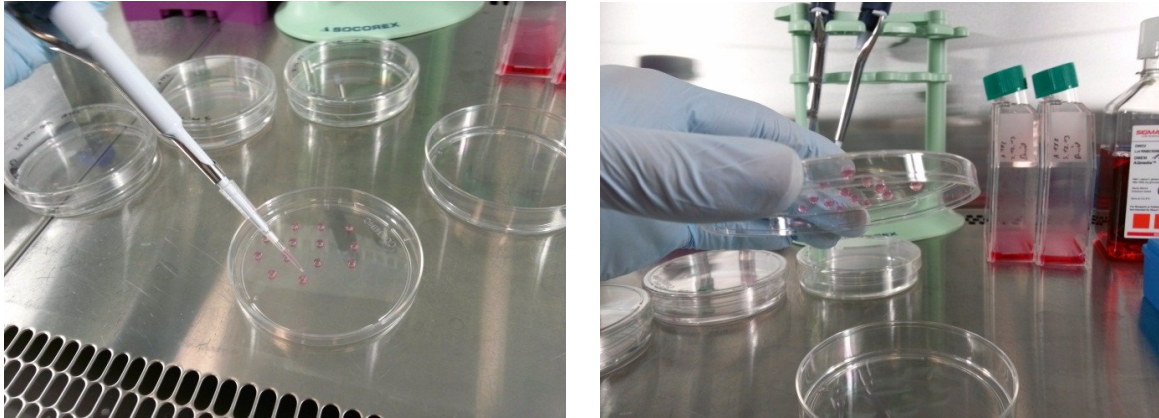
Die Zellzahl einer Suspension wurde in allen Versuchen mit dem CASY®-Cell-Counter bestimmt.

Dabei werden die Zellen wie oben beim Splitting beschrieben abgelöst und in Suspension gebracht. Nach der Zugabe des Mediums werden die Zellen dann aber nicht in eine neue Zellkulturflasche sondern in einen 15ml Falcon überführt. In diesem verbleiben sie bis ihre Zellzahl ermittelt wurde. Aus der Suspension werden nun 50µl entnommen, wobei darauf geachtet wurde, dass die Suspension zur Zeit der Entnahme gut vermischt war. Diese 50µl werden dann in dem

Messgefäß, dem CASYcup, mit 10ml isotonischen Messpuffer (CASYton) vermischt. Es ergibt sich so ein Verdünnungsfaktor von 1:200, was bei den Einstellungen des Messgeräts berücksichtigt wurde. Für die Zell Art wurde das Setup für die U87mg Zelllinie, ebenfalls eine Glioblastom-Zelllinie, verwendet. Vor Verwendung des Gerätes wurde immer eine Spülung des Systems mit Messpuffer durchgeführt. Nach dreimaliger Messung erfolgt die automatische Mittelung der totalen Zellzahl und der Anzahl vitaler Zellen in ml, sowie der Vitalität in %. Zur weiteren Berechnung wird das Ergebnis der vitalen Zellzahl herangezogen. Der Inhalt des Messgefäßes wird nach der Messung in eine dafür vorgesehene Flasche entsorgt. Das Messgefäß selbst wird getrennt entsorgt. Das Messsystem wird nach Benutzung 3-mal mit Messpuffer gespült. Nach erfolgter Messung kann dann mit den gewonnenen Werten die gewünschte Zellzahl pro Volumen berechnet werden. Vor weiteren Maßnahmen wird jedoch die vermessene Zellsuspension im Falcon nochmals gut durchmischt und ein eventuell während der Zeit des Vermessens gebildetes Zellpellet wird gelöst.

## **2.2 Das Hanging-Drop Verfahren**

Die Hanging Drop Kultur wird eingesetzt um Zellen zu einer Sphäre zu verdichten. Dabei wird eine Zellsuspension (Zellen und Nährmedium) als Tropfen auf den Deckel einer Petrischale gegeben und anschließend gedreht. (Abb. 2-1) Der Boden der Petrischale ist mit PBS gefüllt um eine Austrocknung der Kultur zu verhindern. Alternativ können spezielle Hanging-Drop-Kulturplatten verwendet werden z.B. Perfecta3D<sup>®</sup> 96-Well Hanging Drop Plates. Durch die Schwerkraft sammeln sich die Zellen am Boden des Tropfens. Da es keine Möglichkeit einer Anhaftung gibt, verbinden sich die Zellen untereinander und formen auf diese Weise eine Sphäre. Die so entstehenden sphärischen Zellgebilde können dann weiter kultiviert werden. Natürlich ist dieses Verfahren nicht für jede Zelle bzw. jedes Folgeexperiment gleich geeignet. Deshalb muss die am besten geeignete Zellzahl, welche die Größe der Sphäre determiniert, und das geeignetste Volumen des Tropfens individuell ermittelt werden.



**Abbildung 2-1** Gezeigt wird die Herstellung einer Hanging Drop Kultur. Links sieht man die Auftragung der Zellsuspension als Tropfen auf den Deckel der Petrischale. Rechts ist der Deckel bereits gedreht, die Tropfen hängen am Deckel. Darunter ist der mit PBS gefüllte Boden der Petrischale zu sehen.

### 2.2.1 Etablierung der Maße

Das Erreichen einer ausreichenden Zelldichte von über 90%, bei als Monolayer kultivierten A172 Zellen, ist für das Verfahren wünschenswert. Die Zellzahl wird wie oben beschrieben mittels CASY<sup>®</sup>-Cell-Counter bestimmt. Nach Bestimmung der Zellzahl pro ml wird auf Zellen pro  $\mu\text{l}$  umgerechnet und entsprechend Zellzahl pro benötigtes Volumen verdünnt.

Anschließend werden nach dem Hanging Drop Verfahren verschiedene Größen erprobt. Dabei wird das Volumen in Relation zur Zellzahl konstant gehalten um während der Kultivierung eine vergleichbare Ernährung der Kulturen zu gewährleisten. Wir verwendeten:

- 10000 Zellen in 10 $\mu\text{l}$  Medium/Tropfen
- 25000 Zellen in 25 $\mu\text{l}$  Medium/Tropfen
- 50000 Zellen in 50 $\mu\text{l}$  Medium/Tropfen

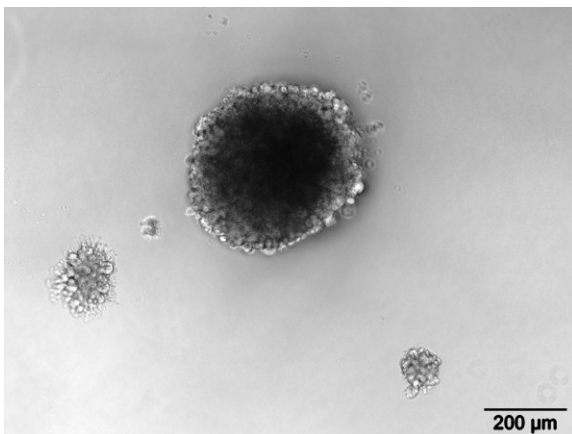
Zusätzlich wurden 5000 Zellen in 20 $\mu\text{l}$  Medium/Tropfen kultiviert um festzustellen ob sich bei einer solch geringen Zellzahl überhaupt noch eine Sphäre bildet. Da 5 $\mu\text{l}$  als Volumen eines Tropfens die Bildung der Sphären aufgrund der in Relation zu starken Adhäsionskraft des Tropfens an die Petrischale nicht gewährleistet, wurde die Zellsuspension auf 20 $\mu\text{l}$  verdünnt.

Nach der oben beschriebenen üblichen 3 Tage Inkubation in der Hanging-Drop Kultur wurden die Sphären in 6-Well kultiviert und in ihrem Wachstum beobachtet. Aufgrund der Absicht diese später mit der organotypischen Kultur zu kombinieren, wurden Sphären jeder Zellzahl sowohl in Vollmedium als auch in

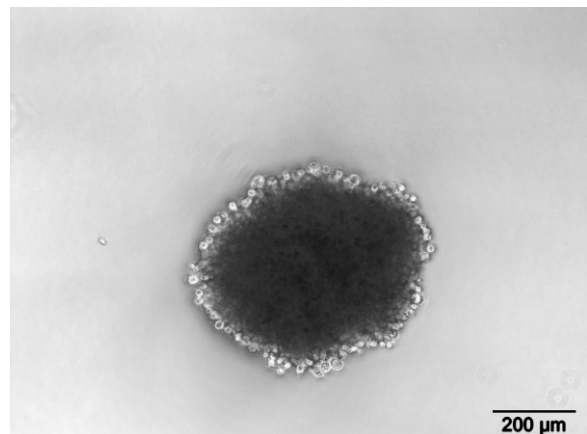
OTC-Medium kultiviert. Dadurch konnte eine mögliche, durch das Medium bedingte, Vitalitätsverschlechterung der Sphären ausgeschlossen werden.

Die 50µl Tropfen mit 50000 Zellen erwiesen sich als zu groß (Abb. 2-2). Dieser hielt nicht sicher an dem Deckel der Petrischale, was das Handling mit der ohnehin empfindlichen Hanging-drop Kultur zusätzlich erschwerte. Die 5000 Zellen in 20µl Medium/Tropfen schienen dagegen in adhärenter Kultur weniger dicht. (Abb. 2-3) Da aber in adhärenter Kultur viele Zellen migrieren und die Sphäre ohnehin kleiner wird, bestand die Gefahr dass sich die Sphäre ganz auflöst. Neben der Größenabnahme ist hier auch eine Abnahme der sphärischen Struktur zu erkennen. Die Sphäre selbst ist nur noch schlecht darstellbar. (Abb. 2-3). Die 25000 Zellen in 25µl/drop zeigten eine unregelmäßige Oberfläche. Auch hier erkennt man eine Größen Abnahme, die Sphäre ist aber nach wie vor gut abgrenzbar. (Abb. 2-2). Man entschied sich vorerst für die 10000 Zellen als ideale Größe.

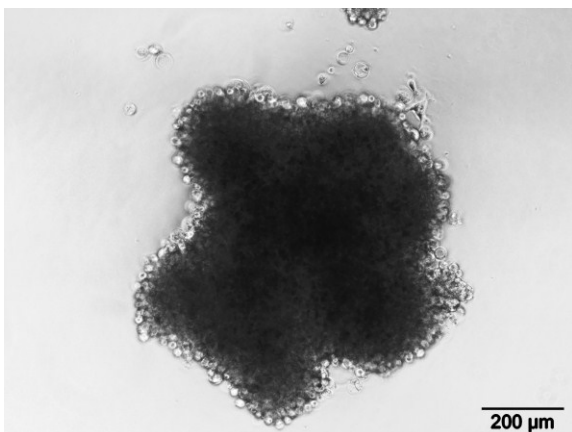
a)



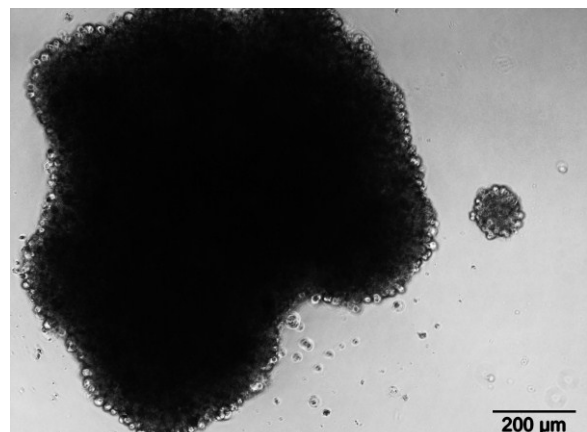
b)



c)



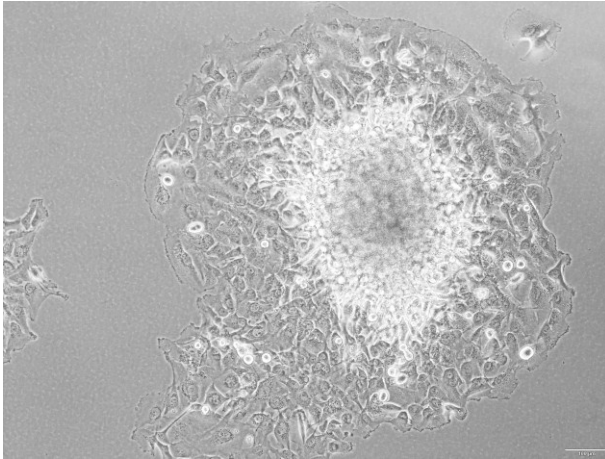
d)



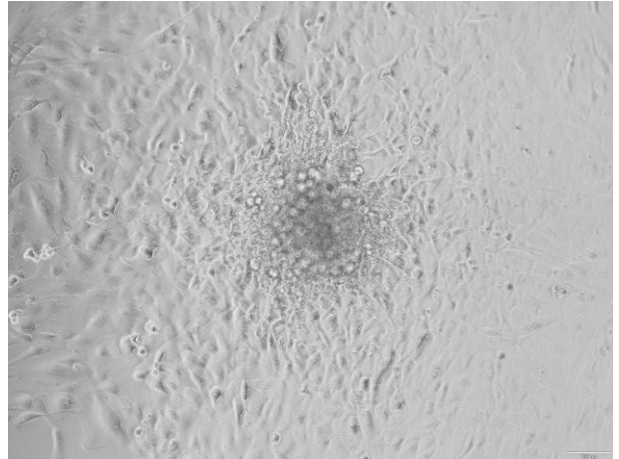
**Abbildung 2-2 Vergleich der Sphärengrößen zur Etablierung einer geeigneten Größe:** Zu sehen sind Sphären aus A172 Zellen, fotografiert in Hanging-Drop Kultur (frei schwimmend). Alle Bilder wurden in 10x

Vergrößerung am 3.Tag in Kultur mit dem Lichtmikroskop aufgenommen. In **a)** befindet sich eine Sphäre aus 5000 Zellen, welche in Hanging-Drop Kultur noch einen soliden, kompakten Eindruck macht. **b)** zeigt eine HD-Sphäre aus 10000 Zellen. In **c)** erkennt man eine Sphäre aus 25000 Zellen. Diese erscheint solide aber weniger rund. Die Sphären aus 50000 Zellen **d)** sind vor allem für den Einsatz im *in vitro*-Modell viel zu groß. Auch diese zeigen eine unregelmäßig geformte Oberfläche.

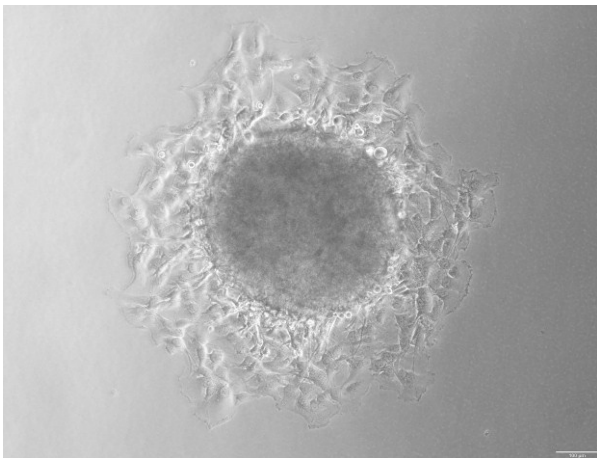
a)



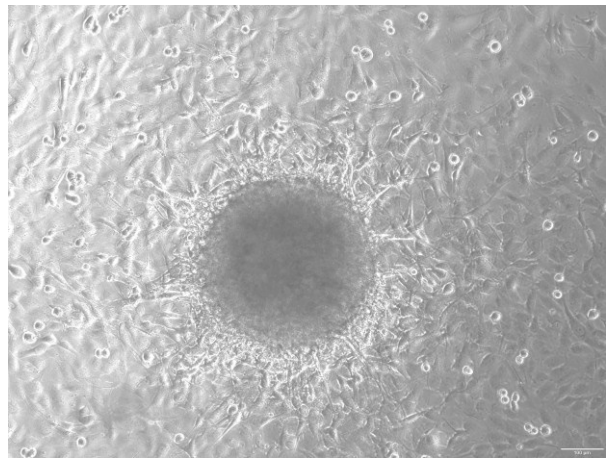
b)



c)



d)



**Abbildung 2-3 Vergleich von einer Sphäre aus 5000 Zellen mit einer Sphäre aus 10000 Zellen im**

**Verlauf:** Zu sehen sind Sphären aus A172 Zellen in adhärenter Kultur. Alle Bilder wurden in 10x Vergrößerung mit dem Lichtmikroskop aufgenommen. In **a)** sieht man eine Sphäre 1 Tag in adhärenter Kultur. **b)** zeigt dieselbe Sphäre nach 3 Tagen in Kultur. In **c)** sieht man eine Sphäre mit 10000 Zellen 1 Tag in adhärenter Kultur. Wie oben sieht man in **d)** dieselbe Sphäre am 3.Tag in Kultur.

### 2.2.2 Einfrieren von Hanging-Drop-Spheres

Um logistischen Schwierigkeiten vorzubeugen war es nötig die aus dem Hanging Drop hergestellten Tumorsphären einfrieren zu können um sie bei Bedarf jederzeit zur Verfügung zu haben.

### **2.2.2.1 Etablierung eines Einfrierprotokolls**

Zunächst musste ein Protokoll gefunden werden welches ein sicheres Einfrieren der Tumorsphären gewährleistet. Das Vorgehen nach einem standardisierten Protokoll für Neurosphären (27) schien erfolversprechend.

Zuerst wurden Hanging-drop-Sphären wie oben beschrieben hergestellt. Dabei war jede Sphäre standardmäßig 3 Tage lang in der Hanging drop Kultur. Dann wurden die Zellen zu einem Pellet herunterzentrifugiert und in 0,8ml Nährmedium gelöst. Anschließend wurde jeweils 0,8ml Einfriermedium zugegeben. Einfriermedium besteht aus dem normalen Nährmedium DMEM 10% (Vollmedium, Siehe Anhang) und 20% Dimethylsulfoxid (DMSO), welches Wasserkristallbildung innerhalb der Zellen verhindert. Dieser Schritt stellt eine Modifikation dar, da die Zellen nach Protokoll direkt in 10% Einfriermedium gelöst werden. Durch die 1:1 Verdünnung mit Vollmedium liegt aber auch hier eine 10%ige DMSO Konzentration vor. Ab jetzt muss zügig gearbeitet werden da DMSO toxisch und mutagen wirkt (28). Die Suspension wird nun in ein spezielles Kryotube-Röhrchen überführt. Anschließend wurde dieser in ein Einfriergefäß gebracht welches mit Isopropanol befüllt ist um ein langsames Einfrieren zu gewährleisten. Diese wurde dann in einen -80°C Gefrierschrank gestellt und über Nacht dort behalten. Am nächsten Tag wurde der Tube dann unmittelbar nach Entnahme aus dem Schrank in verflüssigten Stickstoff (-180°C) überführt.

#### **2.2.2.1.1 Modifizierungen des Protokolls**

Um festzustellen welchen Einfluss das langsame Einfrieren auf die Vitalität der Sphären hat, wurde bei einem Experiment auch ein Teil direkt in -80°C überführt, während ein anderer Teil durch Isopropanol langsam heruntergekühlt wurde. Dabei handelte es sich um jeweils ein Eppendorf-Tube mit jeweils 36 Sphären. Nach Auftauen konnte allerdings kein Unterschied der Vitalität beobachtet werden.

#### **2.2.2.2 Vergleich von aufgetauten und frischen Tumorsphären**

Das Ziel dieses Experiments war es herauszufinden, ob es einen Unterschied zwischen den frischen Sphären und den aufgetauten Sphären gibt und zwar in Bezug auf Morphologie, Überleben und Größe. Außerdem konnte man anhand des Wachstums der Kultur eine Auskunft über Migration und Proliferation erhalten.

Gewählt wurden zwei verschiedene Größen um außerdem zu untersuchen ob ein größerer Durchmesser der Sphären Probleme bei Einfrieren und Auftauen verursacht, z.B. aufgrund der erhöhten Diffusionsstrecke.

Nach einer ausreichend vorhandenen Zelldichte von etwa 90% in der Kulturflasche wurden die Zellen wie oben beschrieben mittels Accutase™ abgelöst, in Suspension gebracht und anschließend mittels CASY® gezählt. Danach wurde berechnet, wie viel Volumen Medium nötig ist um 10000 Zellen pro Tropfen zu erhalten. Die Suspension wurde dann so verdünnt, dass in 10µl Medium 10000 Zellen enthalten sind. Zusätzlich wurde als zweites eine größere Zellanzahl (25000 Zellen) gewählt, welche folglich in 25µl Medium gelöst ist. Das Volumen ist somit bezogen auf die Zellzahl konstant. Es wurden dann Hanging Drops wie oben beschrieben hergestellt. Folgende Konditionen wurden verwendet:

- 2x Petrischalen mit jeweils 18 Sphären mit 10000 cells/Drop
- 2x Petrischalen mit jeweils 18 Sphären mit 25000 cells/Drop

Also 36 Sphären pro Größenkondition, 72 Sphären insgesamt. Nach 3 Tagen in Hanging Drop Kultur wurden die hergestellten Sphären nach Protokoll eingefroren und über Nacht im -80°C Gefrierschrank behalten. Am nächsten Morgen wurden sie in Flüssigstickstoff (-180°C) überführt und dort gelagert.

Nun wurden erneut 72 Sphären mit den gleichen Konditionen (36x 10000cells/drop; 36x25000cells/drop) hergestellt.

Nach 3 Tagen in Hanging drop Kultur waren diese für den Versuch bereit. Des Weiteren wurden deshalb auch die eingefrorenen Sphären aufgetaut.

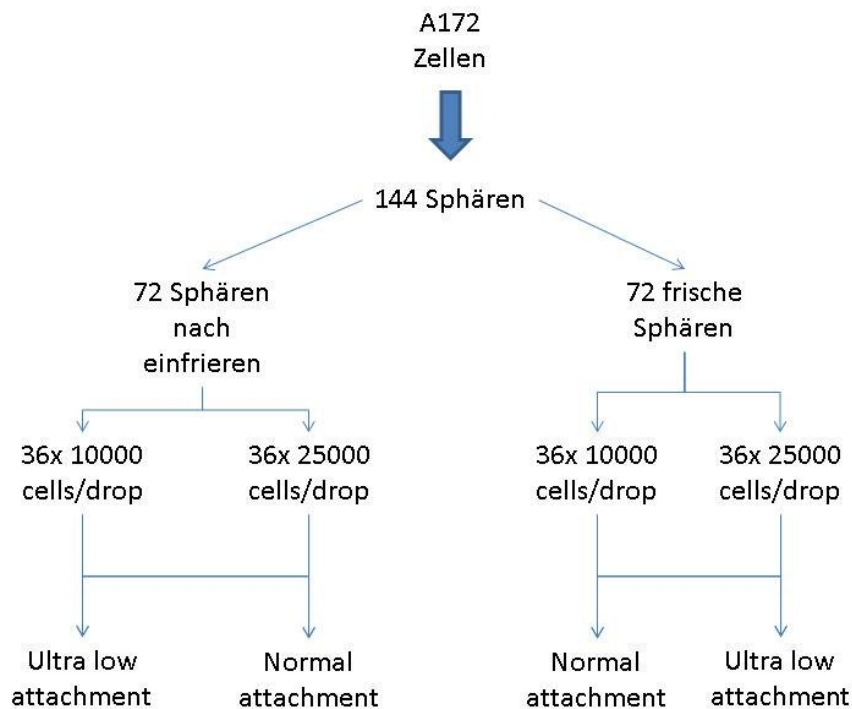
Dazu wurde der Kryotube mit den Sphären in ein Warmwasserbad gestellt. Unmittelbar nach Verflüssigung der Suspension wurde das Einfriermedium abgesaugt und frisches, vorgewärmtes Nährmedium zugeführt. Nach Absinken der Sphären auf den Boden des Tubes wurde auch dieses Medium nochmals abgesaugt und wieder frisches Nährmedium zugegeben.

Auf Zentrifugation der Tubes wurde bewusst verzichtet, da die Sphären nach circa 1min durch ihr Eigengewicht ohnehin auf den Boden absinken. Außerdem wollte man einen möglichen Einfluss der Zentrifugation auf die Integrität der sphärischen Konformation vermeiden. Während des gesamten Versuchs war es wichtig die genaue Anzahl der Sphären zu kennen um Verluste aufgrund der Methodik auszuschließen, z.B. versehentliches Absaugen einer Sphäre beim Auftauen.

Es lagen nun 72 frische und 72 aufgetaute Sphären vor, jeweils mit den zwei Größenkonditionen. Verwendet wurden normale Zellkulturgefäße (48 Well-Platte) und speziell beschichtete Gefäße die es den Zellen nicht erlauben sich am Boden anzuheften (Ultra-low-attachment Platte). Sie wurden nun wie folgt in Kultur gebracht:

- 18 frische und 18 aufgetaute Sphären 10000cells/drop einzeln kultiviert in Ultra low attachment well (48-Well Platte)
- 18 frische und 18 aufgetaute Sphären 25000cells/drop einzeln kultiviert in Ultra low attachment well (48-Well Platte)
- 18 frische und 18 aufgetaute Sphären 10000cells/drop einzeln kultiviert in adhärenter Kultur (48-Well Platte)
- 18 frische und 18 aufgetaute Sphären 25000cells/drop einzeln kultiviert in adhärenter Kultur (48-Well Platte)

Aufgrund der geringen Größe der Sphären verlor man bedingt durch die Überführungen jeweils eine Sphäre der frischen 10000cell/drop und eine der frischen 25000cells/per drop. Die Sphären wurden dann eine Woche in Kultur behalten, jeden Tag beobachtet und an Tag 1, 4 und 7 fotografiert. Die Bilder wurden außerdem in Bezug auf Sphärenumfang mithilfe der IMARIS-Software ausgewertet



**Abbildung 2-4 Aufbau des Versuchs zum Vergleich von aufgetauten und frischen Tumorsphären:** Von 72 Sphären einer Kondition (frisch/eingefroren) bestehen jeweils 36 aus 10.000 Zellen und 36 aus 25.000 Zellen. Diese 36 Sphären werden wiederum aufgeteilt. Jeweils 18 Sphären werden in normal attachment und 18 Sphären in ultra-low-attachment überführt.

## 2.3 Die organotypische Kultur (OTC)

Im Folgenden wird die Präparation und Kultivierung der organotypischen Kultur nach Gähwiler beschrieben (29, 30)

### 2.3.1.1 Präparation der Kulturen

Verwendet wurden neugeborene (0 – max. 1Tag) gesunde Ratten. Die Anästhesie erfolgt durch Verweilen des Tieres von 2-3 Minuten in Eis. Die Tötung erfolgte durch Dekapitation auf Höhe der Halswirbelsäule mit der stumpfen Schere, unmittelbar nach Entnahme des Tieres aus dem Eis. Der Schädel wurde anschließend vom Foramen Magnum aus mit einer feinen Schere nach rostral hin eröffnet. Nach Umklappen der Schädelkalotte mittels Pinzette, wurden die Hemisphären freigelegt. Nach Durchtrennung des Corpus Callosum konnten die Hemisphären dann mittels Spatel aus dem Schädel herausgelöst werden. Nach

Entnahme wurden sie dann umgehend, mit der corticalen Seite nach unten, in eine Petrischale mit eiskalter physiologischer Salzlösung (BSS) mit Glucose überführt. Nach Entfernung der Hirnhäute mittels einer dünnen Pinzette wurden dann Cortexschnitte hergestellt. Dazu wurde das Präparat auf die Teflonscheibe des Choppers gelegt und in 300µm dicke Schnitte zerteilt. Der Chopper zerteilt Präparate in vorher eingestellte Schichtdicken. Die Schichtdicke muss dabei so gewählt werden, dass das Gewebe genug lebende Zellen enthält, darf aber nicht zu dünn geschnitten werden um eine Ernährung mittels Diffusion der innen liegenden Zellen zu ermöglichen. Nach Rückführung der Schnitte in eine Petrischale mit BSS wurden diese für höchstens 1 Stunde bei 4°C gelagert.

### **2.3.1.2 Kultivierung**

Die präparierten Hirnschnitte wurden nun auf ein autoklaviertes Deckglas gelegt. Damit das Gewebe am Glas haftet wurde 10µl Thrombin und 10µl Plasma (Huhn) hinzugegeben und vorsichtig verrührt. Abhängig vom jeweiligen Hersteller koagulierte dieses Gemisch dann nach ca. 20-30min. Die Deckgläser mit den Schnitten wurden in dieser Zeit unter der sterilen Werkbank in zugedeckten Petrischalen gelagert. Es ist wichtig, dass diese Prozedur nicht zu viel Zeit in Anspruch nimmt und das Gewebe nach max. 45min Nährmedium erhält, da die Gefahr der Austrocknung besteht und der Hirnschnitt in dieser Zeit auch nicht von Nährmedium bedeckt ist. Andererseits muss darauf geachtet werden, dass das Plasma-Thrombin Gemisch vor Einbringen in die Kulturgefäße hart genug ist um das Gewebe am Deckglas zu halten.

Die Deckgläser mit den Hirnschnitten wurden dann in ein spezielles Kulturgefäß übertragen (Rollertubes) und es wurde 750µl OTC-Medium (Siehe Anhang) zugesetzt.

### **2.3.1.3 Bedingungen unter Kultur**

Das Gewebe wurde in einem Rollinkubator bei 37°C ohne CO<sub>2</sub> Zugabe inkubiert. Die Rollertubes werden dort in eine Trommel gesteckt, welche sich mit ca. 15

Umdrehungen pro Stunde dreht. Dadurch kommt die Kultur ausreichend sowohl mit Sauerstoff als auch mit dem Nährmedium in Berührung um zu überleben.

Das Medium der organotypischen Kulturen wurde 2-mal in der Woche gewechselt um gute Kulturbedingungen zu gewährleisten. An diesen Tagen wurden die Kulturen außerdem makroskopisch und mikroskopisch betrachtet, um eine mögliche Kontamination auszuschließen und um sterbende bzw. abgestorbene Kulturen auszusortieren.

## **2.4 In Vitro-Tumormodell**

Zunächst sollte beobachtet werden wie sich eine Hanging-Drop-Sphäre in Gegenwart von Hirngewebe verhält. Die Etablierung dieses Modells, der Verbindung zwischen organotypischer Kultur und Sphäre, war überaus wichtig für spätere Versuche. Mehrere Methoden wurden ausprobiert und erwiesen sich als unterschiedlich effizient und aufwendig.

### **2.4.1 DIO Färbung von Tumorsphären mit vorkultivierten OTCs**

Zunächst wurde versucht eine Tumorsphäre auf eine bereits präparierte OTC aufzusetzen. Zur Färbung wurde der Carbozyanidfarbstoff 3,3'-Diocetadecyloxacarbozianin Perchlorat (DIO) verwendet. DIO hat sein Absorptionsmaximum bei 489nm und seine Emissionsmaximum bei 499nm und ergibt damit eine helle grüne Fluoreszenz. Man kann dabei denselben Fluoreszenzfilter verwenden den man auch bei FITC markierten Zellen verwendet. (31)

Es wurden wie oben beschrieben ca. 20 (1 Petrischale) Tumorsphären aus A172 Zellen mithilfe des Hanging-Drop Verfahrens hergestellt. Diese wurden wie immer 3 Tage kultiviert, dann mit 1ml Medium vom Deckel der Petrischale abgewaschen. Anschließend wurden alle Sphären in eine Petrischale überführt. In die Petrischale wurde 2ml Nährmedium und 10µl DIO zugegeben und anschließend für 10min gewartet. Die organotypischen Kulturen wurden aus dem Inkubator entnommen. Unter der sterilen Werkbank wurden nun 4 Deckgläser mit OTCs aus den Rollertubes entnommen und in eine Petrischale gelegt. Mit einer 200µl Pipette (auf 50µl eingestellt) wurden nun einzelne Tumorsphären aufgenommen und jeweils eine pro OTC aufgesetzt. Das größte Problem war nun die OTCs am Leben zu erhalten, aber gleichzeitig so wenig Medium wie möglich einzusetzen um eine

Dislokation der Sphären zu vermeiden. Die Petrischale wurde verschlossen und es wurde zunächst 10min gewartet. Dann wurde eine geringe Menge Medium (50µl) auf jede OTC gegeben. Zusätzlich wurde auch neben die OTCs Medium zugegeben um eine feuchte Umgebung zu erreichen und eine Austrocknung zu verhindern. Anschließend wurde 1 Stunde gewartet um den Sphären Zeit zu geben an die OTC anzuwachsen. Nach dieser Zeit wurden die Deckgläser mit den OTCs unter großer Vorsicht wieder in Rollertubes gegeben die bereits mit 750µl frischem OTC-Medium befüllt waren. Diese wurden dann über Nacht im Roller-Inkubator belassen. Am nächsten Tag begann dann die Fotodokumentation mittels Fluoreszenzmikroskop.

#### **2.4.2 DIO Färbung von Tumorsphären mit frischen OTCs**

Für diesen Versuch war das Zeitmanagement entscheidend, da die organotypischen Kulturen frisch hergestellt werden mussten und die Verbindung mit der Sphäre noch vor Fixierung der OTC an das Glas erfolgen musste.

Als erstes musste ein Zeitpunkt gefunden werden an dem die Präparation von frischen OTCs erfolgen würde. Dies war selbstverständlich abhängig von der Verfügbarkeit von Versuchstieren. 3 Tage vor dem festgelegten Termin wurden, wie schon im ersten Versuch, die Sphären mittels Hanging-Drop Kultur hergestellt. Es wurde nun zeitgleich gearbeitet um die Tumorsphäre zusammen mit der OTC mittels Plasma und Thrombin am Deckglas zu fixieren. Dazu wurden die fertigen Tumorsphären wie oben in eine Petrischale mit 2ml Medium und 10µl DIO überführt und 10 min inkubiert. Dann erfolgte der Transport zu den Räumlichkeiten des biomedizinischen Instituts Graz.

Wie in 2.3.1.2 beschrieben wurden Hirngewebeschnitte (als OTC) hergestellt. Nach Zugabe und Mischen von Plasma und Thrombin musste jetzt aber noch vor der Koagulation die Tumorsphäre aufgesetzt werden, um sie so an der OTC zu fixieren. Dies wurde mit Hilfe einer 200µl Pipette erreicht. Außerdem wurde ein Stereomikroskop als optisches Hilfsmittel eingesetzt. Nach Aufsetzen der Sphären wurden die OTCs vorsichtig in eine Petrischale gesetzt. Nach ca. 30-45min wurde die erfolgreiche Positionierung unter einem Lichtmikroskop kontrolliert. Wie beim ersten Versuch wurden die Kulturen zunächst wieder in den

Inkubator verbracht. Am darauffolgenden Tag wurde dann mit der Fotodokumentation begonnen.

## **2.5 Etablierung eines Systems zur Einbringung der miRNA- 451 in Zielgewebe.**

Es war wichtig eine Methode zu etablieren mit der sich die miRNA-451 in die Glioblastomzellen einbringen lässt. Dabei wurden zwei verschiedene Methoden untersucht.

Die erste Möglichkeit ist die Einbringung eines Tet-on/Tet-off Systems. Dabei handelt es sich um ein mit einem Tetracyclin-aktivierbaren Operator gekoppelten Plasmid mit der miRNA-451 Sequenz, welches mithilfe eines lentiviralen Vektors in die Zielzelle eingeschleust wird. Die Zelle würde hier selbst die miRNA produzieren sobald sie mit Tetracyclin aktiviert würde.

Die zweite Möglichkeit ist die Einbringung der miRNA-451 über ein Lipofectin. Dabei wird das miRNA-451 Mimic in Liposomen verpackt die dann über die Zellmembran der Zielzelle aufgenommen werden.

### **2.5.1 Das Tet-on/Tet-off System**

#### **2.5.1.1 Beschreibung**

Das Tet-System ist die eine Möglichkeit die miRNA-451 in die Zielzellen einzubringen.

Es besteht im Wesentlichen aus 3 Komponenten: dem Transkriptions-Modulator, dem Tet-sensitivem Promotor und einem Tetracyclin als Aktivator, in diesem Fall dem Doxycyclin. Unterschieden wird außerdem ob es sich um ein Tet-on oder ein Tet-off System handelt. Dabei besteht der Unterschied ob durch das Tetracyclin die Transkription durch den Modulator aktiviert (Tet-on) oder inhibiert wird (Tet-off) (32). Das verwendete Plasmid enthielt außerdem ein Resistenzgen für das Antibiotikum Puromycin, um so erfolgreich transfizierte Zellen mithilfe von Puromycin zu selektieren.

Zur Darstellung der Genaktivierung bedient man sich bei diesem System des GFP (green fluorescent protein). Bei Aktivierung des Tet-sensitiven Promotors wird auch das GFP Gen abgelesen, welches unmittelbar vor dem eingebrachtem

Zielgen liegt. Das so produzierte Genprodukt ist das GFP, dessen Fluoreszenz die Transkription des Gens bestätigt (33) (34).

### **2.5.1.2 Transduktion der Zellen**

Die Transduktion erfolgte mit Lentiviralen Vektoren. Der Tet451 Vektor enthält das funktionierende Gen zur Amplifikation der miRNA-451. Der TetC Vektor enthält kein Gen für die miRNA-451, reagiert bei Einbau ins Genom jedoch auch mit einer Fluoreszenz, sofern das Medium mit Tetracyclin versetzt ist. Demnach fungierte dieser als Transduktionskontrolle.

Die im Folgenden beschriebenen Mengenangaben beziehen sich auf eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche.

Für die Transduktion wurde in einem 15ml Falcon-Tube zunächst 50µl Polybren (300ng) mit 4,5ml Vollmedium gemischt. Das Polybren, ein kationisches Polymer, neutralisiert die negative Ladung der Oberfläche des Virus und der Zielzelle und erhöht somit die Effizienz der Transduktion (35). Anschließend wurde das alte Nährmedium abgesaugt und das Medium mit dem Polybren zugesetzt. Der Vektor (2ml), jeweils einmal TetC und einmal Tet451 wurde dem Medium beigefügt und anschließend wurden die Zellen bei 37°C inkubiert.

Diese Prozedur wurde an den zwei aufeinanderfolgenden Tagen nochmals wiederholt um einen hohen Transduktionserfolg zu gewährleisten. Des Weiteren wurde das Medium mit 1,5µg/ml Puromycin versetzt. Puromycin ist sowohl für prokaryotische als auch für eukaryotische Zellen ein Peptidyl-Transferase Hemmer (36). Wie oben erwähnt erhalten erfolgreich transduzierte Zellen auch das Puromycin-Resistenzgen, wodurch es möglich wird durch die Zugabe von Puromycin eine Selektion der transduzierten Zellen zu erreichen.

### **2.5.1.3 Induktion der Zellen**

Nach erfolgter Transfektion wurde den Zellen 20µg/ml (nach Herstellerangaben) Doxycyclin, ein Tetracyclin-Antibiotikum, zugegeben. Dies aktiviert die Transkription über den Modulator (Tet-on-System) (32). Am 2. Tag nach der Induktion konnte Fluoreszenz beobachtet werden. Deutlich war die Fluoreszenz dann am 3. Tag.

## **2.5.1.4 Optimierung der Transduktionseffizienz**

### **2.5.1.4.1 Konzentration von Puromycin**

Um die Effizienz der Selektion durch Puromycin zu testen wurde es in einem Versuch mit einer höheren Konzentration verwendet. Dazu wurde jeweils eine 75cm<sup>2</sup> Kulturflasche mit TetC und Tet451 mit 1,5µg/ml Puromycin und jeweils eine TetC und Tet451 mit 3,0mg/ml versetzt. Zusätzlich wurde als Kontrolle auch eine Kulturflasche mit nicht-transduzierten Zellen ebenfalls mit 1,5µg/ml Puromycin versetzt. Dies sollte ausschließen, dass das Puromycin nicht bereits unwirksam ist z.B. aufgrund von Degeneration unter falscher Lagerung o.ä.

Durchgeführt wurde dies vor allem um herauszufinden ob die Puromycin Konzentration für die ungenügende Transduktionseffizienz verantwortlich ist.

Es zeigte sich aber kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der fluoreszierenden Zellen. Erwartungsgemäß starben alle Zellen der Kontrolle bereits bei der Konzentration von 1,5µg/ml.

### **2.5.1.4.2 Selektion durch Fluorescence-activated-cell-sorting (FACS)**

Für die Bildung von Hanging-drop-Sphären aus transduzierten A172 Zellen wurde ein möglichst hoher Anteil transduzierter Zellen benötigt. Auch um die Aussagekraft einer PCR zu erhöhen müssen möglichst viele Zellen transduziert sein. Da die Selektion durch Puromycin nach wie vor ungenügend war, wurde ein anderer Weg gewählt.

Jeweils eine 75cm<sup>2</sup> Kulturflasche von TetC und Tet451 transduzierten A172 Zellen wurde wie oben beschrieben mit 20µg Doxycyclin induziert und mit 1,5µg/ml Puromycin versetzt. Am 2. Tag nach der Induktion wurde das Nährmedium gewechselt und wieder 20µg/ml Doxycyclin und 1,5µg/ml Puromycin hinzugegeben. Am 3. Tag nach der Induktion wurden die beiden Kulturflaschen dann der Core Facility Flow Cytometrie überstellt. Mithilfe des FACSAria von BD Biosciences wurden erfolgreich transduzierte, GFP positive Zellen herausselektiert. Diese wurden dann in jeweils einer 6-Well platte überstellt und bis zu einer ausreichenden Zelldichte kultiviert.

### **2.5.1.5 Transduktion von Hanging-Drop-Sphären**

Für die Bildung von Hanging-Drop Sphären wurden bereits die FACS selektierten Zellen herangezogen. Für die Induktion wurden die Sphären einzeln in jeweils ein Well pipettiert. Wie bei den Zellen wurden die Tet 451 und die Tet C Zellen mit 20µg/ml induziert. Nach 2-3 Tagen war dann auch eine deutliche Fluoreszenz zu sehen.

#### **2.5.1.5.1 Präinduktion von Hanging-Drop-Sphären**

Bei den Sphären stellte sich außerdem die Frage ob die Induktion der Sphäre, oder der Zellen sinnvoller ist aus der man die Sphäre bildet. Gleichzeitig galt es auch zu untersuchen ob solch eine Induktion die Sphärenbildung innerhalb der Hanging-Drop-Kultur beeinflusst. Außerdem sollte untersucht werden welcher Einfluss die Anwesenheit von Doxycyclin im Medium auf die Sphärenbildung hat. Aus diesen Überlegungen wurden folgende Konditionen gewählt:

- Sphäre aus 3 Tage lang induzierten Tet 451 bzw. TetC A172 Zellen mit 20µg Doxycyclin im Hanging-Drop-Kultur Medium (= dauerinduziert)
- Sphäre aus 3 Tage lang induzierten Tet 451 bzw. TetC A172 Zellen mit Vollmedium in Hanging-Drop-Kultur (= präinduziert)
- Sphäre aus nicht induzierten Tet 451 bzw. TetC A172 Zellen mit 20µg Doxycyclin im Hanging-Drop-Kultur Medium (= spätinduziert)
- Sphäre aus nicht induzierten Tet 451 bzw. TetC A172 mit Vollmedium in Hanging-Drop-Kultur (= nicht induziert)
- Zusätzlich wurden nicht transduzierte A172 Zellen mit 20µg Doxycyclin in Medium inkubiert.

Wie oben beschrieben verblieb die Zellsuspension auch hier 3 Tage in Hanging-Drop-Kultur und wurde anschließend in Kultur fotografiert. Jedes Bild wurde in Hanging-Drop Kultur mittels des invertierten Durchlichtmikroskops in 10x Vergrößerung aufgenommen.

### **2.5.2 Die Lipofection mit miRNA-451 Mimics**

#### **2.5.2.1 Beschreibung**

Die im Folgenden beschriebenen miRNA Mimics wurden von der Firma Dharmacon bezogen.

Bei miRNA Mimics handelt es sich um doppelsträngige Oligonukleotide, welche die Funktion einer miRNA nachahmen (Mimic). In dieser Studie wurden miRNA-451 Mimics (Mikro-RNA-Sequenz: AAACCGUUACCAUUACUGAGUU) verwendet. Des Weiteren wurde ein Mimic ohne Funktion verwendet (cel-miR-67 von C. Elegans), welches allerdings mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dy547 gekoppelt ist und so als Transfektionskontrolle verwendet wurde. Durch die Fluoreszenz konnte der Erfolg einer Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskop kontrolliert werden.

Um die miRNA Mimics in die Zielzellen bzw. Sphären einzubringen, wurde ein Transporter verwendet. Bei diesem Transporter, dem „X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent“ der Firma Roche, handelt es sich um ein Lipofectin. Dieses Lipofectin besitzt im Allgemeinen eine hohe Effizienz ist jedoch völlig zellunspecific.

Für den Ablauf der Transfektion wurde das Protokoll des Herstellers verwendet. Der Transfection Reagent und das Mimic werden je nach Konzentration auf 50µl mit serumfreien Medium (Vollmedium ohne FBS) aufgefüllt. Anschließend werden beide vorsichtig gemischt. Nach 20 min ist die Lösung dann zur Transfektion bereit. Dabei werden 100µl Lösung pro ml zu Transfizierendes Zellmedium verwendet, unabhängig von der Konzentration.

## **2.5.2.2 Etablierung einer geeigneten Konzentration von Mimic und Lipofectin**

### **2.5.2.2.1 Konzentration bei Zellen**

Es musste festgestellt werden wie hoch die Konzentration des Mimics und des Lipofectins sein musste, um eine effektive Transfektion zu erreichen.

Deshalb wurde die optimale Konzentration von Mimic und Lipofectin in einer Konzentrationsreihe ermittelt. Verwendet wurde ein 24-Well. In 12 der Wells befanden sich A172 Zellen als Monolayer zu ca. 50% dicht gewachsen in 1ml Nährmedium. Anschließend wurde die Konzentration des Lipofectins 1µl, 2,5µl, 10µl pro ml mit jeweils dem Dy547 gekoppeltem Mimic 0,015nM; 0,04nM; 0,15nM und 100nM pro ml getestet. Die Konzentrationen wurden gemäß einer Auflistung von bereits bekannten optimalen Konzentrationen von verschiedenen Zelllinien ausgewählt, welche auf dem Datasheet des Herstellers aufgeführt waren.

Verwendet wurde nur das Dy547 Mimic um einen groben Überblick zu bekommen in welchem Konzentrationsbereich wir uns zu bewegen haben, vor allem in Bezug auf die späteren Versuche mit den Sphären.

Am nächsten Tag wurde dann mit der Fotodokumentation begonnen. Anhand der Intensität der Fluoreszenz wurde die Konzentration für die späteren Versuche ausgewählt.

#### **2.5.2.2 Konzentration bei Sphären**

Basierend auf den erarbeiteten Konzentrationen für die Zellen, wurden auch die Hanging-Drop Sphären ausgetestet. Wie bei den Zellen wurde auch hier anhand des Kontroll-Mimics, welches mit DY547 gekoppelt ist, die Konzentration ermittelt. Da aber Konzentrationen im picomolaren Bereich bereits bei Zellen zu wenig waren, wurden hier für das Mimic 100nM und 10nM pro ml verwendet. Für das Transfektionsreagenz wurde 2,5µl und 1µl pro ml getestet.

#### **2.5.2.3 Aufnahme von Mimic in organotypischen Kulturen**

Nach der Verbindung von einer Tumorsphäre mit einer organotypischen Kultur sollte ja in Zukunft auch die Behandlung mit dem miR451-Mimic angestrebt werden. Jedoch ist das Lipofectin System sehr unspezifisch. Dadurch, dass die verwendeten Lipofectine nicht pseudotypisiert sind und auch sonst keine nanotechnologische Modifikation besteht, ist zu erwarten, dass diese sowohl von Tumorzellen als auch von gesunden Hirnzellen aufgenommen werden. Die Einbringung des miR-451-Mimic sollte aber möglichst nur in die Tumorzellen erfolgen. Deshalb musste überprüft werden, ob es einen deutlichen Unterschied in der Aufnahme von Lipofectin zwischen den Tumorsphären und dem Gewebe der OTC gibt. Diese Überprüfung wurde über die Aufnahme des DY547 gekoppeltem Mimic und des miR-451 Mimics mittels Konzentrationsreihe ermittelt. Gewählt wurden die Konzentrationen 1nM, 10nM und 100nM pro ml. Für das Transfektionsreagenz wurde eine Konzentration von 2,5µl/ml gewählt. Nach einem und nach zwei Tagen wurde jeweils eine Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Kontrolle durchgeführt. Am zweiten Tag wurden die OTCs dann pelletiert um in der PCR die Aufnahme des miR-451 Mimics zu quantifizieren.

### **2.5.2.3 Lipofektion von A172 Zellen mit dem miR-451 Mimic**

Nach Festlegen der Konzentrationen von Mimic und Transfektionsreagenz wurden Zellen mit dem miRNA-451 und dem Dy547 gekoppeltem Mimic transfiziert. Die Transfektion erfolgte wie in 2.5.2.1 beschrieben. Als Kontrolle für den Erfolg der Transfektion wurden auch Zellen nur mit dem DY547 Mimic transfiziert. Für jede Kondition wurde dabei ein Well einer 6-Well-Platte verwendet. In jedem Well wurde die Anzahl von 50.000 Zellen verwendet. Das macht 3 Wells mit jeweils 50.000 Zellen pro Kondition (miR-451+Dy547; Dy547; unbehandelt). Für die Mimics wurde 100nM/ml und für das Transfektionsreagenz 2,5µl/ml verwendet. Um den Erfolg der Transfektion zu Überprüfen wurde jede Kondition täglich mit dem Licht- und Fluoreszenzmikroskop kontrolliert.

Außerdem wurde jeden Tag ein Well jeder Kondition zu einem Zellpellet abzentrifugiert um die Schnelligkeit der Transfektion und die Stabilität der eingebrachten miRNA mittels PCR überprüfen zu können.

### **2.5.2.4 Lipofektion von Hanging drop Sphären aus A172 Zellen mit dem miR-451 Mimic**

Wie bei den Zellen wurden 3 Wells pro Kondition verwendet. In jedem Well befanden sich 8-10 Hanging-drop Sphären. Wieder wurden 3 Wells mit dem miR-451 Mimic und dem DY547 Mimic transfiziert. Als Kontrolle für den Transfektionserfolg wurden wieder 3 Wells nur mit dem DY547 Mimic transfiziert. 3 Wells wurden als Negativkontrolle nicht behandelt. Wie bei den anderen Versuchen wurde für die Mimics 100nM/ml und für die Transfektionsreagenz 2,5µl/ml verwendet. Da das 451 Mimic im Zellversuch überaus stabil schien wurden hier die Fluoreszenzkontrolle und das Pelletieren nach einem, fünf und zehn Tagen durchgeführt.

### **2.5.2.5 Transfektion ohne Lipofectin**

Die A172 Zellen wurden bis zu einer ausreichenden Dichte als adhärenente Monolayer kultiviert. Anschließend wurde die übliche Menge von 100nM/ml an miR-451 Mimic zugegeben, ohne dieses vorher mit dem Lipofectin zu mischen. Nach 2 Tagen in Kultur wurden die Zellen dann geerntet und pelletiert. Mithilfe einer PCR wurde anschließend der Transfektionserfolg überprüft.

## **2.6 MiRNA Isolierung und PCR**

Als Kontrolle für eine erfolgreiche Transfektion von miRNA-451 reicht die Fluoreszenzkontrolle über das DY- Mimic natürlich nicht aus. Deshalb musste diese mittels qRT-PCR verifiziert werden.

Auch die Effizienz der lentiviral transfizierten Zellen wurde mittels qRT-PCR quantifiziert.

### **2.6.1 miRNA Isolierung**

Die Isolierung der miRNA aus den Proben wurde mittels mRNeasy Micro Kit von Qiagen vorgenommen. Beim Ablauf wurde den Empfehlungen des Herstellers (Quick-start Protocol) entsprochen.

### **2.6.2 Photometrische Quantifizierung und cDNA-Synthese**

Für die Bestimmung der RNA Menge aus dem Eluat wurde der Fluoreszenz-Farbstoff RiboGreen verwendet.

Das Ribogreen wurde 1:200 mit TE Puffer, die Probe 1:50 mit Wasser gemischt. Anschließend wurden 50µl Probe und 50µl Ribogreen-Mix in ein Well einer speziellen 96-Well Platte gegeben und mittels Spektrometer vermessen. Für jede Probe wurden 2 Wells gemessen und die Werte anschließend gemittelt (Duplicates) (37).

Die photometrischen Messungen wurden mit dem FLUOstar-Optima-Spektrometer der Firma BD Labtech durchgeführt. Verwendet wurden die in der Software als Protokoll gespeicherten Voreinstellungen für Messungen mit Ribogreen.

Die cDNA-Synthese wurde mit dem Universal cDNA synthesis kit II (Exiqon) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

### **2.6.3 qRT-PCR**

Die qRT-PCR wurde mit dem Light Cycler LC-480 von Roche (für 96 Well- Platten) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Protokoll wurde ein bereits voreingestelltes Setting benutzt (von der Firma Exiqon empfohlen), welches auf die miRNAs zugeschnitten wurde. Die PCR wurde sowohl für die Proben des Lipofectin-Systems als auch für die Proben des Tet-on Systems durchgeführt. Als Primer wurde das Exiqon micro-RNA hsa-miR-451a LNA<sup>TM</sup> PCR Primer Set

(Target-Sequenz: AAACCGUUACCAUUACUGAGUU)in Verbindung mit dem Kapa Sybr Fast (VWR) verwendet.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Ergebnisse der Einfrierexperimente**

#### **3.1.1 Kein Unterschied in der Vitalität der Tumorsphären**

Es gibt keinen Unterschied in der Vitalität von vorher eingefrorenen Hanging Drop Sphären zu frisch hergestellten Sphären. Sowohl die Sphären mit 10.000 Zellen/drop als auch jene mit 25.000 Zellen/drop überlebten alle, egal ob aufgetaut oder frisch. Beobachtet wurde das Überleben der Sphären im Zeitraum von 7 Tagen. Dies gilt sowohl für die Kultur im Normal-Attachment-Well als auch für die Kultur im Ultra-low-Attachment-Well.

In der adhärenen Kultur waren die aufgetauten Sphären aber durchweg kleiner als die frischen Sphären, auch der auswachsende Zellsaum schien weniger homogen (Abb. 3-1) Der Größenunterschied betrifft zwar auch die Sphären im Ultra low attachment Well aber im Gegensatz zur adhärenen Kultur, ist hier auf dem ersten Blick kein erheblicher Größenunterschied zu sehen. (Abb. 3-2). Die Unterschiede in der Sphärengröße wurden im Folgenden genauer untersucht.

#### **3.1.2 IMARIS-Auswertung der Sphärengrößen**

Mithilfe des IMARIS-Computerprogramms (von Bitplane) wurden die verschiedenen Konditionen aus dem Versuch zur Kryopräservation bezüglich ihres Umfangs verglichen. Dabei ist auffällig, dass alle Sphären in adhärenen Kultur im zeitlichen Verlauf kleiner werden. Die frei schwimmenden Sphären zeigten dagegen im zeitlichen Verlauf kaum eine Veränderung in der Größe (Siehe Anhang: 6.2). Dieser Unterschied ist wohl bedingt durch die von der Sphäre migrierenden Zellen. Denn nur bei der adhärenen Kultur ist eine Migration der Zellen möglich.

Prinzipiell sind alle aufgetauten Sphären kleiner als die frisch hergestellten derselben Kondition. Diese Beobachtung wurde bereits vom ersten Tag an

gemacht. Das deutet darauf hin, dass dieser Größenunterschied bereits vor Kultivierung auftritt. Demnach sind Sphären aufgrund der Kryopräservierung und dem Auftauvorgang kleiner als frisch hergestellte.

### **3.1.3 Morphologische Veränderungen nach Einfrieren**

Nach Anwachsen der Sphären konnte man an dem Zellsaum um die Sphäre morphologische Veränderungen beobachten. Diese traten ausschließlich bei jenen auf welche zuvor durch den Ein/Auftau-Prozess gingen (Abb. 3-3).

Bei diesen Veränderungen ging es im Wesentlichen um das Auftreten sehr großer Zellen mit prominenten Zellkernen deren Nukleus allein größer ist als die Zellen um sie herum (Abb. 3-3 linkes Bild, Bildmitte). Das Soma ist zytoplasmareich und wirkt granuliert. Auch unmittelbar unter der abnormen Zelle im Bild befindet sich verdeckt von einigen Zellen mit normaler Morphologie, eine weitere dieser Zellen.

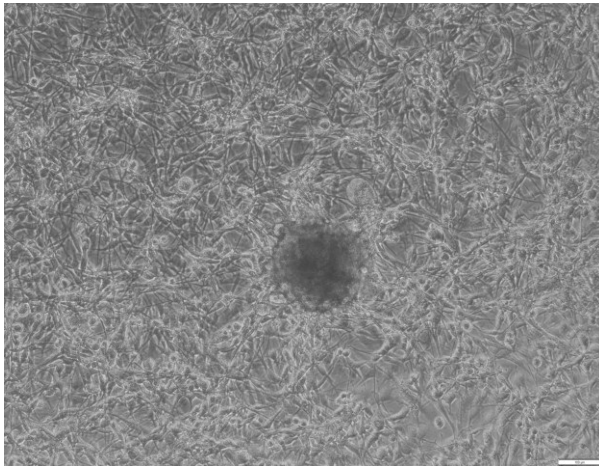
Teilweise machte es den Anschein, dass Zellen mit mehreren Zellkernen vorkamen. Diese imponierten dabei wie ein Synzytium aus Zellen (Abb.3-3 rechtes Bild) Am oberen Bildrand mittig bis links sind keine Zellkörper zu sehen stattdessen eine Art Zellsynzytium dessen Körper diesen Platz in Anspruch zu nehmen scheint. Auch im rechten unteren Bildquadranten ist dies zu sehen.

Wahrscheinlich sind diese Veränderungen auf die Behandlung mit Dimethylsulfoxid (DMSO) zurückzuführen, da dieses wie oben bereits erwähnt mutagene Eigenschaften besitzt (28). Überhaupt besitzt DMSO eine breite Palette an Einflüssen auf Zellen verschiedener Art (38).

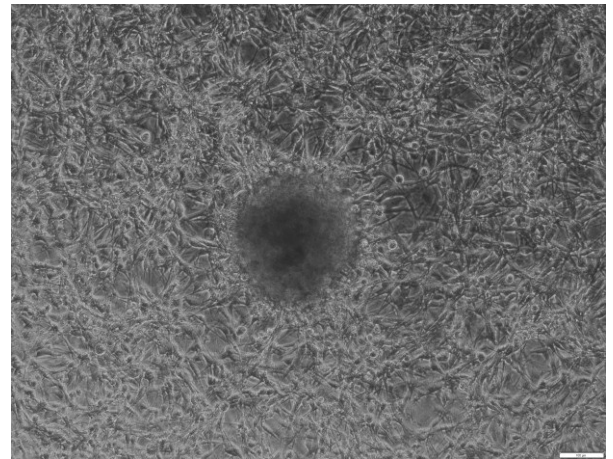
Im Endeffekt wurde gezeigt, dass es möglich ist an Tumorsphären aus der A172 Zelllinie effizient eine Kryopräservierung durchzuführen. Aber aufgrund des Auftretens von Größenunterschieden und vor allem von morphologischen Anomalien wurden für alle anderen Experimente immer frische Tumorsphären hergestellt.

a)

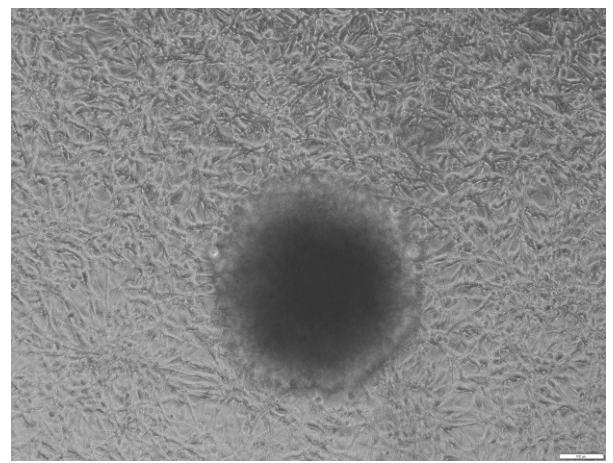
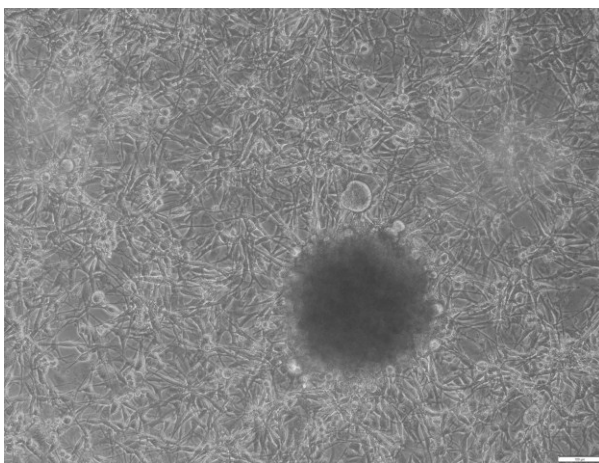
b)



c)

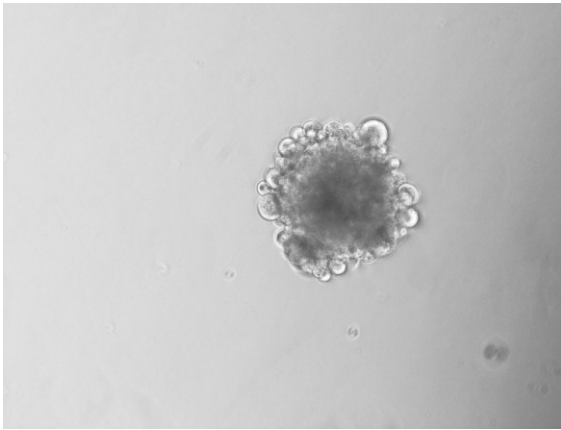


d)

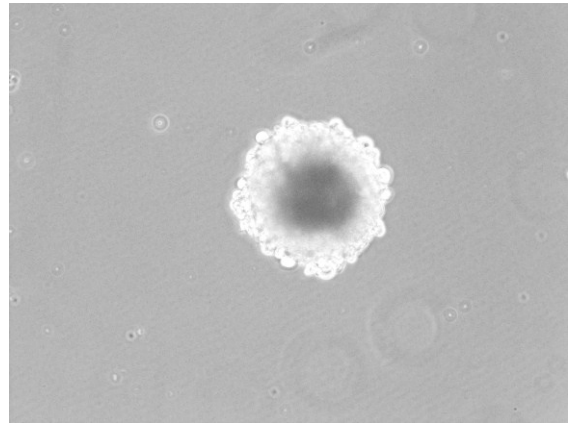


**Abbildung 3-1: 7-Tage Überleben von Hanging drop Sphären in der 48-Well-Platte im Vergleich.** Links sind die aufgetauten Hanging drop Sphären und rechts sind frische HD Sphären in 10x Vergrößerung zu sehen. **a)** zeigt jeweils eine aufgetaute Sphäre mit 10.000 Zellen/drop und **b)** eine frische Sphäre mit 10.000 Zellen/drop. **c)** zeigt eine aufgetaute Sphäre mit 25.000 Zellen/drop und **d)** eine frische Sphäre mit 25.000 Zellen/drop. Alle Sphären wurden wie oben beschrieben hergestellt und befanden sich in einer 48-Well Platte. Zu diesem Zeitpunkt waren die Sphären alle bereits 7 Tage in Kultur.

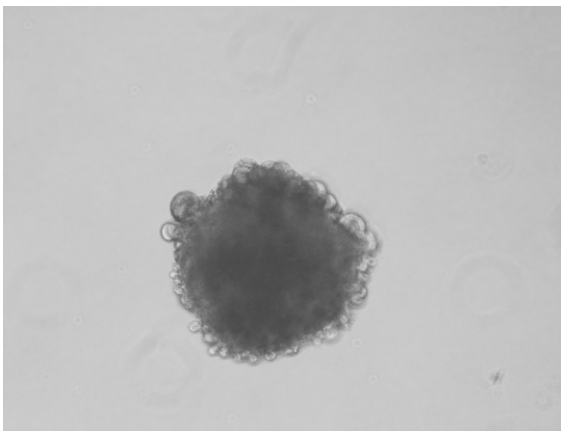
a)



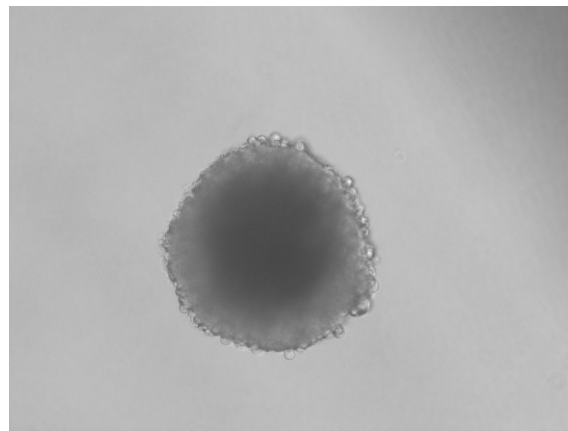
b)



c)



d)

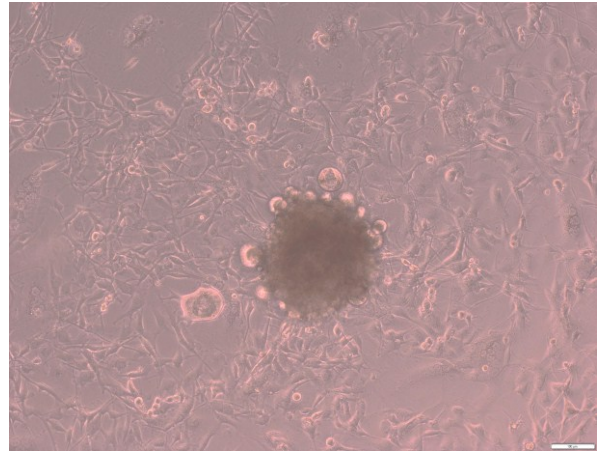


**Abbildung 3-2: 7-Tage Überleben von Hanging drop Sphären in der Ultra-low-attachement-Well-Platte im Vergleich.** Wie in Tabelle 3-1 sind auch hier links die aufgetauten Sphären und rechts die frischen Sphären in 10x Vergrößerung zu sehen. **a)** zeigt eine aufgetaute Sphäre mit 10.000 Zellen/drop und **b)** eine frische Sphäre mit 10.000 Zellen/drop. **c)** zeigt eine aufgetaute Sphäre mit 25.000 Zellen/drop und **d)** eine frische Sphäre mit 25.000 Zellen/drop. Alle Sphären wurden wie oben beschrieben hergestellt und befanden sich in einer Ultra-low-attachement-Platte. Zu diesem Zeitpunkt waren die Sphären alle bereits 7 Tage in Kultur.

a)



b)



**Abbildung 3-3 Zellanomalien bei aufgetauten Sphären:** Beide Bilder zeigen morphologische Auffälligkeiten wie sie nur bei den aufgetauten Hanging-drop Sphären zu finden waren. Beide Bilder wurden in 10x Vergrößerung von 7 Tage alten aufgetauten Hanging drop Sphären aus einer 48-Well-Platte aufgenommen. **a)** zeigt eine „Riesenzelle“ (Bildmitte). **b)** zeigt eine Anomalie im Zellsaum der Sphäre.

### **3.2 Ergebnis der Erstellung eines In-Vitro Tumormodells**

Die Verbindung einer DIO gefärbten Tumorsphäre mit einer OTC, war mit beiden beschriebenen Methoden erfolgreich. Dabei zeigte sich aber, dass die Vitalität der Kulturen mit vorkultivierten OTCs schlechter war. Überhaupt lebte einen Tag nach der Verbindung nur noch ca. die Hälfte der Kulturen. Die Verbindung von einer bereits kultivierten OTC mit einer Tumorsphäre ist überdies auch technisch schwieriger und zeitlich aufwändiger, da auf das Anwachsen der Sphäre gewartet werden muss bevor die Kultur wieder in den Inkubator rücküberführt werden kann. Aus dem gleichen Grund war die Kultur auch längere Zeit ohne Nährmedium. Trotz allem war auch hier ein Erfolg zu verzeichnen (Abb. 3-4). Es lässt sich aber durchaus eine Verschlechterung der Vitalität nach 3 Tagen feststellen, was vor allem an der Unterseite der Kultur zu sehen ist. Die Sphäre selbst macht mit fortschreitender Zeit einen kompakteren Eindruck. Die Ausbreitung von Tumorzellen ins Gewebe ist jedoch nicht zu erkennen und kann hier im Fluoreszenzbild kaum beurteilt werden.

Die fluoreszierenden Zellen an der Unterseite der Kultur in Abb. 3-4 waren bereits am ersten Tag sichtbar und blieben in ihrem Erscheinung relativ stabil. Die Verbindung einer Tumorsphäre mit einer frischen OTC und deren gemeinsame Einbettung mit dem Plasma/Thrombin Gemisch war hingegen viel erfolgreicher.

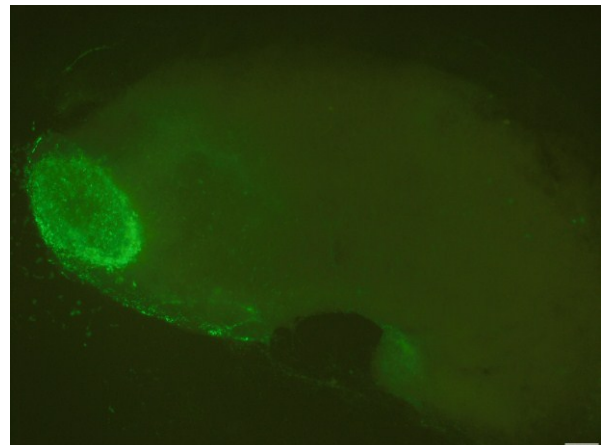
Von 8 angelegten Kulturen lebten nach 3 Tagen noch 7 Kulturen. Nach 4 Tagen noch 6, was aber mitunter auch auf den Einfluss der proliferierenden Tumorzellen zurückzuführen ist.

Lichtmikroskopisch war eine gute Einbettung der Sphäre in den Gewebeverband zu sehen (Abb.3-5). Teilweise verschmolz die Sphäre regelrecht mit der OTC. Unter dem Lichtmikroskop konnte man jedoch nicht die Ausbreitung der Tumorzellen im Gewebe beurteilen. Da aber alle Sphären vorher mit DIO gefärbt wurden (Siehe 2.4.1) konnte man das Fluoreszenzmikroskop zu Hilfe nehmen. Die Zellen scheinen hellgrün unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die unmittelbare Ausbreitung um die Sphäre konnte relativ gut beobachtet werden (Abb. 3-5), jedoch scheint es als ob die Floreszenz einzelner entfernter Zellen zu schwach ist. Insgesamt ist dieses Modell eine Interessante Möglichkeit die Ausbreitung eines Hirntumors *in vitro* zu simulieren und mikroskopisch zu verfolgen.

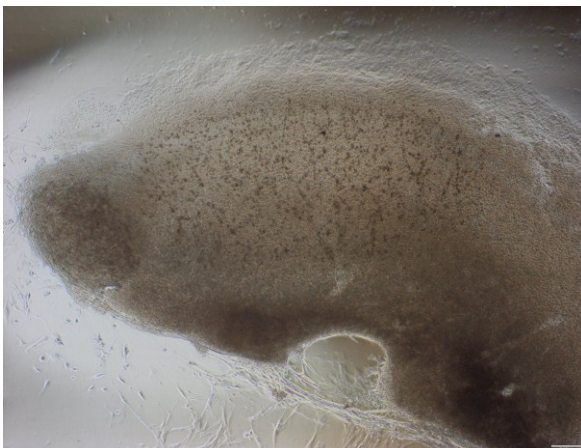
a)



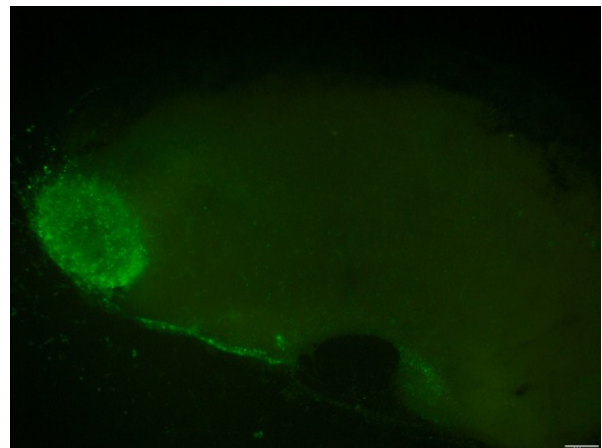
a')



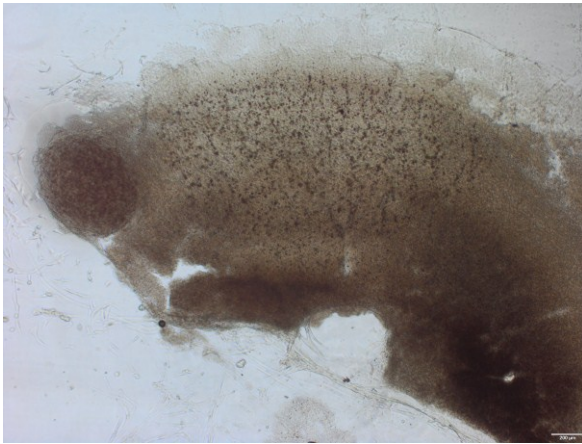
b)



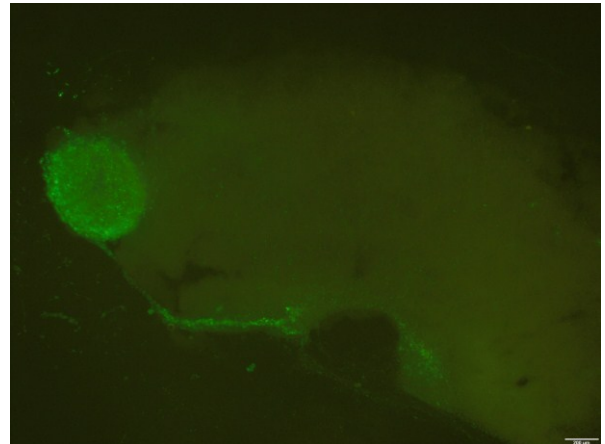
b')



c)

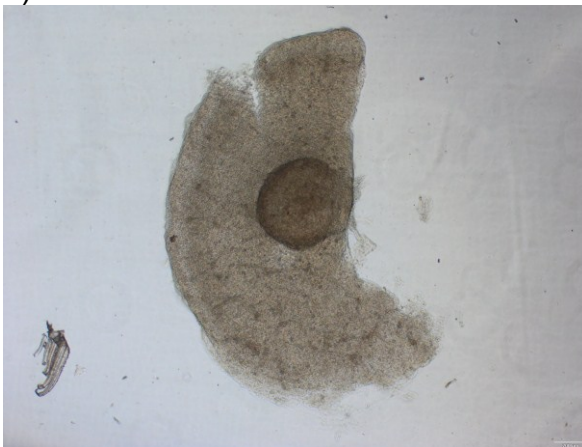


c')

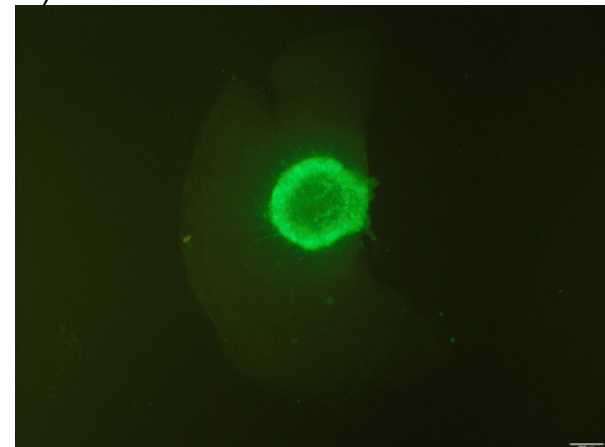


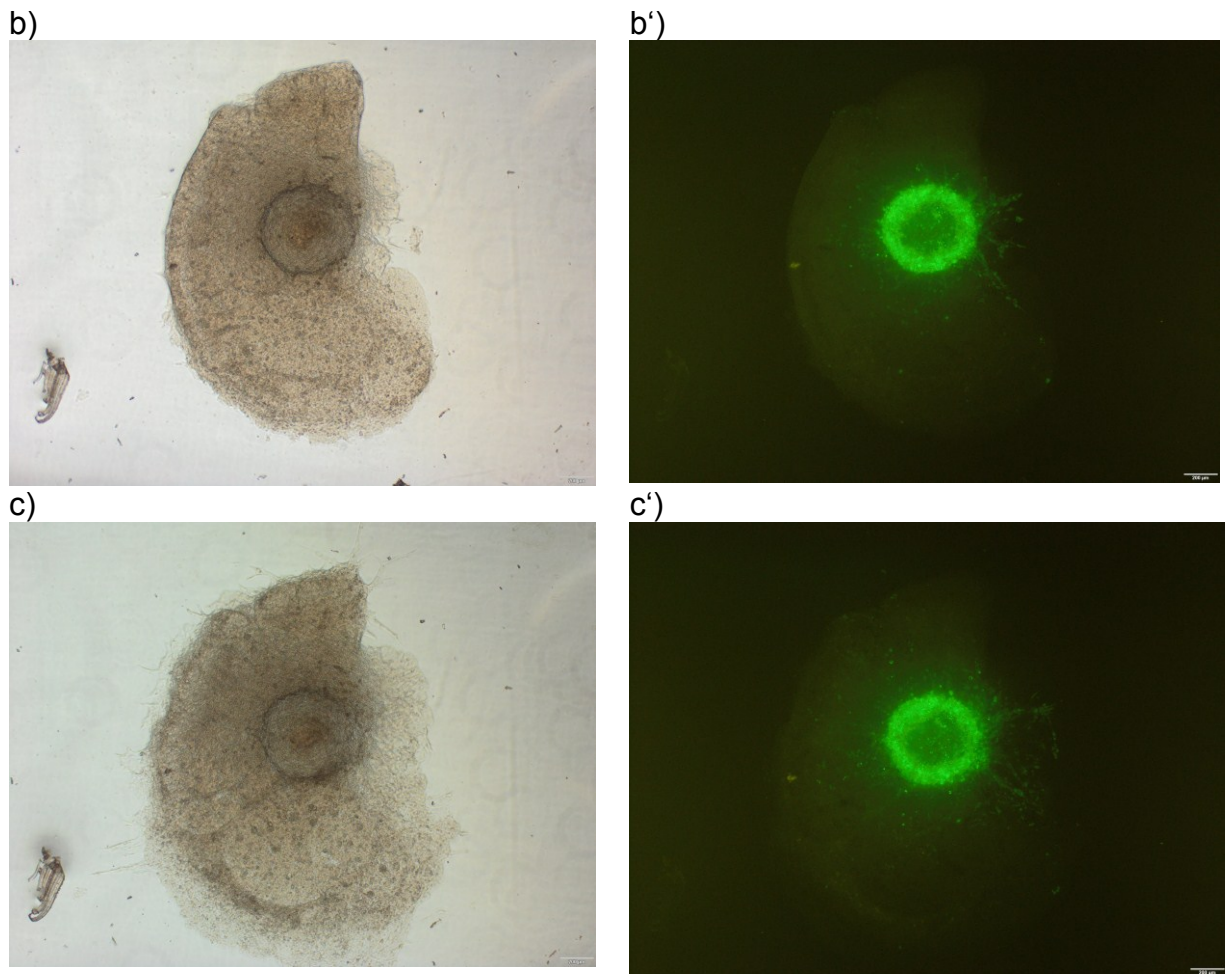
**Abbildung 3-4: Entwicklung *in vitro*-Tumormodells bei Verbindung einer HD-Sphäre mit einer bereits fertigen OTC im zeitlichen Verlauf.** Links zu sehen sind die Lichtmikroskopischen Bilder des *in vitro* Modells von oben nach unten nach 1 (a), 2 (b) und 3 (c) Tagen. Rechts dazu sieht man die Fluoreszenzaufnahme der zuvor mit DIO gefärbten Sphäre, ebenfalls nach 1 (a'), 2 (b') und 3 (c') Tagen. Alle Aufnahmen wurden mit 4x Vergrößerung gemacht. Der fluoreszente Zellsaum am unteren Rand der Kultur bestand bereits nach dem ersten Tag und blieb fast unverändert, wodurch davon auszugehen ist, dass es sich um ein Artefakt handelt.

a)



a')





**Abbildung 3-5: : Entwicklung des *in vitro*-Tumormodells bei Verbindung einer HD-Sphäre mit einer OTC bei gleichzeitiger Einbettung in Plasma und Thrombin im zeitlichen Verlauf.** Links zu sehen sind die Lichtmikroskopischen Bilder des *In Vitro* Modells von oben nach unten nach 1 (a), 2 (b) und 3 (c) Tagen. Rechts dazu sieht man die Fluoreszenzaufnahme der zuvor mit DIO gefärbten Sphäre, ebenfalls 1(a'), 2 (b') und 3 (c') Tagen. Die Aufnahmen wurden in 4x Vergrößerung erstellt. Die Abflachung und Ausbreitung der OTC vom 1. auf den 3. Tag ist bis zu einem gewissen Maß normal. Im Fluoreszenzbild kann man bei dieser Art des *in vitro* Modells eine Ausbreitung der Tumorzellen radiär um die HD-Sphäre erkennen.

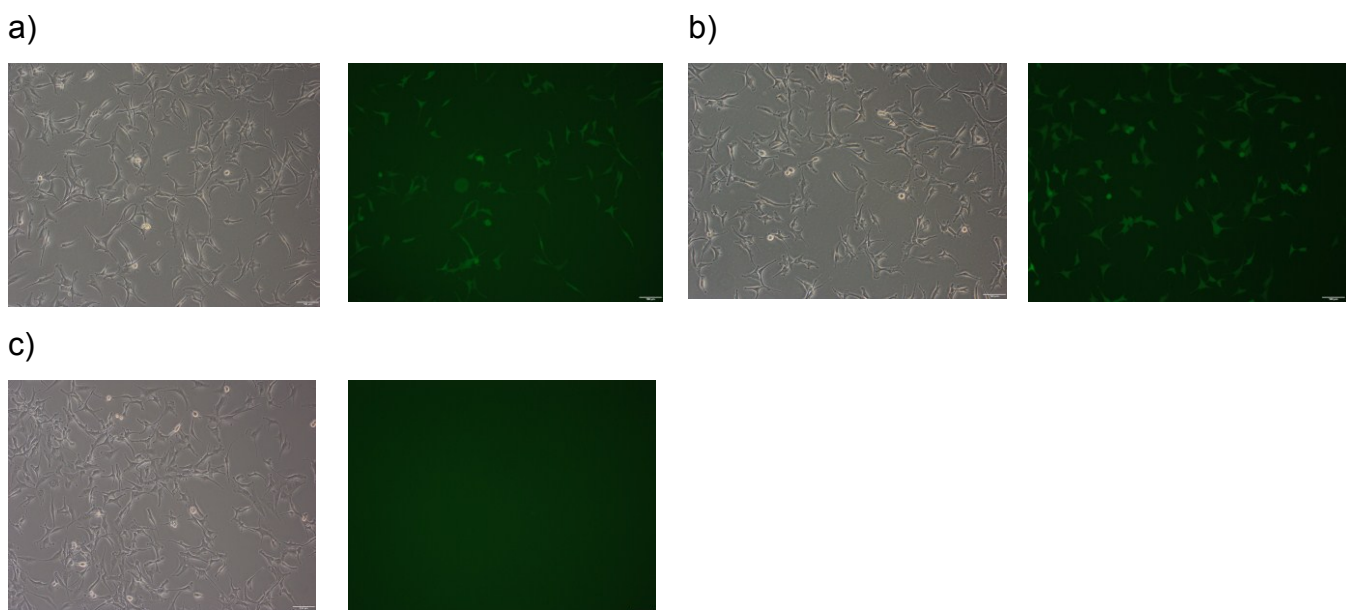
### **3.3 Ergebnis der Etablierung eines Systems zur Einbringung der miRNA-451**

#### **3.3.1 Ergebnisse zum Tet-on System**

##### **3.3.1.1 Transduktion der Zellen**

Die Transduktion von Zellen mittels Tet-System war ineffizient. Es zeigte sich, dass nur sehr wenige Zellen erfolgreich transduziert wurden (Abb. 3-6). Dabei war auch zu beobachten, dass der Anteil positiver zu dem negativer Zellen bei den

TetC transduzierten Zellen höher war (Abb. 3-6 b) als bei den Tet 451 transfizierten Zellen (Abb. 3-6 a). Die untransfizierten Zellen wiesen erwartungsgemäß keine Fluoreszenz auf (Abb. 3-6 c) Der Effekt der Selektion mittels Puromycin war unzureichend, selbst eine Erhöhung der Konzentration von 1,5µg auf 3µg hatte keinen Effekt. Bei der Sortierung nach GFP Expressionsstärke mittels FACS, wurden Tet-positive Zellen von Tet-negativen getrennt. Hier zeigte sich, dass nur eine sehr geringe Anzahl von Zellen ausreichend fluoreszent waren. Auch hier war aber die Transfektion mit TetC im Verhältnis zu Tet 451 erfolgreicher.



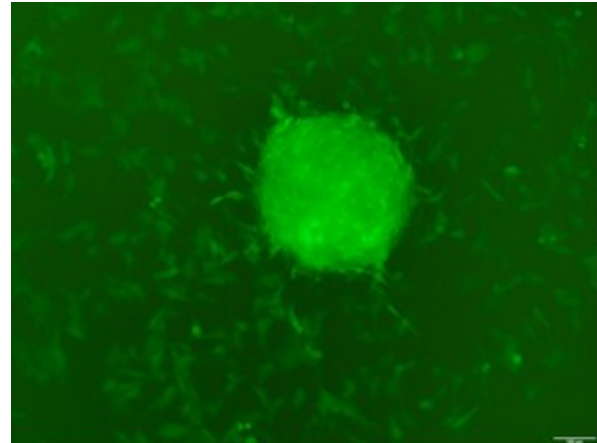
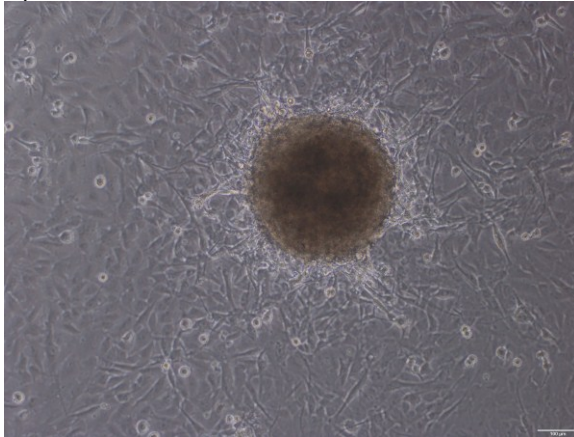
**Abbildung 3-6 Transduzierte A172-Zellen nach Induktion im Vergleich:** Die Aufnahmen wurden alle am 2. Tag nach Induktion in 10x Vergrößerung gemacht. In **a)** sieht man 451 transfizierte Zellen, in **b)** befinden sich TetC transfizierte Zellen und in **c)** sieht man nicht induzierte Zellen als Kontrolle.

### 3.3.1.2 Transduktion der Hanging-Drop Sphären

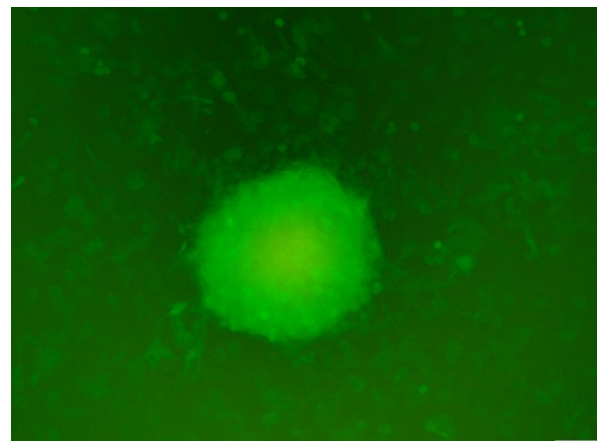
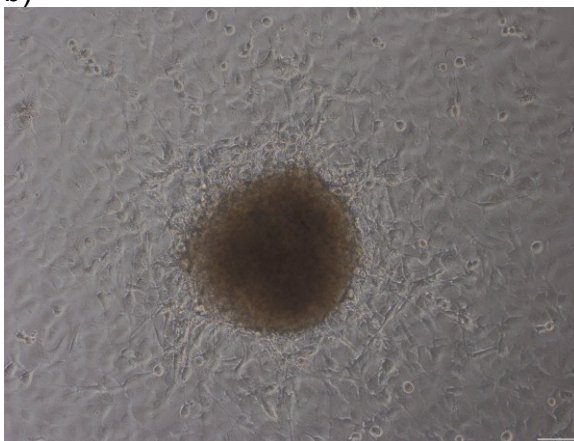
Da für die Bildung von Hanging-Drop Sphären bereits GFP positive FACS-sortierte Zellen verwendet wurden war die Fluoreszenz prinzipiell stärker ausgeprägt als bei adhärennten Zellen in Monolayer. Allerdings ist die Aussagekraft der Fluoreszenz bei Sphären mitunter reduziert da sich sehr viele Zellen auf engem Raum befinden und es sich um ein dreidimensionales Gebilde handelt. Man konnte auch hier trotz FACS Sortierung bei den Tet451 transduzierten Sphären eine geringere Anzahl fluoreszenter Zellen beobachten als bei den TetC

transduzierten (Abb.3-7). Die auswachsenden Zellen waren in beiden Fällen nur teilweise fluoreszent. . Bei den Tet 451 transfizierten Sphären (Abb. 3-7 a) sind bei den auswachsenden Zellen nicht alle fluoreszent. Bei den TetC transfizierten Sphären (Abb. 3-7 b) sind etwas mehr Zellen fluoreszent und die Sphäre erscheint im Fluoreszenzbild dichter als die Tet451 Sphäre.

a)



b)



**Abbildung 3-7 Transduzierte Hanging-drop Sphären nach Induktion im Vergleich:** Die Aufnahmen wurden alle nach 3 Tage Hanging-Drop Kultur und 2 Tage nach Induktion in adhärenter Kultur in 10x Vergrößerung gemacht. Links sieht man das Lichtmikroskopische Bild und rechts davon die dazugehörige Fluoreszenzaufnahme. In **a)** sieht man Tet451 transfizierte Sphären. In **b)** befinden sich TetC transfizierte Sphären.

### **3.3.1.2.1 Ergebnisse von Induktion vor Hanging-Drop Kultur und Einfluss von Doxycyclin auf die Sphärenbildung**

Unter allen Konditionen dieses Experiments ließen sich Sphären bilden. Die nicht-induzierten Hanging-Drop Sphären fungierten als morphologische Kontrolle. Sichtbar sind sie als dichte runde Zellaggregate mit nur sehr wenigen freien Zellen um die Sphäre herum (Abb.3-8a; 3-9a). Erwartungsgemäß sind diese Sphären nicht fluoreszent. Es ist allenfalls eine schwache Eigenfluoreszenz sichtbar.

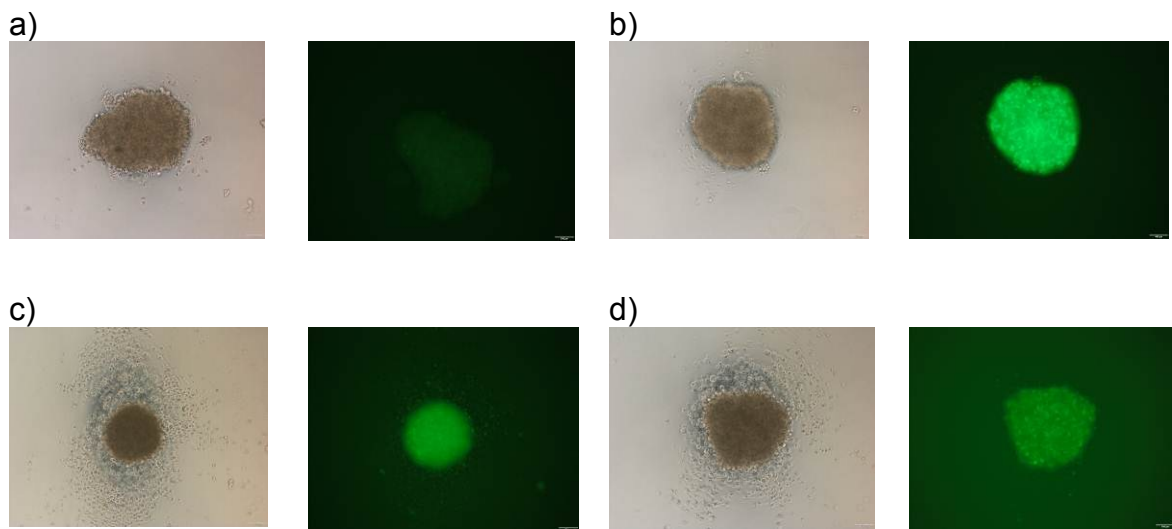
Induziert man die Sphären vor der Kultivierung und kultiviert sie im Hanging-Drop aber mit Vollmedium (präinduziert) so zeigt sich eine gute Bildung einer Sphäre mit guter Dichte und nur geringen freien Zellen (Abb. 3-8 b; 3-9 b). Unter dem Fluoreszenzmikroskop ist eine kräftige Färbung zu erkennen.

Werden die Zellen vor Kultur induziert, verbleiben aber während der Kultur in Vollmedium mit Doxycyclinzusatz (dauerinduziert), so kann man eine gute Sphärenbildung, allerdings mit einer hohen Anzahl an freien Zellen beobachten (Abb. 3-8 c; 3-9 c). Es zeigt sich auch interessanterweise eine im Vergleich zu präinduzierten Sphären schwächere Fluoreszenz. Die Dauerinduzierte Tet451 Sphäre (Abb. 3-8 c) enthält viele freie Zellen, was sich sogar in einer relativen Größenreduktion niederschlägt. Eine Fluoreszenz ist erkennbar jedoch schwächer ausgeprägt. Dagegen sieht man bei der dauerinduzierten TetC Sphäre (Abb. 3-9 c) weniger freie Zellen jedoch auch eine im Vergleich dazu schwächere Fluoreszenz. Bei Sphären die während der Hanging-Drop Kultur induziert wurden (spätinduziert), also in einem Doxycyclin haltigen Medium in Kultur waren, jedoch als Zellen vorher nicht induziert wurden, zeigten ebenfalls eine gute Sphärenbildung. Jedoch konnte man auch hier viele freie Zellen beobachten und die Fluoreszenz war, wie bei den dauerinduzierten Sphären auch, nur mäßig (Abb. 3-8 d; 3-9 d).

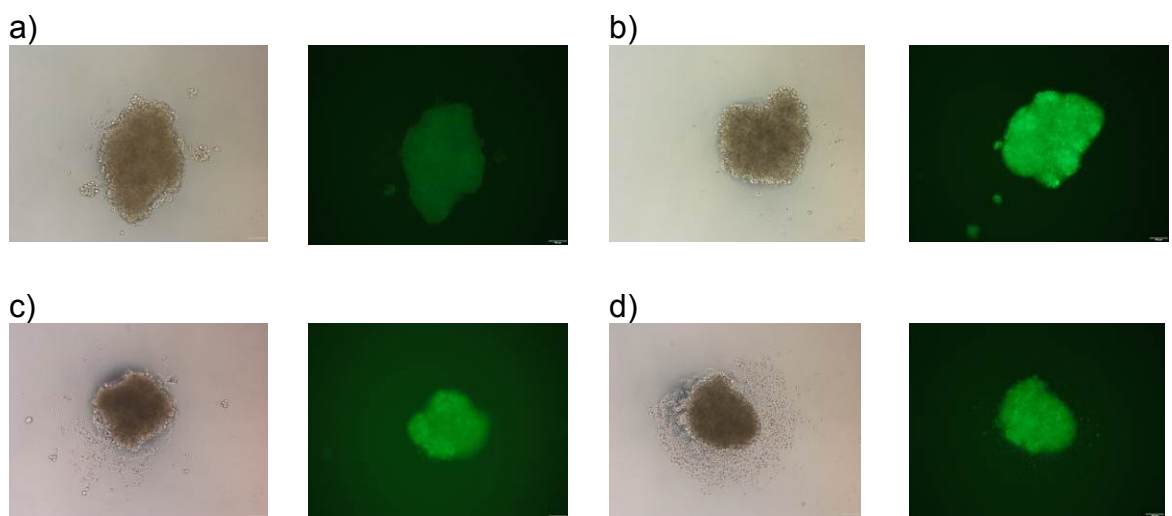
All diese Beobachtungen gelten sowohl für die TetC als auch für die Tet451 transduzierten Sphären. Allerdings ist erwähnenswert, dass die TetC Zellen im Vergleich zu den Tet451 Zellen weniger freie Zellen enthielten (Tet451: Abb. 3-8) (TetC Abb. 3-9).

Die nicht transduzierten A172 Zellen welche mit 20µg Doxycyclin in Hanging-Drop Kultur inkubiert wurden, zeigten ebenfalls eine gute Sphärenbildung. Aber auch hier konnte man viele freie Zellen beobachten (Abb. 3-10). Bei der linken Sphäre (mit 20µg Doxycyclin) zeigen sich viele freie Zellen, sie ist in Relation auch kleiner. Die rechte Sphäre scheint in besserem Zustand und ist etwas größer als die linke. Hier finden sich kaum freien Zellen in der Kultur

Das Auftreten von freien Zellen in Kultur wurde hauptsächlich bei Anwesenheit von Doxycyclin im Medium beobachtet.

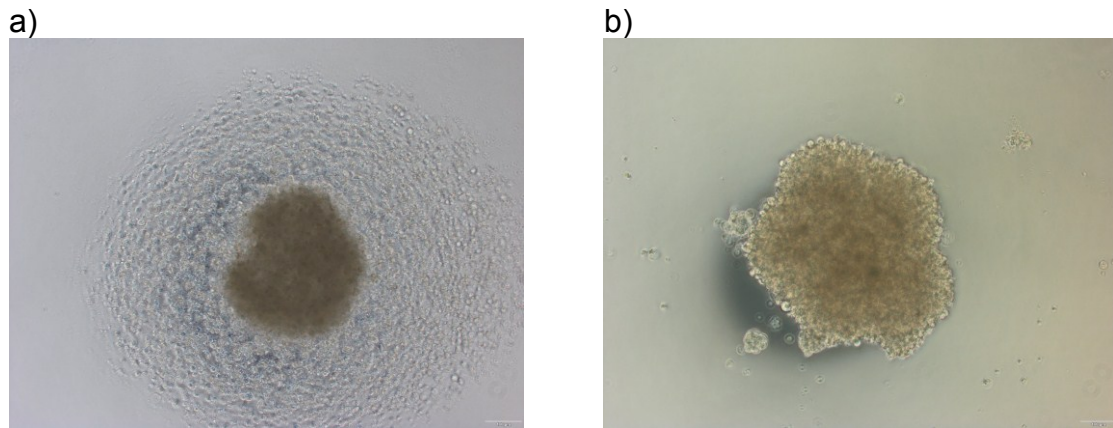


**Abbildung 3-8: Vergleich der Effizienz von Induktionszeitpunkten und Dauer bei Tet451 transfizierten Sphären.** Zu sehen sind jeweils ein lichtmikroskopisches Bild und rechts davon das dazugehörige Bild unter dem Fluoreszenzmikroskop immer in 10x Vergrößerung. Die Bilder wurden in Hanging-Drop Kultur (freischwimmend) gemacht. Alle Sphären sind Tet 451 transfiziert. In **a)** sieht man eine nicht-induzierte Sphäre mit wenigen freien Zellen. In **b)** sieht man eine präinduzierte Sphäre mit einem kleinen Saum an freischwimmenden Zellen. In **c)** befindet sich eine dauerinduzierte Sphäre mit vielen freien Zellen. In **d)** sieht man eine spätinduzierte Sphäre mit vielen freien Zellen.



**Abbildung 3-9: Vergleich der Effizienz von Induktionszeitpunkten und Dauer bei TetC transfizierten Sphären.** Zu sehen sind jeweils ein lichtmikroskopisches Bild und rechts davon das dazugehörige Bild unter dem Fluoreszenzmikroskop immer in 10x Vergrößerung. Die Bilder wurden in Hanging-Drop Kultur (freischwimmend) gemacht. Alle Sphären sind Tet C transfiziert.

schwimmend) aufgenommen. Alle Sphären sind TetC transfiziert. In **a)** sieht man eine nicht-induzierte Sphäre mit wenigen freien Zellen. **b)** zeigt eine präinduzierte Sphäre mit wenigen freien Zellen. In **c)** erkennt man eine dauerinduzierte Sphäre mit einigen freien Zellen. In **d)** befindet sich eine dauerinduzierte Sphäre mit vielen freien Zellen.

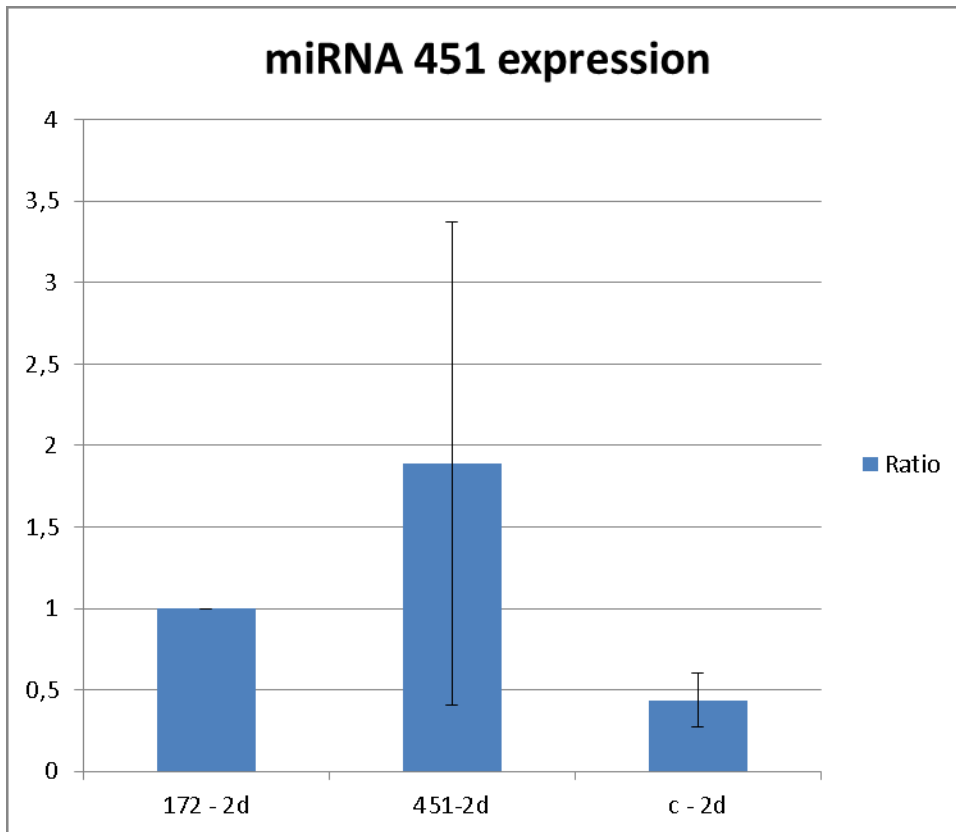


**Abbildung 3-10 Vergleich nicht transfizierter A172 Zellen bei Anwesenheit von Doxycyclin im Medium:**

Diese lichtmikroskopischen Bilder wurden in 10x Vergrößerung in Hanging-Drop Kultur (frei schwimmend) aufgenommen. Beide Sphären sind nicht transfiziert, also native Zellen aus der A172 Zelllinie. Beide wurden in Vollmedium inkubiert, jedoch wurde dem Medium der Sphäre in **a)** 20µg Doxycyclin zugesetzt. In **b)** befindet sich die Zelle in Vollmedium ohne Doxycyclin. In beiden Fällen kam es zur Sphärenbildung.

### 3.3.1.3 PCR Ergebnisse zum Tet-on System

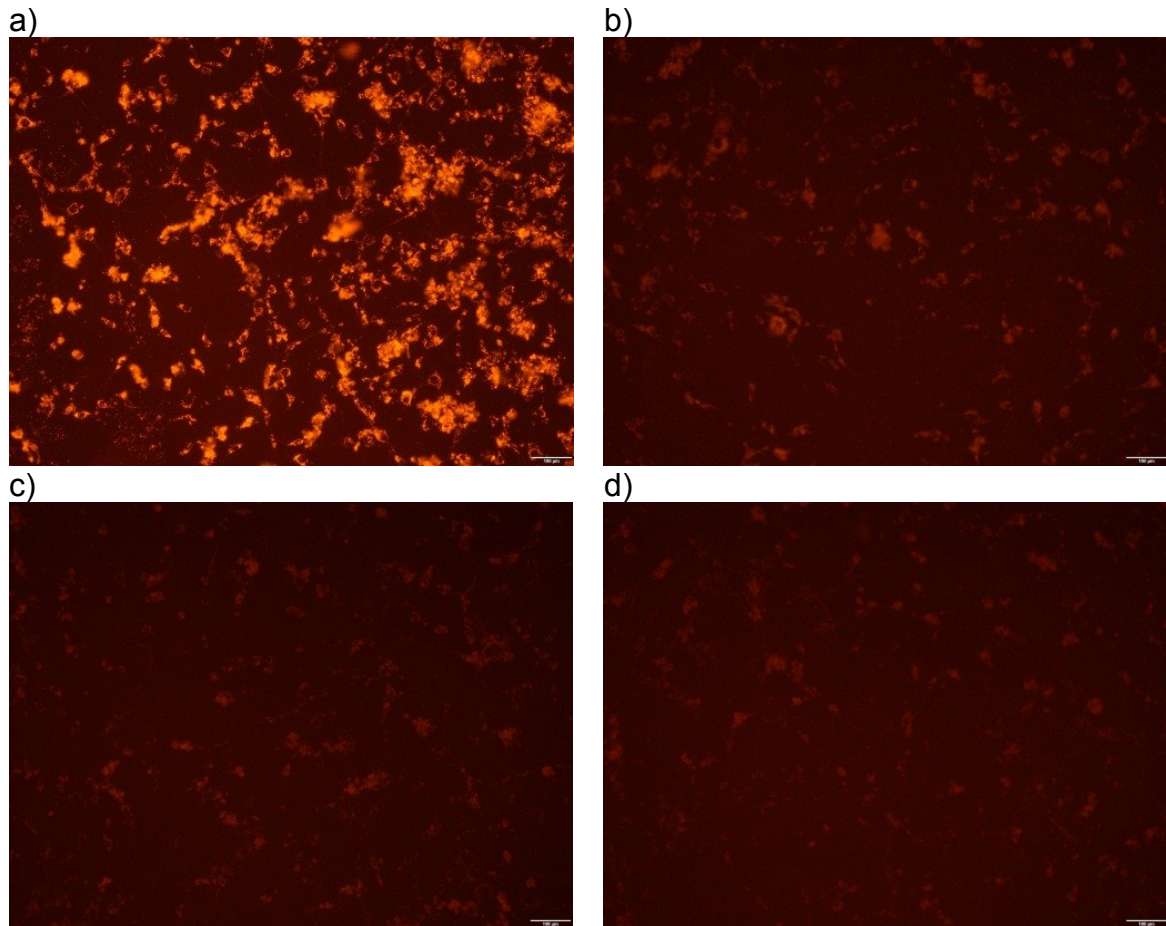
In der PCR zeigt sich keine signifikante Erhöhung der miRNA-451 nach 2 Tagen Doxycyclin Induktion in den Proben. Es konnte keine erhöhte miR-451 Expression detektiert werden. Das Tet-on System erweist sich somit als ineffizient.



**Abbildung 3-11 qRT-PCR Ergebnis von transduzierten A172 Zellen 2 Tage nach Induktion mit Doxycyclin:** es gibt keine signifikante Erhöhung der miRNA451 in den 451 transduzierten Zellen. Die Werte wurden auf die unbehandelten Zellen bezogen.

### 3.3.2 Ergebnisse zur Transfektion mittels Lipofectin System

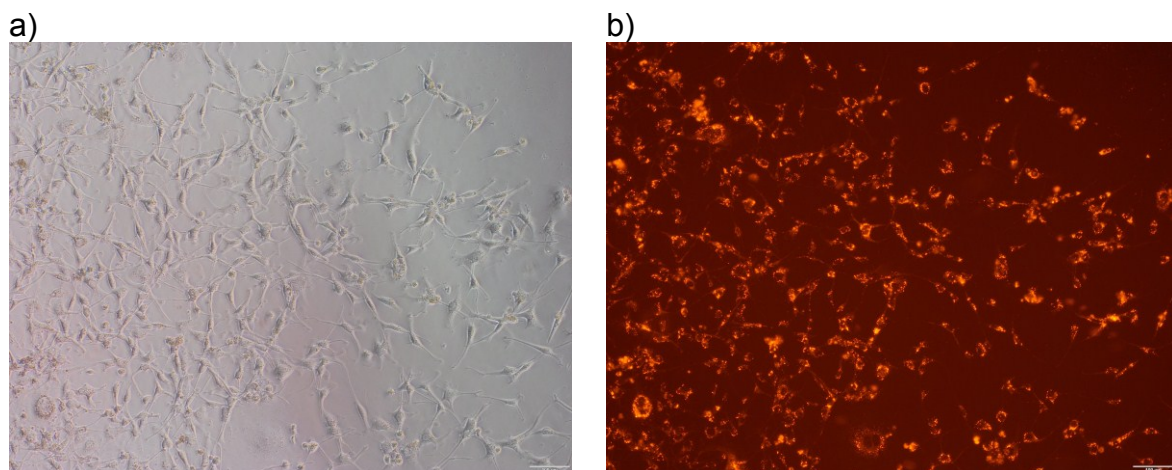
Anhand der Konzentrationsversuche (siehe 2.5.2.2), entschied man sich sowohl für die Hanging-Drop-Sphären als auch für die Zellen eine Konzentration von 100nM Mimic (451, DY547) und 2,5µl Lipofectin pro ml Volumen an Medium. Der Nachweis über erfolgte Transfektion aufgrund der Fluoreszenzkontrolle wurde außerdem mittels qRT-PCR bestätigt. Aber zunächst wurde die Aufnahme des Mimics mittels Fluoreszenzmikroskop optisch begutachtet und beurteilt. Dabei zeigte sich die beste Fluoreszenzfärbung bei einer Konzentration von 100nm (Abb.3-12).



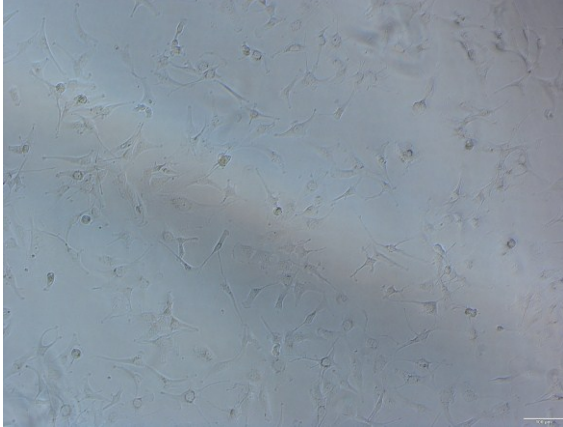
**Abbildung 3-12 Konzentrationsreihe von DY-547 an Zellen:** a) zeigt eine Konzentration von 100nM; b) sind 0,15nM; c) zeigt 0,04nM; d) sind 0,015nM.

### 3.3.2.1 Transfektion der Zellen

Die Transfektion der Zellen schien aufgrund der starken Fluoreszenz erfolgreich gewesen zu sein. Nahezu alle Zellen waren fluoreszent wenn sie mit dem DY547 Mimic transfiziert wurden (Abb. 3-13).



c)



d)

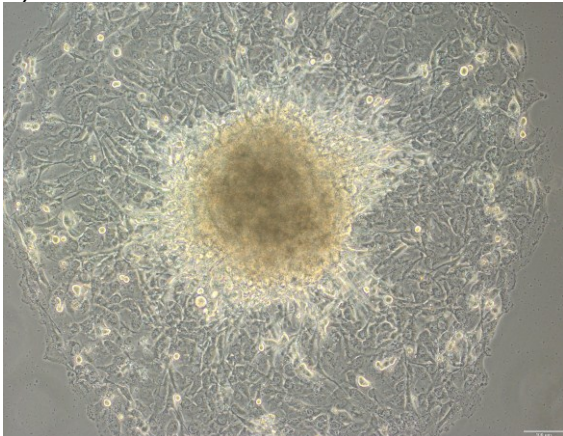


**Abbildung 3-13: A172 Zellen 2 Tage nach Transfektion:** Alle Bilder wurden in 10x Vergrößerung aufgenommen. Die Zellen wurden in dieser Zeit in einem 6-Well als Monolayer mit Vollmedium inkubiert. Das linke Bild zeigt jeweils eine lichtmikroskopische Aufnahme und rechts dazu befindet sich die Fluoreszenzaufnahme. In **a)** befinden sich A172 Zellen welche 2 Tage zuvor mit dem DY547 Mimic transfiziert wurden. Der Erfolg der Transfektion wird in **b)** durch die starke Fluoreszenz der Zellen bestätigt. In **c)** sieht man unbehandelte A172 welche als Kontrolle dienen. Unter Fluoreszenz **d)** ist keine Fluoreszenz zu sehen.

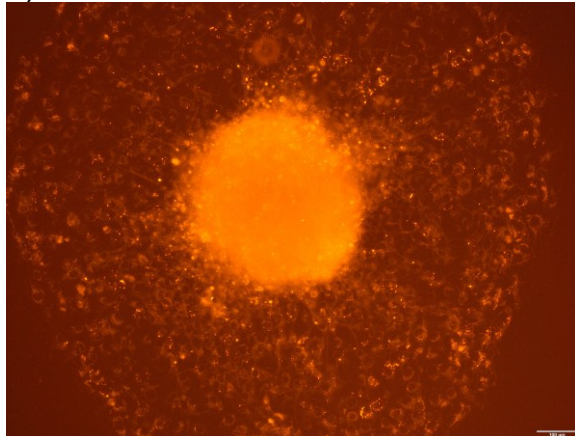
### 3.3.2.2 Transfektion der Sphären

Die Transfektion der Sphären war erfolgreich. Alle Sphären die mit dem DY547 Mimic transfiziert wurden zeigten eine starke Fluoreszenz. Auch die aus den Sphären auswachsenden Zellen waren fluoreszent (Abb.3-14)

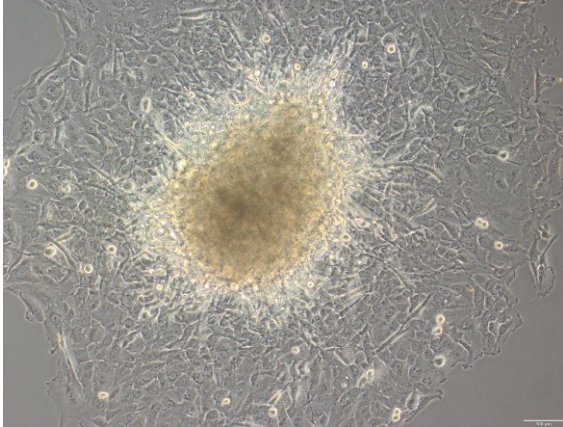
a)



b)



c)



d)

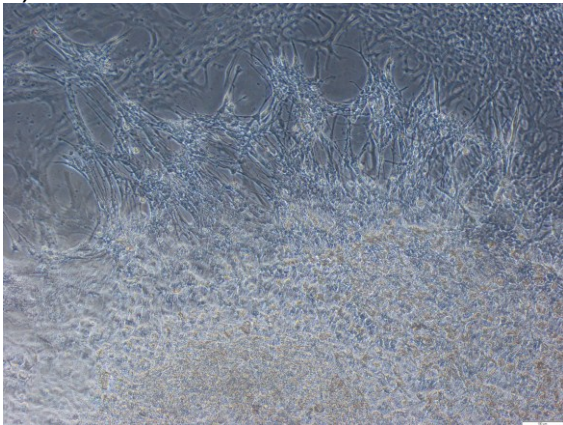


**Abbildung 3-14 Hanging-Drop-Sphären 2 Tage nach Transfektion:** Alle Bilder wurden in 10x Vergrößerung aufgenommen. Die Sphären wurden in dieser Zeit einzeln in einem 6-Well mit Vollmedium inkubiert. Das linke Bild zeigt jeweils eine lichtmikroskopische Aufnahme und rechts befindet sich die Fluoreszenzaufnahme. In **a)** befinden sich Sphären welche 2 Tage zuvor mit dem DY547 Mimic transfiziert wurden. Unter Fluoreszenzlicht **b)** zeigt sich eine kräftige Färbung der Sphäre und der auswachsenden Zellen. **c)** zeigt unbehandelte Sphären als Kontrolle. Bei Fluoreszenzlicht **d)** ist eine schwache Eigenfluoreszenz der Sphäre zu sehen. Die auswachsenden Zellen sind nicht fluoreszent.

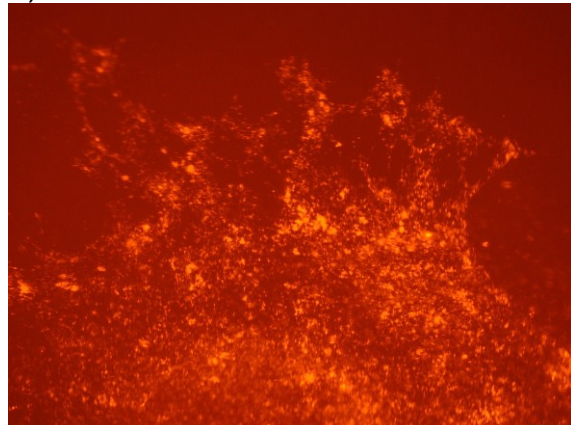
### 3.3.2.3 Transfektion von organtypischen Kulturen

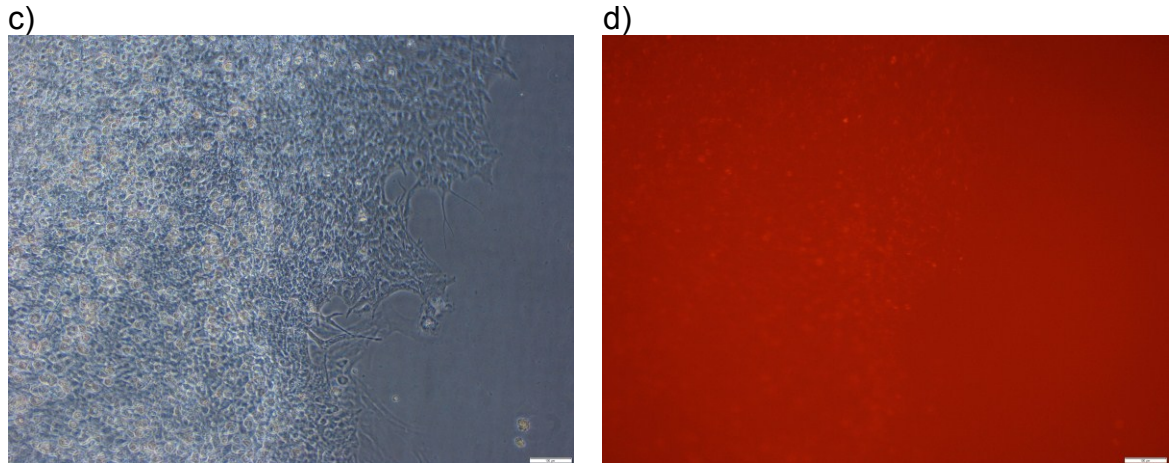
Die Transfektion von organtypischen Kulturen war erfolgreich. Die Fluoreszenz war ähnlich stark ausgeprägt wie bei den Zellen und den Sphären. (Abb.3-15) Jedoch zeigten die OTCs eine nicht unerhebliche Eigenfluoreszenz, vermutlich u.a. bedingt durch die Gewebedicke.

a)



b)





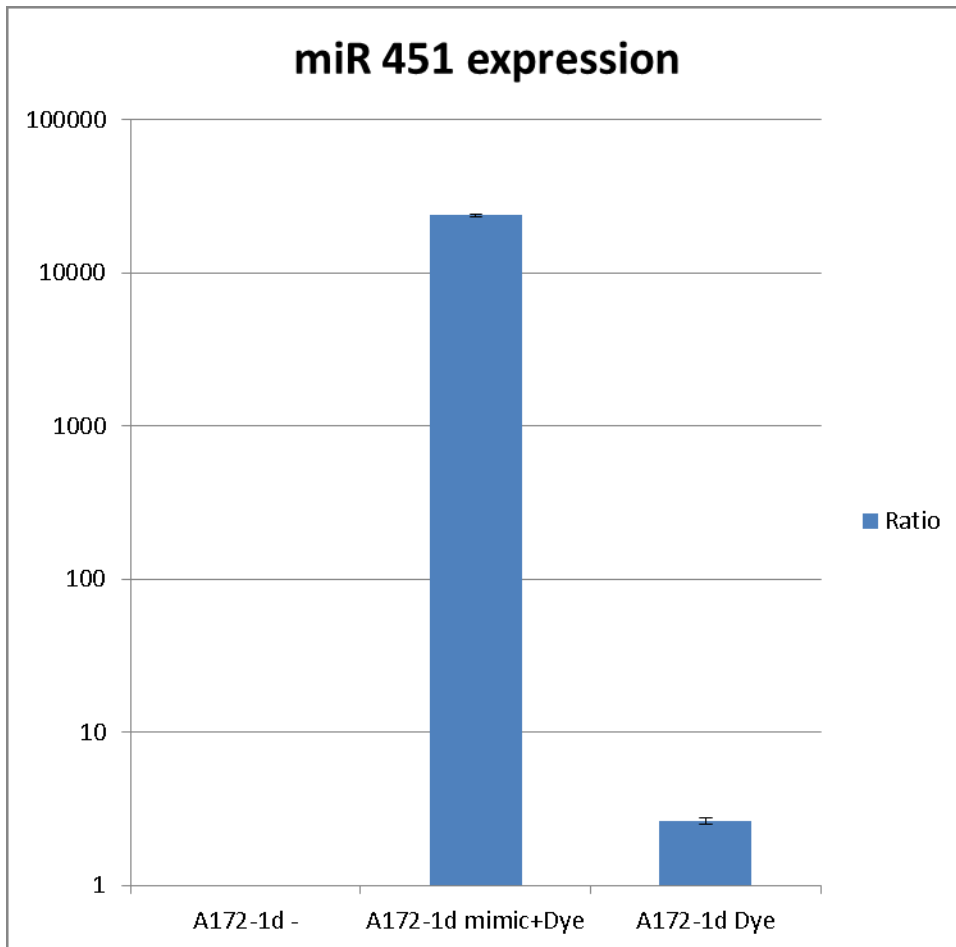
**Abbildung 3-15 Organotypische Kulturen 2 Tage nach Transfektion:** Alle Bilder wurden in 10x Vergrößerung aufgenommen. Jeweils links befinden sich die lichtmikroskopische Aufnahme und rechts die dazugehörige Fluoreszenzaufnahme. Aufgrund der Gewebedicke wurde bevorzugt im Randbereich fotografiert. Die OTCs wurden im Rollertube mit 750 $\mu$ l OTC-Medium kultiviert und auch so fotografiert. **a)** zeigt die Aufnahme einer OTC 2 Tage nach Transfektion mit dem DY547 Mimic. Der Erfolg der Transfektion wurde durch eine kräftige Färbung **b)** bestätigt. Aufgrund der Gewebedicke kann nur eine Ebene gezeigt werden. Darunterliegende Zellen konnten so mitunter nicht fokussiert werden. Die unteren Bilder zeigen die Kontrolle in licht- **c)** und fluoreszenzmikroskopischer **d)** Sicht. Auch hier ist lediglich eine schwache Eigenfluoreszenz sichtbar.

### 3.3.2.4 PCR Ergebnisse zum Lipofectin System

Im Folgenden werden die PCR Ergebnisse zum Lipofektin System gezeigt. Diese wurden als qRT-PCR mit dem LC-480 von Roche erstellt. Alle Ergebnisse werden als  $2^{-\Delta\Delta CT}$  dargestellt. Im Zuge der Analyse wurden auch die Schmelzkurven überprüft. Als Abgleich für die Werte wurde der Spike-in 39-3p herangezogen.

#### 3.3.2.4.1 PCR Ergebnis zur Transfektion von A172 Zellen

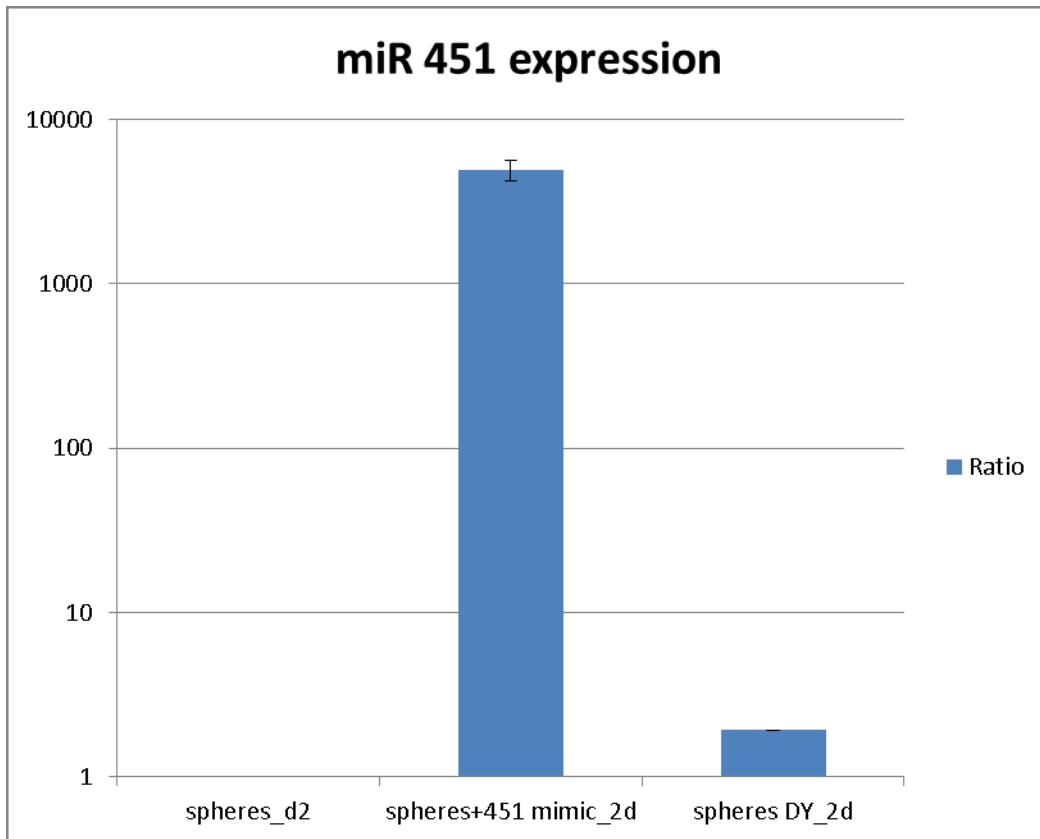
Die PCR zeigt eine signifikante Erhöhung der miRNA-451.



**Abbildung 3-16 qRT-PCR Ergebnis zur Transfektion der A172 Zellen:** Es gibt eine signifikante Erhöhung der miRNA-451 nach Transfektion. Hier wurde diese Erhöhung bereits nach einem Tag nachgewiesen. Das DY547 Mimic wurde hier als Scramble benutzt. Bezogen wurden die Werte auf den Wert der miRNA-451 in unbehandelten Zellen.

### **3.3.2.4.2 PCR Ergebnis zur Transfektion von Hanging-Drop Sphären**

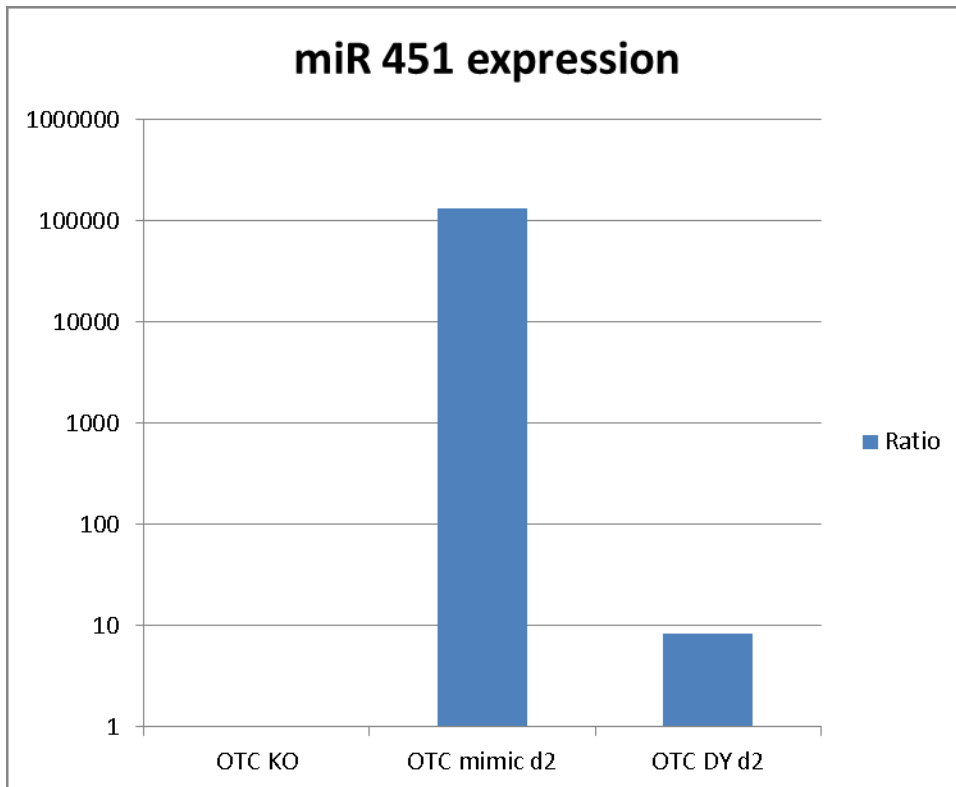
Die PCR zeigt eine signifikante Erhöhung der miRNA-451 in Hanging-Drop Sphären nach Transfektion.



**Abbildung 3-17 qRT-PCR Ergebnis zur Transfektion der Hanging-Drop Sphären:** Dargestellt ist die miRNA-451 Expression nach Transfektion von Hanging Drop Sphären einen Tag nach Transfektion. Das DY 547 Mimic wurde als Scramble verwendet. Die Skala ist logarithmisch dargestellt. Die Expression wurde auf die unbehandelten Sphären bezogen.

### 3.3.2.4.3 PCR Ergebnis zur Transfektion von organtypischen Kulturen

Nach Transfektion zeigt die PCR eine signifikante Erhöhung der miRNA-451 in den OTCs. Damit wurde gezeigt, dass das Mimic genauso von normalem Hirngewebe aufgenommen wird.



**Abbildung 3-18 qRT-PCR Ergebnis zur Transfektion der OTCs:** Dargestellt ist die miRNA-451 Expression 2 Tage nach Transfektion. Auch hier wurde das DY 547 Mimic als Scramble verwendet. Die Skala ist auch hier logarithmisch. Die Expression wurde in Relation zur unbehandelten OTC gesetzt.

## 4 Diskussion

Aufgrund der überaus schlechten Prognose bei der Glioblastom Erkrankung, trotz Radio/Chemotherapie, ist es überaus wichtig an neuen Therapiemöglichkeiten zu arbeiten. Derzeit sind die miRNAs in der gesamten Forschungswelt in den Focus gerückt. Dennoch besteht auch bei Bestätigung eines Effektes *in vitro* das Problem des therapeutischen Zugangs. Man muss bedenken wie man die miRNA verpackt und welcher Zugang z.B. intravenös, oral, intrathekal usw. effektiv und überhaupt technisch möglich ist. Diese Arbeit befasst sich dabei nur mit der Einbringung der miRNA in ein *in vitro* Modell. Gerade das Tet-System ist für den klinischen Einsatz völlig unbrauchbar und hat den Charakter eines reinen *in vitro* Systems. Das Lipofectin-System ist in seiner vorgestellten Form allerdings viel zu unspezifisch. Durch die Transduktion mit Lipofectinen wird die miRNA praktisch von jeder Zelle in hohem Maß aufgenommen, was einen systemischen Zugang erheblich erschwert. Auch eine Transfektion von Sphären auf einer OTC, also

eines Tumormodells, wäre bedenklich. Das miR-451 Mimic würde nämlich sowohl von den Tumorzellen als auch von den Zellen der OTC gut aufgenommen werden. Die Aufnahme des Mimics von Zellen der OTCs wurde in dieser Arbeit unter anderem auch gezeigt. Trotzdem ist dieses System mit geeigneter Modifikation für einen klinischen Einsatz denkbar. Durch die Modifikation der Oberfläche wie am Beispiel von Nanopartikeln (39) kann eine höhere Spezifität erzielt werden. Auch die Art der Applikation hat Einfluss auf die Aufnahme. Denkbar wäre z.B. eine Injektion in das Liquorsystem oder direkt in den Tumor selbst im Sinne einer Brachytherapie. Dafür ist allerdings noch weiterer Forschung notwendig. Es gibt aber durchaus schon vielversprechende Studien zur therapeutischen Anwendung von miRNAs. Das miRNA-122 Antagomir Miravisen ist derzeit in einer Phase 2 Studie. Miravisen hemmt miRNA-122, welche eine wichtige Rolle bei der Reproduktion des Hepatitis-C-Virus spielt (40).

Es bleibt zu erwähnen, dass es nicht Ziel dieser Arbeit war einen therapeutischen Nutzen der miRNA-451 nachzuweisen. Dies ist Gegenstand weiterer Forschung und wurde z.T. auch schon gezeigt (16, 21, 41).

In dieser Arbeit wurde ein effizientes Protokoll zur Kryopreservation von Hanging-Drop-Sphären gezeigt. Dieses Protokoll ist nahezu gleich dem Protokoll, welches auch für die einzelnen Zellen verwendet wird. Trotzdem ist aufgrund der morphologischen Anomalien bei aufgetauten Sphären dazu anzuraten, die Sphären frisch herzustellen. In dieser Arbeit konnte nicht untersucht werden warum sich die Zellmorphologie verändert hat. Eine Möglichkeit ist der Einfluss von DMSO auf die Zellen der Sphäre. DMSO wird im Einfriermedium verwendet und auch bei den Einzelzellen. Doch möglicherweise wird dieses nach Auftauen aus den Sphären nicht vollständig ausgewaschen. Der Einfluss von DMSO auf den Zellzyklus wurde bereits mehrfach beschrieben(42) (43). Hier wurde unter anderem gezeigt, dass DMSO einen Einfluss auf die Proliferation bestimmter Zellen hat. Die Proliferation wird dabei durch einen Zellzyklusarrest in der G1 Phase beeinflusst, unter anderem durch eine Inaktivierung von Rb-Kinasen wie den Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK4, CDK6). Die Differenzierung wird z.B. durch die Suppression bestimmter Marker wie CD20 erreicht. Aber welcher Grund auch immer für die veränderte Morphologie verantwortlich ist bleibt offen. Die Verbindung einer DiO-gefärbten Hanging-Drop Sphäre mit einer organotypischen Kultur ermöglicht eine ständige Beobachtung der Vorgänge, ohne

das Gewebe abzutöten. Es wurden hier zwei Methoden vorgestellt diese Verbindung durchzuführen. Wird die Sphäre auf eine organotypische Kultur aufgebracht welche bereits mit Plasma und Thrombin fixiert wurde zeigten sich schlechtere Ergebnisse als bei Verwendung einer frischen OTC (Abb. 3-4). Es konnte kaum ein Auswachsen von Tumorzellen aus der Sphäre beobachtet werden. Die liegt vermutlich daran, dass die Sphäre auf dem Plasma/Thrombin anwächst und nicht auf der OTC selbst. Es ist zu vermuten, dass die Tumorzellen diese Barriere nicht ohne weiteres überwinden können und die OTC selbst so gar nicht erreichen. Mit der zweiten Methode wurden weit bessere Ergebnisse erzielt (Abb. 3-5) Die Sphären wurden hier zusammen mit der OTC von Plasma/Thrombin fixiert. Dadurch hat die Sphäre auch einen direkten Kontakt zum Gewebe der OTC. Ein weiterer Vorteil besteht in der Möglichkeit eine große Anzahl davon herzustellen. Leider ist es aber nicht möglich einzelne migrierende Tumorzellen im Gewebe zu erkennen. Mit der Etablierung einer besseren Färbung oder mit einer Reduktion der Gewebedicke der OTC könnte dieses Problem womöglich gelöst werden. In diesem Modell könnte man die humanen Zellen beispielsweise mit human-spezifischen AKs anfärben. Dann könnte auch beurteilt werden wie schnell und weit eine Tumorzelle in einer bestimmten Zeit migriert. Selbstverständlich ist dieses Modell auch nur ein 2D-Modell, weshalb die Beurteilung von Migration und Proliferation räumlich eingeschränkt ist.

Es ist zu bemerken, dass es sich bei diesem Modell um eine Verbindung von menschlichen (A172 Zelllinie) und tierischen (Ratten-OTC) Gewebe handelt. Es ist zwar nicht zu erwarten, dass diese Tatsache Probleme verursacht, es ist aber auch nicht auszuschließen. Deshalb wäre es möglicherweise von Vorteil diese Methode auch mit einer Tumorzelllinie einer Ratte zu etablieren. Die Rattengliom Zelllinie C6TL wäre für einen solchen Ansatz denkbar (44). In den PCR Analysen zeigen sich bei allen Transfektionen signifikante Erhöhungen der miRNA-451. Das Lipofectin ist demnach effizient für die Einbringung von miRNA. Die Analyse der Hanging-Drop Sphären zeigt eine geringere Erhöhung der miRNA-451 als bei den Zellen. Möglicherweise ist das Mimic nicht fähig die Zellen im Inneren der Sphäre zu erreichen.

Die PCR an den OTCs zeigt eine sehr starke Erhöhung der miRNA-451 an. Dieser Versuch wurde jedoch aufgrund von Zeit und Materialmangel auch nur einmal durchgeführt. Ohnehin ist die Aussagekraft begrenzt, da die einzelnen OTCs

unterschiedlich zueinander sind und deshalb möglicherweise auch unterschiedlich viel miRNA-451 enthalten. Die PCR zeigt aber, dass Sphären die im Rahmen eines Tumormodells auf die OTCs aufgesetzt werden bereits transfiziert sein müssen. Denn sollte das gesamte Tumormodell mit Lipofektinen behandelt werden, so würden auch die OTCs große Mengen der miRNA-451 aufnehmen.

Das Tet-System zeigt keine signifikante Erhöhung der miRNA-451 in der PCR. Dieses System erwies sich als ineffizient und umständlich. Außerdem ist bis jetzt noch immer unklar warum nur ein Teil der transduzierten Zellen nach Induktion eine Fluoreszenz aufwies, obwohl diese Puromycin resistent und somit erfolgreich transduziert waren.

Obwohl in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass das Lipofectin-System einfacher und effizienter ist, sollte man das Tet-on System nicht gänzlich vergessen. Es wäre mehr Zeit erforderlich gewesen um dieses System zu etablieren und eine gute Effizienz zu erreichen. Das Tet-on System hätte *in vitro* durchaus Vorteile. Gerade bei dem vorgestellten Tumormodell wäre dessen Einsatz denkbar gewesen. Durch Aufbringen einer Hanging-Drop-Sphäre aus Tet451 transduzierten Zellen auf eine OTC wäre es möglich gewesen, die Tumorzellen mit Doxycyclin zu aktivieren ohne die Zellen der OTC zu beeinflussen.

Insgesamt ist eine Diplomarbeit zeitlich und ressourcentechnisch begrenzt. Viele Aspekte bedürfen weiterer Forschung. Doch vielleicht dient die Etablierung der hier vorgestellten Methoden zukünftiger Forschung als Basis und hilft so bei der Erarbeitung einer neuen Therapie für das Glioblastom.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Schirmer M. Neurochirurgie: Elsevier, Urban und Fischer; 2005.
2. Stupp R, Tonn JC, Brada M, Pentheroudakis G, Group EGW. High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2010 May;21 Suppl 5:v190-3. PubMed PMID: 20555079.

3. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American journal of pathology*. 2007 May;170(5):1445-53. PubMed PMID: 17456751. Pubmed Central PMCID: 1854940.
4. Larjavaara S, Mantyla R, Salminen T, Haapasalo H, Raitanen J, Jaaskelainen J, et al. Incidence of gliomas by anatomic location. *Neuro Oncol*. 2007 Jul;9(3):319-25. PubMed PMID: 17522333. Pubmed Central PMCID: 1907421.
5. Chaichana KL, Jusue-Torres I, Lemos AM, Gokaslan A, Cabrera-Aldana EE, Ashary A, et al. The butterfly effect on glioblastoma: is volumetric extent of resection more effective than biopsy for these tumors? *Journal of neuro-oncology*. 2014 Dec;120(3):625-34. PubMed PMID: 25193022. Epub 2014/09/07. eng.
6. David R. 13a: Glioblastom (WHO Grad IV) Universität Heidelberg; 2014 [updated 26.05.2014]. Available from: <https://eliph.klinikum.uni-heidelberg.de/neuro/265/glioblastom-who-grad-iv>.
7. Chen L, Xiao H, Xu L, Zou Y, Zhang Y, Xu M. A case study of a patient with gliosarcoma with an extended survival and spinal cord metastases. *Cell biochemistry and biophysics*. 2012 Mar;62(2):391-5. PubMed PMID: 22198898. Epub 2011/12/27. eng.
8. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen YW, Wolinsky Y, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2006-2010. *Neuro-Oncology*. 2013 Nov;15:1-56. PubMed PMID: WOS:000326045200001. English.
9. Shrieve DC, Alexander E, 3rd, Black PM, Wen PY, Fine HA, Kooy HM, et al. Treatment of patients with primary glioblastoma multiforme with standard postoperative radiotherapy and radiosurgical boost: prognostic factors and long-term outcome. *Journal of neurosurgery*. 1999 Jan;90(1):72-7. PubMed PMID: 10413158.
10. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense

complementarity to lin-14. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54. PubMed PMID: 8252621.

11. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004 Sep 16;431(7006):350-5. PubMed PMID: 15372042.

12. Yang JS, Maurin T, Robine N, Rasmussen KD, Jeffrey KL, Chandwani R, et al. Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010 Aug 24;107(34):15163-8. PubMed PMID: 20699384. Pubmed Central PMCID: 2930549.

13. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research*. 2014 Jan;42(Database issue):D68-73. PubMed PMID: 24275495. Pubmed Central PMCID: PMC3965103. Epub 2013/11/28. eng.

14. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research*. 2008 Jan;36(Database issue):D154-8. PubMed PMID: 17991681. Pubmed Central PMCID: PMC2238936. Epub 2007/11/10. eng.

15. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*. 2009 Jan;19(1):92-105. PubMed PMID: 18955434. Pubmed Central PMCID: PMC2612969. Epub 2008/10/29. eng.

16. Lv G, Hu Z, Tie Y, Du J, Fu H, Gao X, et al. MicroRNA-451 regulates activating transcription factor 2 expression and inhibits liver cancer cell migration. *Oncology reports*. 2014 Sep;32(3):1021-8. PubMed PMID: 24968707. Epub 2014/06/28. eng.

17. Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, Hannon GJ. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*. 2010 Jun 3;465(7298):584-9. PubMed PMID: 20424607. Pubmed Central PMCID: 2995450.

18. Yang JS, Lai EC. Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis in vertebrates. *Cell cycle*. 2010 Nov

15;9(22):4455-60. PubMed PMID: 21088485. Pubmed Central PMCID: 3048044.

19. Zhan M, Miller CP, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G, Song CZ. MicroRNA expression dynamics during murine and human erythroid differentiation. *Experimental hematology*. 2007 Jul;35(7):1015-25. PubMed PMID: 17588470. Pubmed Central PMCID: 1955220.

20. Bian HB, Pan X, Yang JS, Wang ZX, De W. Upregulation of microRNA-451 increases cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer cell line (A549). *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2011;30:20. PubMed PMID: 21329503. Pubmed Central PMCID: 3051912.

21. Nan Y, Han L, Zhang A, Wang G, Jia Z, Yang Y, et al. MiRNA-451 plays a role as tumor suppressor in human glioma cells. *Brain research*. 2010 Nov 4;1359:14-21. PubMed PMID: 20816946.

22. Wang R, Wang ZX, Yang JS, Pan X, De W, Chen LB. MicroRNA-451 functions as a tumor suppressor in human non-small cell lung cancer by targeting ras-related protein 14 (RAB14). *Oncogene*. 2011 Jun 9;30(23):2644-58. PubMed PMID: 21358675.

23. Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, Nuovo G, Palatini J, De Lay M, et al. MicroRNA-451 regulates LKB1/AMPK signaling and allows adaptation to metabolic stress in glioma cells. *Molecular cell*. 2010 Mar 12;37(5):620-32. PubMed PMID: 20227367. Pubmed Central PMCID: 3125113.

24. Schneider A, Spitkovsky D, Riess P, Molcanyi M, Kamisetti N, Maegele M, et al. "The good into the pot, the bad into the crop!"--a new technology to free stem cells from feeder cells. *PloS one*. 2008;3(11):e3788. PubMed PMID: 19023443. Pubmed Central PMCID: 2582950.

25. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *Journal of biotechnology*. 2010 Jul 1;148(1):3-15. PubMed PMID: 20097238.

26. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. 1973 Nov;51(5):1417-23. PubMed PMID: 4357758.
27. Gritti A, Galli R, Vescovi A. Cultures of Stem Cells of the Central Nervous System. In: Fedoroff S, Richardson A, editors. *Protocols for Neural Cell Culture*: Humana Press; 2001. p. 173-97.
28. Kapp RW, Jr., Eventoff BE. Mutagenicity of dimethylsulfoxide (DMSO): in vivo cytogenetics study in the rat. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*. 1980;1(2):141-5. PubMed PMID: 6119806. Epub 1980/01/01. eng.
29. Gahwiler BH. Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *Journal of neuroscience methods*. 1981 Dec;4(4):329-42. PubMed PMID: 7033675.
30. Gahwiler BH. Organotypic cultures of neural tissue. *Trends in neurosciences*. 1988 Nov;11(11):484-9. PubMed PMID: 2469173.
31. Honig MG, Hume RI. Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. *The Journal of cell biology*. 1986 Jul;103(1):171-87. PubMed PMID: 2424918. Pubmed Central PMCID: PMC2113786. Epub 1986/07/01. eng.
32. Corbel SY, Rossi FM. Latest developments and in vivo use of the Tet system: ex vivo and in vivo delivery of tetracycline-regulated genes. *Curr Opin Biotech*. 2002 Oct;13(5):448-52. PubMed PMID: WOS:000178387900007. English.
33. Kafri T, van Praag H, Gage FH, Verma IM. Lentiviral vectors: regulated gene expression. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2000 Jun;1(6):516-21. PubMed PMID: 10933976. Epub 2000/08/10. eng.
34. Callus BA, Mathey-Prevot B. Rapid Selection of Tetracycline-Controlled Inducible Cell Lines Using a Green Fluorescent-Transactivator Fusion Protein. *Biochemical and*

- Biophysical Research Communications. 1999 4/21/;257(3):874-8.
35. Davis HE, Rosinski M, Morgan JR, Yarmush ML. Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophysical journal*. 2004 Feb;86(2):1234-42. PubMed PMID: 14747357. Pubmed Central PMCID: 1303915.
36. Miyamoto-Sato E, Nemoto N, Kobayashi K, Yanagawa H. Specific bonding of puromycin to full-length protein at the C-terminus. *Nucleic acids research*. 2000 Mar 1;28(5):1176-82. PubMed PMID: 10666460. Pubmed Central PMCID: 102619.
37. Jones LJ, Yue ST, Cheung CY, Singer VL. RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: RiboGreen reagent characterization. *Anal Biochem*. 1998 Dec 15;265(2):368-74. PubMed PMID: 9882416. Epub 1999/01/12. eng.
38. Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology*. 2003 4/1/;65(7):1035-41.
39. Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2005 Jul;100(1):1-11. PubMed PMID: 16233845.
40. Gebert LF, Rebhan MA, Crivelli SE, Denzler R, Stoffel M, Hall J. Miravirsin (SPC3649) can inhibit the biogenesis of miR-122. *Nucleic acids research*. 2014 Jan;42(1):609-21. PubMed PMID: 24068553. Pubmed Central PMCID: 3874169.
41. Gal H, Pandi G, Kanner AA, Ram Z, Lithwick-Yanai G, Amariglio N, et al. MIR-451 and Imatinib mesylate inhibit tumor growth of Glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Nov 7;376(1):86-90. PubMed PMID: 18765229. Epub 2008/09/04. eng.
42. Teraoka H, Mikoshiba M, Takase K, Yamamoto K, Tsukada K. Reversible G1 arrest induced by dimethyl sulfoxide in human lymphoid cell lines: dimethyl sulfoxide

inhibits IL-6-induced differentiation of SKW6-CL4 into IgM-secreting plasma cells. *Experimental cell research*. 1996 Jan 10;222(1):218-24. PubMed PMID: 8549666. Epub 1996/01/10. eng.

43. Ponzio G, Loubat A, Rochet N, Turchi L, Rezzonico R, Farahi Far D, et al. Early G1 growth arrest of hybridoma B cells by DMSO involves cyclin D2 inhibition and p21[CIP1] induction. *Oncogene*. 1998 Sep 3;17(9):1159-66. PubMed PMID: 9764826. Epub 1998/10/09. eng.

44. Senner V, Sturm A, Hoess N, Wassmann H, Paulus W. In vivo glioma model enabling regulated gene expression. *Acta neuropathologica*. 2000 Jun;99(6):603-8. PubMed PMID: 10867792. Epub 2000/06/27. eng.

## 6 Appendix

### 6.1 Hergestellte Reagenzien

#### 1) Vollmedium

- 500ml Dulbecco's modified Eagles Medium (DMEM) (Sigma Aldrich)
- 55ml fetal bovine serum
- 5,5ml Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)
- 5,5ml P/S Puromycin/Streptomycin

#### 2) OTC-Medium

- 500ml Basal medium eagle (BME)
- 100ml Hank's balanced salt solution (HBSS)
- 100ml horse serum
- 2ml Glutamin
- 4ml Glucose 65%

#### 3) Phosphat-buffered-saline (PBS-Puffer)

- 80g NaCl
- 2g KCL
- 14,4g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$  (Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat)
- 2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Kaliumdihydrogenphosphat)

Wird anschließend auf 1L doppelt destilliertes Wasser aufgefüllt und mittels Zugabe von NaOH auf einen pH von 7,4 eingestellt. Für die Verwendung in der Zellkultur wurde dieser Puffer dann autoklaviert.

## 6.2 Auswertung der Sphärengrößen über das IMARIS-Programm (Siehe 3.1.2)

