

Aus der Universitätsklinik für Urologie Tübingen

**Etablierung eines Ex-vivo-Modellsystems  
aus Mikrotumoren der Prostata**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Stahl, Regina**

**2021**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Todenhöfer

2. Berichterstatter: Professor Dr. P. Loskill

3. Berichterstatter: Professor Dr. S. Liebau

Tag der Disputation: 11.11.2020

Für meine Eltern

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ALP	alkaline Phosphatase
ATCC	American Type Culture Collection
BD	Beckton Dickinson
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	Karzinom
CD	Cluster of differentiation
Cmax	maximale Plasmakonzentration
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
CTLA-4	cytotoxisches T-Lymphocyten assoziiertes Protein 4
Cy7	Cyanin 7
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRU	digital-rektale Untersuchung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FKS	fetales Kälberserum
GFL	Gesellschaft für Labortechnik
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GnRH	Gonadoliberin
h	Stunde
HBSS	Hank's balanced Salt solution
HE	Hämatoxylin Eosin
HLA	humanes Leukozyten Antigen

---

IFN $\gamma$	Interferon Gamma
IHC	Immunhistochemie
mAB	monoklonaler Antikörper
MEM	Eagle's Minimum Essential Medium
MRT	Magnetresonanztomographie
MT	Mikrotumor
PAP	prostataspezifische saure Phosphatase
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PSA	prostataspezifisches Antigen
RFU	Relative fluorescence units
RPE	radikale Prostatektomie
RPMI	Medium, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
TILs	tumorinfiltrierende Lymphozyten
TRUS	transrektaler Ultraschall der Prostata
UICC	Internationale Union gegen Krebs
ULA	Ultra low attachment
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
WHO	Weltgesundheitsorganisation

# INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung .....	9
1.1 Das Prostatakarzinom .....	9
1.1.1 Epidemiologie .....	9
1.1.2 Ätiologie .....	9
1.1.3 Anatomie.....	10
1.1.4 Diagnostik .....	11
1.1.5 Tumoreinteilung .....	14
1.1.6 Staging.....	16
1.1.7 Klinik .....	16
1.1.8 Therapie.....	17
1.2 Bisherige Ansätze .....	21
1.3 3D-Modelle.....	22
1.3.1 Allgemeine Grundlagen der 3D-Zellkultur.....	22
1.3.2 Sphäroide.....	23
1.4 Prostatakarzinom-Zelllinien .....	24
1.4.1 LNCaP .....	25
1.4.2 DU145.....	25
1.4.3 PC3-M.....	25
1.5 Zielsetzung.....	25
2. Material und Methoden.....	27
2.1 Material.....	27
2.1.1 Patientengewebe .....	27
2.1.2 Gerätschaften .....	28
2.1.3 Verwendete Lösungen, Medien und Substanzen .....	29
2.2 Methoden .....	34

---

2.2.1 Gewinnung der Mikrotumore .....	34
2.2.2 Vitalitätsfärbung .....	36
2.2.3 Hydrogelexperimente .....	36
2.2.4 Kokultur mit T-Lymphocyten.....	37
2.2.5 Kultivierung Zelllinien .....	37
2.2.6 Substanztestung .....	38
2.2.7 Substanztestung Mikroskopie.....	40
2.2.8 Histologische Untersuchung der Mikrotumore .....	42
2.2.9 Aktivitätsbestimmung TILs .....	49
2.2.10 Charakterisierung des T-Zell-Pools .....	50
2.3 Datenschutz .....	52
2.4 Ethikvotum.....	52
3. Ergebnisse .....	53
3.1 Patientenkollektiv .....	53
3.1.1 Altersverteilung .....	53
3.1.2 TNM-Klassifikation und Grading.....	54
3.1.3 PSA-Werte .....	55
3.2 Mikrotumorgewinnung .....	56
3.2.1 Mikrotumorgewinnung .....	56
3.2.2 Darstellung gewonnener Mikrotumore .....	58
3.2.3 Darstellung des Wachstums von Mikrotumoren in Hydrogel.....	59
3.2.4 Darstellung Mikrotumore in Kokultur mit TILs in Hydrogel .....	60
3.3 Sphäroidgewinnung aus Zelllinien .....	61
3.3.1 Darstellung gewonnener Sphäroide .....	61
3.4 Substanztests .....	63
3.4.1 CellTox™-Green-Cytotoxicity-Assay .....	63

---

3.4.2 Mikroskopier-Assay Zelllinie .....	65
3.4.3 Mikroskopier-Assay Patient .....	76
3.5 Histologie.....	80
3.5.1 Histologie Prostata .....	80
3.5.2 Histologie Zelllinie .....	81
3.5.3 Histologie Patient .....	83
3.6 Charakterisierung der TILs .....	87
3.6.1 ELISpot .....	87
3.6.2 FACS .....	92
4. Diskussion.....	94
4.1 Gewinnung von Mikrotumoren aus Prostatakarzinomgewebe.....	95
4.2 Substanztestungen an Mikrotumoren .....	96
4.3 Histologische Untersuchungen der Mikrotumore.....	99
4.4 Untersuchungen an tumorinfiltrierenden Lymphozyten .....	100
4.5 Limitierende Faktoren .....	102
4.5 Schlussfolgerung .....	103
5. Zusammenfassung.....	105
6. Abbildungsverzeichnis .....	107
7. Tabellenverzeichnis .....	111
8. Literaturverzeichnis .....	112
9. Anhang .....	117
9.1 Erklärung zum Eigenanteil .....	117
9.2 Danksagung .....	118
9.3 Lebenslauf .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 DAS PROSTATAKARZINOM

### 1.1.1 EPIDEMIOLOGIE

Es ist mit einem Anteil von 23% der häufigste maligne Tumor des Mannes und mit 11.900 Todesfällen im Jahr 2014 allein in Deutschland liegt es an dritter Stelle der tödlich verlaufenden Krebserkrankungen – das Prostatakarzinom [1]. Noch häufiger tödlich verlaufen maligne Lungen- und Darmerkrankungen. Nachdem die Zahl der neudiagnostizierten Prostatakarzinome bis 2010 auf ca. 65.800 kontinuierlich gestiegen ist, konnte in den letzten Jahren ein leichter Rückgang der Erkrankungsrate beobachtet werden. Doch auch im Jahr 2014 betrug die Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland noch 57.370. Ein 65 jähriger Mann hat damit ein Risiko von 5,9%, in den nächsten 10 Jahren an einem Prostatakarzinom zu erkranken [2]. In Anbetracht der steigenden Lebenserwartung stellt diese hohe Prävalenz gesundheitspolitisch und ökonomisch ein großes Problem dar. Im Jahre 2050 werden 37% der Bevölkerung Deutschlands über 60 Jahre alt sein [3], das sind 10% mehr als noch 2013. Im gleichen Maß wird auch die Erkrankungshäufigkeit des Prostatakarzinoms steigen. Durch Maßnahmen zur Früherkennung wie die regelmäßige digital-rektale Untersuchung der Prostata und das kontrovers diskutierte PSA-Screening wurde die Inzidenzrate beeinflusst [4]. Mit einer mittleren 5-Jahres-Überlebensrate von derzeit 93% ist die Prognose eines Prostatakarzinoms relativ günstig, doch auch nach Jahren treten noch Sterbefälle durch Rezidive auf [2].

### 1.1.2 ÄTIOLOGIE

Der größte Risikofaktor für die Entwicklung eines Prostatakarzinoms ist das Alter. Liegt das Erkrankungsrisiko im Alter von 45 Jahren noch bei 0,4%, steigt es im Alter von 65 Jahren auf 5,4% an. Das Risiko, jemals an einem Prostatakarzinom zu erkranken, liegt bei 11,8%, was ca. jedem achten Mann entspricht [5].

Doch auch die genetische Herkunft spielt eine Rolle [6]. Im internationalen Vergleich liegt die Erkrankungsrate in Deutschland im Mittel, es erkranken weniger Patienten als in den USA, Australien oder der Schweiz, aber trotzdem deutlich mehr als in den südeuropäischen Ländern und im asiatischen Raum. Untersuchungen haben gezeigt, dass Schwarzafrikaner doppelt so häufig erkranken wie Europäer.

Eine familiäre Disposition liegt ebenfalls vor, doch wahrscheinlich ist nur ein kleiner Teil (ca. 9%) der Tumore hereditär bedingt [7, 8]. Dies ist vor allem für den Patienten relevant, da sich das Risiko, ebenfalls zu erkranken, für erstgradig Verwandte verdoppelt. Sind mehrere Verwandten ersten Grades erkrankt, steigt das Erkrankungsrisiko weiter an.

Weitere Risiken für die Entstehung eines Prostatakarzinoms, wie auch für viele andere Krebsarten, sind Ernährung und Strahlenbelastung sowie eine chronische Entzündung der Prostata [9]. Entgegen vieler Erwartungen konnte noch kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines Prostatakarzinoms und dem Testosteronlevel eines Patienten hergestellt werden [10]. Da androgensensitive Prostatatumore in Anwesenheit von Testosteron jedoch deutlich schneller wachsen und ein Prostatakarzinom bei Eunuchen nicht auftritt, gelten Androgene zumindest als Tumorpromotor.

### **1.1.3 ANATOMIE**

Die Prostata ist ein kastaniengroßes, ca. 20g schweres Organ und gehört zu den akzessorischen Geschlechtsdrüsen des Mannes. Sie besitzt die Form einer umgekehrten Pyramide, dabei grenzt die Basis kranial an die Harnblase, der Apex weist nach kaudal. Dorsal grenzt die Prostata an das Rektum. Sie umschließt den Anfangsteil der Harnröhre, was bei einer Vergrößerung der Prostata zu Harnabflussstörungen führen kann. Die 30 – 50 tubuloalveolären Einzeldrüsen der Prostata münden in Ausführungsgängen rund um den Colliculus seminalis im Pars prostatica der Harnröhre und produzieren ein Sekret, welches 30% des Ejakulats ausmacht. Dieses Sekret besitzt einen pH-Wert von

6,4 und dient zur Verflüssigung des Ejakulats und fördert die Beweglichkeit und Befruchtungsfähigkeit der Spermien.

Innerviert wird die Prostata aus sympathischen Fasern des Plexus hypogastricus inferior und parasympathischen Fasern der Nervi splanchnici pelvici. Die arterielle Versorgung der Prostata erfolgt aus Ästen der Arteriae vesicalis inferior, pudendae interna und rectalis media. Der venöse Abfluss erfolgt über den Plexus venosus prostaticus in die Vena iliaca interna.

Im Querschnitt kann die Prostata in 3 Zonen, die periphere Zone, die Transitionalzone und die zentrale Zone, aufgeteilt werden. Der Hauptentstehungsort für Prostatakarzinome (90%) liegt in der peripheren Zone, die mit ca. 70% der Organmasse auch den größten Teil der Prostata ausmacht. Die Transitionalzone, die den proximalen Teil der Harnröhre umschließt, ist vor allem Entstehungsort der benignen Prostatahyperplasie, nur ca. 10% der Prostatakarzinome entwickeln sich hier.

#### **1.1.4 DIAGNOSTIK**

Ab dem 45. Lebensjahr können Männer die gesetzliche Früherkennung in Anspruch nehmen. Bei familiär vorbelasteten Männern zahlt die Krankenkasse schon ab dem 40. Lebensjahr diese Untersuchung. Je früher die Diagnose eines Prostatakarzinoms erfolgt, desto höher ist die Chance auf eine kurative Therapie. Dabei wird bei der digital-rektalen Untersuchung (DRU) mit dem Finger der Enddarm und dabei der rektumnahe Anteil der Prostata des Patienten ausgetastet. Mehrere Faktoren tragen jedoch dazu bei, dass diese Untersuchung nicht als alleinige Früherkennung ausreichend ist [11]. Erstens können nur große und oberflächliche Tumoren getastet werden, zweitens wird nicht die gesamte Prostata, sondern nur die rektumnahe periphere Zone erfasst und drittens ist sie stark von der Erfahrung des Untersuchenden abhängig. Trotzdem hat diese am wenigsten invasive Methode, gerade bei Patienten mit erhöhtem PSA-Wert, ihren Stellenwert.

Zusätzlich können Patienten das prostataspezifische Antigen (PSA) bestimmen lassen. Das PSA ist eine Serinprotease, welche zur Verflüssigung des Ejakulats

dient. Die Höhe des PSA-Spiegels im peripheren Blut wird durch die Menge des Prostatagewebes beeinflusst, aber auch durch mechanische Beanspruchung der Prostata durch Sport, sexuelle Aktivität oder medizinische Eingriffe. Grundsätzlich ist es kein Tumormarker, sondern ein Gewebemarker. Ein erhöhter PSA-Wert kann auf eine benigne Hyperplasie der Prostata, eine Prostatitis oder auf einen Tumor zurückzuführen sein. Der prädiktive Wert für einen Tumor liegt bei Werten über 4ng/ml bei 17-20%. Zwischen Werten von 4-10 ng/ml liegt eine diagnostische Grauzone, der Großteil der Biopsien führt nicht zum Tumornachweis. Erst ab einem PSA-Wert von über 10ng/ml liegt die Tumorstabilität bei über 50%; diese Tumoren sind dann aber meist nicht mehr lokal begrenzt, was die Relevanz des PSA-Werts als Früherkennung ebenfalls negativ beeinflusst [12, 13]. Eine höhere Genauigkeit zur Risikoabschätzung bietet die PSA-Verdopplungsgeschwindigkeit.

Der dritte Teil der Früherkennungsuntersuchung besteht aus dem transrektalen Ultraschall (TRUS) [14], mit dem die Prostata abgebildet und vermessen werden kann. Dazu wird dem Patienten in Linksseitenlage eine Endorektalsonde eingeführt. Es lässt sich hypoechogenes bis isoechogenes Tumorgewebe von normalem Drüsengewebe abgrenzen und dessen genaue Lage in der Prostata darstellen. Die Karzinomdetektionsrate kann mit dieser Methode zusätzlich zur DRU um mehr als 50% gesteigert werden.

Bei Verdacht auf ein Prostatakarzinom wird im weiteren Verlauf eine transrektale Stanzbiopsie durchgeführt. Dies erfolgt entweder TRUS-gesteuert oder MRT-gesteuert. Bei der TRUS-gesteuerten Biopsie werden systematisch insgesamt 10-12 Stenzen aus allen Zonen beider Prostatalappen entnommen. Sollte trotz dringendem Malignomverdacht auch nach 1-2 maliger Biopsie kein Karzinom nachgewiesen werden, wird die Saturationsbiopsie durchgeführt. Dabei werden 20-30 Stenzen entnommen. Eine gezieltere Methode, eine Biopsie zu entnehmen, stellt die MRT-gesteuerte Prostatabiopsie dar. Ein Radiologe markiert dabei auffällige Bereiche im MRT, die dann intraoperativ mit den Ultraschallbildern des Patienten fusioniert werden. So können die auffälligen Areale direkt biopsiert werden. Trotz der deutlich geringeren Anzahl entnommener Stenzen liefert die MRT-gesteuerte Prostatabiopsie gleich gute

---

Erkennungsraten der klinisch signifikanten Prostatakarzinome wie die systematische Biopsieentnahme. [15, 16].

### 1.1.5 TUMOREINTEILUNG

Wurde bei einem Patienten ein Prostatakarzinom diagnostiziert, gilt es, dieses für die weitere Therapieplanung zu klassifizieren. Der Großteil (85%) der Prostatakarzinome wächst in der peripheren Zone, der Rest in der Übergangszone. Ein zentrales Wachstum tritt sehr selten auf.

Um die Ausbreitung des Primärtumors zu erfassen, eignet sich das TNM-System der internationalen Union gegen Krebs (UICC) und der Weltgesundheitsorganisation (WHO) [17]. Der Tumor wird dabei anhand der Tumorausbreitung T, der lymphogenen Metastasierung N und der Fernmetastasen M eingeteilt.

Stadium	Primärtumor
<b>Tx</b>	Tumor nicht zu beurteilen
<b>T1</b>	Tumor nicht tastbar, nicht in bildgebenden Verfahren erkennbar, wird zufällig bei Prostatektomie bei benigner Prostatahyperplasie oder durch erhöhten PSA-Wert entdeckt
<b>T1a</b>	Tumor befällt weniger als 5% des Gewebes
<b>T1b</b>	Tumor befällt mehr als 5% des Gewebes
<b>T1c</b>	Diagnosestellung mittels Nadelbiopsie
<b>T2</b>	Tumor innerhalb der Prostata kapsel
<b>T2a</b>	Tumor befällt weniger als 50% eines Seitenlappens
<b>T2b</b>	Tumor befällt mehr als 50% eines Seitenlappens
<b>T2c</b>	Tumor befällt beide Seitenlappen
<b>T3</b>	Ausbreitung über Primärkapsel hinaus
<b>T3a</b>	Samenblasen sind nicht betroffen
<b>T3b</b>	Samenblasen sind mitbetroffen
<b>T4</b>	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen/Tumor ist nicht verschieblich
<b>Nx</b>	Keine Aussage zu regionären Lymphknotenmetastasen möglich
<b>N0</b>	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
<b>N1</b>	Metastasen in regionären Lymphknoten vorhanden
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen
<b>M1</b>	Fernmetastasen vorhanden
<b>M1a</b>	Metastasen in anderen, nicht regionären Lymphknoten
<b>M1b</b>	Knochenmetastasen
<b>M1c</b>	Metastasen in anderen Organen/Strukturen

**Tabelle 1** TNM-Klassifikation

Weitere wichtige Prognosefaktoren sind der PSA-Wert und der Gleason-Score, der die Differenzierung des Tumors beschreibt. Er wurde 1966 vom Pathologen Donald F. Gleason entwickelt. Es werden je nach Entdifferenzierung des Gewebes Punkte von 1 (gering) - 5 (stark) vergeben. Dann werden die Punkte des vorherrschenden und des am schlechtesten differenzierten Grades addiert. Dies ergibt den Gleason-Score. Dies gilt für eine Biopsie. Wird Gewebe nach Prostatektomie beurteilt, werden das häufigste und das zweithäufigste Muster addiert. Ein Score bis 4 beschreibt gut differenzierte Tumore, die häufig im Rahmen anderer Prostataoperationen entdeckt werden, ein Score von über 8 wird aggressiven, meist schon fortgeschrittenen Tumoren zugeordnet [17].

Gleason	Histologische Kriterien
1-2	Knoten scharf begrenzt Dicht gepackte, scharf begrenzte Drüsen Keine Stromainvasion
3	Knoten unscharf begrenzt Kleine aber diskrete, ungleichmäßige Drüsen Tumorfiltate in Stroma
4	Knoten unscharf begrenzt Fusionierte, wenig differenzierte Drüsen, oft ohne Lumen Unscharf begrenzte Tumorfiltate
5	Knoten unscharf begrenzt Keine klaren Drüsenformationen, zentrale Nekrosen Solide Tumormetastasen Weitere Veränderungen

**Tabelle 2** Gleason - Graduierung, modifiziert durch die International Society of Urological Pathology (ISUP) 2014 (Epstein et al., 2016)

### **1.1.6 STAGING**

Um nach Diagnosestellung eine Therapieplanung durchführen und eine Prognose stellen zu können, ist die Kenntnis über das Tumorstadium entscheidend. Grundlage für die Stadieneinteilung bildet beim Prostatakarzinom die TNM-Klassifikation. Zusätzlich werden Ergebnisse der DRU, des PSA-Werts, der Histologie (Gleason-Score) und weiterer diagnostischer Verfahren miteinbezogen. Anhand des PSA-Werts und des Gleason-Scores lässt sich die Risikoklassifizierung nach d'Amico vornehmen, die das Risiko einer frühzeitigen Metastasierung beschreibt.

Ein niedriges Risiko besteht für Tumore mit einem PSA-Wert  $\leq 10$  ng/ml und Gleason-Score  $\leq 6$ . Ein mittleres Risiko wird bei einem PSA-Wert zwischen 10-20 ng/ml und einem Gleason-Score von 7 angegeben. Als Hochrisikopatienten gelten Patienten mit einem PSA-Wert  $> 20$  ng/ml und Gleason-Score  $> 7$  [18]. Als weiterer Risikofaktor gilt der Anstieg des PSA-Werts im Jahr vor Beginn der Therapie. Als risikobehaftet gilt ein Anstieg von  $> 2$  ng/ml [19].

### **1.1.7 KLINIK**

Zu Beginn der Erkrankung ist das Prostatakarzinom in den meisten Fällen symptomlos. Es entsteht zu 90% in der peripheren Zone der Prostata und lässt sich gut von rektal ertasten, bereitet dem Patienten jedoch kaum Beschwerden. Erst bei einem Fortschreiten der Erkrankung können sich Beschwerden aus der Nähe der Prostata zu umliegenden Strukturen ergeben. Bei Einengung der Harnröhre kann es zu Miktionsstörungen mit erhöhtem Restharnvolumen kommen, bei Schädigung durch Druck auf die Nerven können Erektionsstörungen auftreten. Ist die Erkrankung noch weiter fortgeschritten, erfolgt die Metastasierung zunächst lymphogen über die regionären Lymphknoten der Fossa obturatoria und der Iliakalgefäße, später hämatogen vor allem in das Skelettsystem [20]. Die ossäre Metastasierung und damit verbundene Beschwerden können auch erstes Anzeichen der Erkrankung sein, die häufig als degenerative Erkrankung fehlgedeutet werden. Viszerale Metastasierungen sind beim Prostatakarzinom nicht die Regel.

### 1.1.8 THERAPIE

Je nach Tumoreinteilung wird nun über die weitere Therapie entschieden [21]. Bei niedrigem Risiko (PSA < 10 ng/ml, bis Gleason 6 bzw. einem Tumoranteil unter 50% in den Stanzylindern der Biopsie in maximal 2 von 10-12 Stanzen) empfiehlt man die Methode der aktiven Überwachung, insbesondere bei älteren Patienten mit einer Lebenserwartung von unter 10 Jahren. Dabei werden im Abstand von 3 Monaten regelmäßig der PSA-Wert bestimmt und eine DRU durchgeführt. Nach 12 Monaten wird eine nochmalige Stanzbiopsie empfohlen. Bei schnellerem Voranschreiten des Tumors werden weitere Schritte eingeleitet.

Patienten mit niedrigem Risikoprofil bis Gleason 7 kann die Low-Dose-Rate-Brachytherapie empfohlen werden [22]. Hierbei werden bis zu 80 radioaktive, sogenannte ‚Seeds‘ aus <sup>125</sup>Jod, <sup>103</sup>Palladium oder <sup>198</sup>Gold in die Prostata eingebracht. Die Position der Seeds wird anhand von 3D-Bildern genau berechnet, um die optimale Strahlendosis an den Tumor applizieren zu können.

Bei mittlerem bis hohem Risiko (ab PSA 10 ng/ml bzw. ab Gleason 7) empfiehlt die Leitlinie eine radikale Prostatektomie (RPE) mit Lymphadenektomie. Ein Jahr nach der OP waren 88% der Patienten kontinent, fast 40% litten jedoch unter einer mittleren bis schweren erektilen Dysfunktion. Die guten karzinomspezifischen Überlebensraten von 81-98%, je nach Tumorstadium, sprechen aber eindeutig für diese Methode [23].

Ähnlich gute Überlebensraten werden durch die perkutane Strahlentherapie erreicht. Dazu wird mit Hilfe eines CT eine Strahlendosis von ca. 74-80 Gy, verteilt auf 1,8-2 Gy pro Wochentag, verabreicht. Umliegende Strukturen werden geschont. Es konnten dadurch deutlich bessere Ergebnisse in Bezug auf die Inkontinenz erzielt werden. Trotzdem kommt es etwa gleich häufig zu einer posttherapeutischen Impotenz wie nach der RPE. Auch das Langzeitrisiko, einen sekundären strahleninduzierten Tumor zu entwickeln, steigt. Bei einer Lebenserwartung von unter 10 Jahren ist eine kurative Strahlentherapie mit adjuvanter Hormontherapie Mittel der Wahl. Die Strahlentherapie wird auch adjuvant nach RPE mit tumorpositiven Schnitträndern angewendet, und um das Auftreten von Metastasen zu verhindern eingesetzt [24, 25].

Um die Bestrahlung möglichst effizient zu gestalten, kann die perkutane Strahlentherapie mit der Afterload Brachytherapie kombiniert werden. Nach der Bestrahlung von außen werden kurzzeitig Hochdosisstrahlungsquellen an genau definierte Orte der Prostata eingebracht. Dies geschieht unter Ultraschallkontrolle mittels spezieller Hohlnadeln, durch die dann die Strahlungsquellen ins Gewebe eingebracht werden. Auf diese Weise werden die umliegenden Gewebe und Organe geschont, während die maximale Strahlendosis den Tumor erreicht.

Ein weiterer Ansatz zur Behandlung des Prostatakarzinoms ist die antiandrogene Therapie. Sie wird vor allem bei Patienten im fortgeschrittenem hormonsensitiven Stadium angewandt oder in Kombination mit Strahlentherapie oder RPE [26]. Da das Wachstum des Prostatakarzinoms testosteronabhängig ist, versucht man das Testosteronlevel auf Kastrationsniveau unter 0,2–0,5 ng/ml abzusenken. Dies kann durch eine chirurgische oder chemische Kastration erreicht werden. Die Orchidektomie ist allerdings mit großer psychischer Belastung für den Patienten verbunden, weshalb die chemische Methode bevorzugt wird. Man verwendet dazu am häufigsten GnRH-Analoga, weitere Möglichkeiten bestehen in GnRH-Antagonisten, nichtsteroidalen Antiandrogenen, Östrogenen oder Hemmern der Testosteronsynthese. Die Nebenwirkungen lassen sich auf den Hormonentzug zurückführen. Es kann zu Hitzewallungen, erektiler Dysfunktion, Gynäkomastie und verringerter Libido kommen und auch das Risiko für Osteoporose und Herzerkrankungen steigt.

Leider kommt es in vielen Fällen nach einiger Zeit zu einem Fortschreiten des Karzinoms unter antiandrogener Therapie. Hier kann mit einer Chemotherapie begonnen werden. Da das Prostatakarzinom sehr langsam wächst und dadurch schlecht mit Zytostatika behandelbar ist, kann durch die Chemotherapie keine Heilung, wohl aber eine Steigerung der Lebensqualität und eine Verlängerung der Überlebenszeit bewirkt werden. Die Leitlinie sieht eine dreiwöchige Gabe von Docetaxel in Kombination mit Prednisolon vor.

Docetaxel ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Taxane. Es bindet an den Mikrotubuliapparat der Zelle und verhindert dessen Depolimerisation, wodurch es zu einer Blockierung der Mitose der Zelle kommt. In vitro zeigte sich eine

zytotoxische Wirkung auf verschiedenste solide Tumoren wie Mammakarzinom, Ovarialkarzinom, Prostatakarzinom und Melanom. Die empfohlene Dosierung von Docetaxel beträgt  $75 \text{ mg/m}^2$  in Kombination mit Prednisolon für das Prostatakarzinom. In klinischen Studien konnten Plasma  $c_{\text{max}}$  – Werte von  $0,5\text{-}4 \text{ } \mu\text{g/ml} = 0,620 \text{ - } 5 \text{ } \mu\text{M}$  erreicht werden [27]. Wie viele andere Chemotherapeutika hat auch Docetaxel viele, teils schwerwiegende Nebenwirkungen. Bei rund 30% der Patienten mit Prostatakarzinom verursachte die Behandlung eine Neutropenie, außerdem kam es zu toxischen Auswirkungen auf Haut, Haare und Nägel und ca. 2% der Patienten entwickelten periphere Neuropathien [28].

Andere Therapieoptionen sind Cabazitaxel, ebenfalls ein Zytostatikum und Radium-223, welches sich vor allem in den Knochen anreichert und so durch Bestrahlung aus der Nähe das Wachstum von Knochenmetastasen hemmen soll.

Des Weiteren kann die Androgendeprivationsherapie zur maximalen Androgentherapie erweitert werden, indem medikamentös die Produktion von Testosteron wie Östrogen in der Nebenniere inhibiert wird. Dies geschieht unter Fortführung der Therapie mit GnRH-Analoga zusammen mit Abirateron oder Enzalutamid. Die optimale Sequenz der verschiedenen Optionen wird derzeit noch diskutiert.

Die Wirksamkeit von Enzalutamid entsteht durch die Hemmung des Androgenrezeptorsignalweges an 3 verschiedenen Stellen. Es hemmt kompetitiv die Bindung von Testosteron bzw. Dihydrotestosteron an den Androgenrezeptor, verhindert die Translokation aktivierter Rezeptoren in den Nukleus und inhibiert die Bindung an die DNA, sowie die Rekrutierung von Kofaktoren für die Transkription. Durch diese Behandlung verringert sich das Wachstum der Tumorzellen und es kann zum Zelltod kommen [29]. Enzalutamid wird als Dosis von  $160 \text{ mg}$  pro Tag oral als Kapsel verabreicht. In klinischen Studien konnten Plasma- $c_{\text{max}}$ -Werte von  $14.5 \pm 3.3 \mu\text{g/ml}$  bei  $150 \text{ mg}$  Tagesdosis erreicht werden [30].

Aktuell wurde untersucht, ob Docetaxel in Kombination mit der Androgendeprivationstherapie bereits im hormonsensitiven Stadium im Vergleich

zur alleinigen Androgendeprivationstherapie einen Überlebensvorteil bietet [31]. In 2 großen Studien wurde eine Verlängerung des Gesamtüberlebens um 14 Monate bei Kombination von Chemotherapie und Androgendeprivationstherapie beobachtet [32, 33]. Besonders groß war der Vorteil für Patienten im sehr fortgeschrittenen Stadium mit Knochen- und/oder viszerale Metastasen. Es deutet sich also ein Paradigmenwechsel an, und es stellt sich auch hier die Frage, welche Therapie für den Patienten in Frage kommt.

Ein neuer Ansatz in der Krebstherapie ist die Immuntherapie. In den USA ist zur Behandlung des Prostatakarzinoms seit 2010 der Impfstoff Sipuleucel zugelassen [34]. Dabei handelt es sich um dendritische Zellen des Patienten, die ex vivo mit einem kombinierten Protein aus prostataspezifischer saurer Phosphatase (PAP) und humanem Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierendem Faktor inkubiert wurden. Nach dem Ex-vivo-Kontakt der Zellen mit dem Antigen PAP werden die Zellen dem Patienten wieder verabreicht und sollen nun im aktivierten Zustand die Krebszellen erkennen, die in 95% der Karzinome ebenfalls das Antigen PAP exprimieren.

Ein weiteres Forschungsfeld in der Immuntherapie sind Checkpoint-Inhibitoren. Dazu zählen Ipilimumab und Nivolumab. Bei Ipilimumab handelt es sich um einen monoklonalen IgG-Antikörper gegen das Antigen 4 auf zytotoxischen T-Zellen (CTLA-4). CTLA-4 dient als Rezeptor zur Regulierung und Abschwächung der Immunantwort. Ipilimumab wirkt als Antagonist dieses Rezeptors, wodurch die T-Zell-Antwort hochreguliert wird. Derzeit ist Ipilimumab nur zur Behandlung des Melanoms zugelassen [35]. Doch auch Studien zur Behandlung des Prostatakarzinoms allein oder in Kombination mit anderen Therapien wie Docetaxel oder Bestrahlung zeigen erste Ergebnisse [36]. In bisherigen Studien mit Ipilimumab konnten allerdings noch keine zufriedenstellenden Ergebnisse erreicht werden [37]. Es kam zwar zur Senkung des PSA-Werts, brachte aber keinen Vorteil im Gesamtüberleben. Der größte Nutzen war für die Untergruppe der Patienten mit metastasiertem kastrationsresistentem Prostatakarzinom ohne viszerale Metastasen sichtbar. Bis zur etablierten Therapie liegt hier also noch ein weiter Weg. Bei Nivolumab handelt es sich ebenfalls um einen monoklonalen IgG-Antikörper gegen den PD-1-Rezeptor auf T-Zellen. Dadurch wird die

Interaktion dieses Rezeptors mit dem Liganden PD-L1 auf Karzinomzellen inhibiert. Die Bindung der Liganden würde normalerweise zu einer Inhibition des Immunsystems führen, was nicht stattfinden kann, wenn der Rezeptor durch Nivolumab blockiert ist. Natürlich ist dieses Prinzip nur dann wirksam, wenn die Tumorzellen PD-L1 exprimieren. In klinischen Studien zeigten Patienten mit Prostatakarzinom kein Ansprechen auf Nivolumab, es ist derzeit nicht zur Therapie des Prostatakarzinoms zugelassen. Es gibt jedoch erste Hinweise darauf, dass die immunmodulatorische Funktion einer antiandrogenen Therapie mit Enzalutamid die Wirkung einer Immuntherapie gegen PD-1-Rezeptoren fördern könnte [38].

## 1.2 BISHERIGE ANSÄTZE

Es wurden schon mehrere Versuche gemacht, ein Modell für das Prostatakarzinom zu etablieren. Allen voran stehen hier natürlich die Prostatakarzinom-Zelllinien [39]. Die im Vergleich zur Zahl der Neuerkrankungen verschwindend geringe Anzahl an etablierten Zelllinien kann die Heterogenität der verschiedenen auftretenden Mutationen jedoch nicht gut repräsentieren. Hinzu kommt, dass viele der Zelllinien androgenunabhängig sind, was die Testung von Therapien für Patienten mit hormonsensiblen Prostatakarzinom nicht möglich macht. Auch sind diese Zelllinien seit Jahren im Labor kultiviert und erlauben keine Aussage über das Therapieansprechen individueller Patienten. Ein großer Nachteil der Zelllinie ist auch deren Zweidimensionalität. Unter physiologischen Bedingungen wächst ein Tumor als dreidimensionale Struktur, wodurch chemische Gradienten und Zell-Zell-Interaktionen entstehen, dies wird in der Zellkultur nicht wiedergespiegelt. Die Zellen wachsen unnatürlich auf hartem Untergrund und die Architektur des Zellverbands geht verloren, wodurch sich die mechanischen und biochemischen Signale ändern und die Tumorzellen in vitro anders reagieren, als sie das im Körper tun würden.

Ein weiterer Ansatz ist das patientenabgeleitete Xenograft [40]. Hierbei werden thymusaplastischen Mäusen Tumorzellen injiziert. Dadurch kann das Wachstum

des Tumors im Organismus erforscht werden. Dieses Verfahren ist allerdings sowohl technisch sehr aufwändig wie auch zeitintensiv. Natürlich hat auch das Mäusestroma einen Einfluss auf das Tumorwachstum. Da die Mäuse durch das Fehlen des Thymus stark immunsupprimiert sind, was gewünscht ist, um keine Abstoßungsreaktion zu verhindern, kann der Einfluss des Immunsystems auf die Therapie und eine eventuelle Immuntherapie nicht erforscht werden. Des Weiteren zeigte sich, dass sich nach Implantation von Prostatakarzinomen in die Mäuse in einem hohen Anteil der Tiere ein Lymphom entwickelte, an welchem die Erforschung von Medikamenten gegen das Prostatakarzinom unmöglich ist [41]. Ein dritter Ansatz ist die Kultivierung als 3D-Modell.

### **1.3 3D-MODELLE**

#### **1.3.1 ALLGEMEINE GRUNDLAGEN DER 3D-ZELLKULTUR**

Im 3D-Modell werden Tumorzellen *in vitro* kultiviert, jedoch im Unterschied zur klassischen Zellkultur derart, dass sie im Zellverband wachsen können [42]. So kommt es zu den Gradienten von Sauerstoff, Nährstoffen, Stoffwechselprodukten und Signalmolekülen. Je nach Fragestellung gibt es verschiedene Ansätze, die Zellen zu kultivieren.

Vaira et al. kultivierten organotypische Scheiben des Krebsgewebes [43]. Hierzu wurde der Tumor in sehr dünne Scheiben geschnitten und dann auf einem Untergrund fixiert. Die Gewebestruktur konnte so sehr gut erhalten werden.

Alastair H. Kyle et al. schichteten mehrere Lagen Zellen aus Zellkultur übereinander, um so den Durchfluss und die Eindringtiefe von Chemotherapeutika zu bestimmen [44].

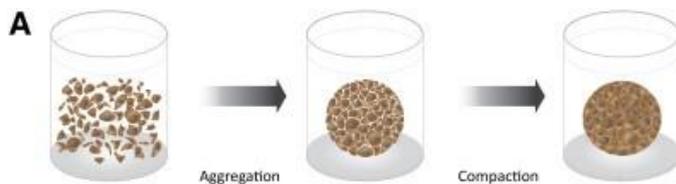
Claudia Fischbach et al. entwickelten ein 3-D-Tumormodell anhand eines Polymergerüsts, um das Tumorwachstum und die Angiogenesefaktoren im Vergleich zur 2-D-Zellkultur zu erforschen [45].

Und schließlich gibt es den Ansatz, den Tumor als sogenannte Sphäroide zu kultivieren. Diese Sphäroidkulturen haben gemein, dass der Tumor frei im Medium schwimmt und nicht anwächst, wodurch die runde Morphologie der Sphäroide möglich wird.

### 1.3.2 SPHÄROIDE

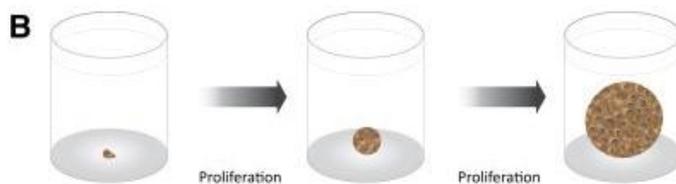
Es existieren zahlreiche Möglichkeiten, ein sphäroidähnliches Modell zu kultivieren. Da die Terminologie in der Literatur nicht einheitlich ist, hier ein kurzer Überblick über die gängigsten Methoden [46].

Schon in den frühen 70ern entwickelten Sutherland et al. die ersten Sphäroidkulturen, sogenannte multizelluläre Tumorsphäroide [47]. Dafür werden einzelne Zellen, meist aus Zellkultur stammend, unter Bedingungen kultiviert, in denen die Adhäsionskräfte zwischen den Zellen höher sind als zwischen den Zellen und dem Untergrund. Dadurch lagern sich die Zellen zusammen und formen Sphäroide.



**Abbildung 1** Einzelne Zellen aggregieren und bilden multizelluläre Tumorsphäroide aus Weiswald et al, *Spherical cancer models in tumor biology* [46]

Sogenannte Tumorsphären aus Tumorstammzellen wurden zum ersten Mal durch Singh et al. beschrieben [48]. Durch enzymatischen Verdau werden Zellen aus dem Tumor losgelöst. Durch Kultivierung in Stammzellmedium bilden sich aus den Tumorstammzellen Tumorsphäroide, wobei alle Zellen eines Sphäroids von einer einzigen Stammzelle abstammen.



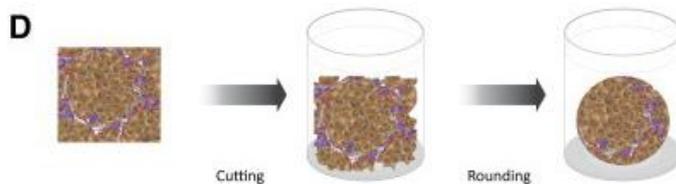
**Abbildung 2** Tumorstammzellen proliferieren und bilden Sphäroide aus Weiswald et al, *Spherical cancer models in tumor biology* [46]

Um multizelluläre organotypische Sphäroide zu erhalten, wird der Tumor des Patienten manuell zerkleinert und direkt mit Medium in Kultur gegeben. Nach einigen Tagen runden sich die Stücke ab und formen Sphäroide.



**Abbildung 3** Tumor wird zerkleinert und bildet im Medium Sphäroide aus Weiswald et al, *Spherical cancer models in tumor biology* [46]

Ganz ähnlich werden tumorgewebeabgeleitete Sphäroide hergestellt. Auch hier wird das Gewebe erst mechanisch zerkleinert, dann folgt allerdings noch ein enzymatischer Verdau [49]. Der Ansatz wird schließlich durch ein Zellsieb gefiltert und in Nährmedium kultiviert. Nach dieser Methode wurden auch die Prostatakarzinomproben aufgearbeitet. Da die Prostatakarzinom-Zellen jedoch keine komplett runden Sphäroide formen, wurde der Name Mikrotumore festgelegt. Die grundlegende Eigenschaft der Sphäroide, der frei im Medium schwimmenden 3D-Struktur, bleibt allerdings erhalten.



**Abbildung 4** Tumor wird zerkleinert und verdaut und bildet dann Sphäroide aus Weiswald et al, *Spherical cancer models in tumor biology* [46]

## 1.4 PROSTATAKARZINOM-ZELLINIEN

Zusätzlich zu den Tests an patientenabgeleiteten Mikrotumoren wurden Testungen an Sphäroiden, gebildet aus Zelllinien, vorgenommen.

### **1.4.1 LNCaP**

Die Zelllinie LNCaP wurde 1977 aus einer supraklavikulären Metastase eines Prostatakarzinoms gewonnen. Diese Zelllinie wächst wie die patientenabgeleiteten Mikrotumoren hormonsensitiv. [39]

### **1.4.2 DU145**

Die Zelllinie DU145 stammt aus einer Metastase des zentralen Nervensystems und gehört wie LNCaP zu den klassischen Zelllinien. Im Gegensatz zu dieser wächst sie allerdings androgenunabhängig.

### **1.4.3 PC3-M**

Die Zelllinie PC3-M stammt aus einer Knochenmetastase und wurde 1979 gewonnen. Auch sie wächst androgenunabhängig.

## **1.5 ZIELSETZUNG**

Aufgrund der diversen Therapiemöglichkeiten beim metastasierten hormonsensitiven wie auch beim metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinom stellt sich die Frage, welche Therapie für den individuellen Patienten die geeignete ist. Bisher fehlen sowohl klinische wie auch molekulare Marker, anhand derer das Therapieansprechen abgeleitet werden kann. Aufgrund der Komplexität von fortgeschrittenen Krebserkrankungen kann ein einzelner molekularer Marker kaum ausreichend sein. Zusätzlich variieren das lokale wie das systemische Umfeld von Patient zu Patient, und andere körpereigene Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten und Immunzellen beeinflussen das Tumorwachstum. Dies kann weder im Modell des Xenografts noch durch Zelllinien ausreichend nachgebildet werden. Folglich besteht ein großer Bedarf an einem präklinischen Modell, das die Nachahmung des Tumorwachstums im Patienten ermöglicht. Es wird nach einem schnellen und kosteneffizienten Modell gesucht, mit welchem innerhalb von 2 – 3 Wochen aus

patientenabgeleitetem Material eine Identifizierung individueller Therapieoptionen möglich ist.

Auch für die präklinische Forschung hätte die Etablierung eines solchen Modells einen hohen Nutzen. Bereits vor der klinischen Versuchsphase könnten Medikamente realitätsnah getestet werden. Dies erhöht die Effizienz des Testverfahrens, da sich schon deutlich früher abzeichnet, welches Medikament wirkungsvoll eingesetzt werden kann. Zusätzlich könnte durch ein Ex-vivo-Modell der Einsatz von Tierversuchen reduziert werden.

Den ersten Schritt dazu soll die Etablierung eines Ex-vivo-Modellsystems aus Mikrotumoren der Prostata legen. Im Modell des Mikrotumors bleiben die Charakteristika des Patiententumors erhalten und im natürlichen Tumor vorkommende Gradienten von z.B. Sauerstoff und Nährstoffen werden nachgeahmt. An diesem Modell sollen dann im zweiten Schritt Substanztestungen vorgenommen werden um das Ansprechen des Modells auf einzelne Wirkstoffe zu zeigen.

Zur genaueren Charakterisierung der Mikrotumore soll eine histologische Einbettung der Mikrotumore in Paraffin erfolgen. Diese Mikrotumore sollen dann sowohl HE als auch immunhistochemisch gefärbt werden. Es soll gezeigt werden, inwieweit der Verdau und die Kultivierung ex vivo den Tumor in seinen immunologischen Eigenschaften und seinem Erscheinungsbild verändern.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 PATIENTENGEWEBE

Zur Etablierung des Ex-Vivo Mikrotumormodells wurde Prostatakarzinomfrischgewebe verwendet. Dies wurde im Rahmen einer radikalen Prostatektomie (RPE) gewonnen. Sämtliche Gewebeproben stammen aus der Klinik für Urologie der Universitätsklinik Tübingen. Im Zeitraum vom 9.10.2017 bis zum 31.03.2018 wurden 18 Proben gewonnen. Bei Patienten mit histologisch gesichertem Prostatakarzinom erfolgte eine RPE, im Rahmen dessen wurde das benötigte Tumorgewebe entnommen. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 67,3 Jahre, (Minimum 53, Maximum 84 Jahre). Angaben zum TNM-Stadium, beziehungsweise zum Gleason-Score stammen aus der histologischen Aufarbeitung des Prostatektomiepräparates. Aus den erhaltenen Proben konnten aus 15 Tumoren Sphäroide gewonnen werden. Eine Übersicht über Eigenschaften der Patienten- und Karzinomcharakteristika liefert folgende Tabelle:

Probennummer	Patientenalter	TNM	Gleason	PSA
17.261	63	T2c	7	12
17.262	68	T2c	7	8,2
17.265	67	T2c	7	6,7
17.271	72	T2c	7	9
17.272	65	T3b	7	4,7
17.276	67	T2c	7	3,8
17.282		T2c	7	
17.293	74	T3a	7	6,8
17.314	72	T2c	9	4,5
17.315	58	T2c	7	5,5
18.005	77	T2c	8	19
18.002	74	T2c	7	6,9
18.024	70	T2c	7	16
18.025	59	T2c	7	7,3
18.033	57	T2c	7	5,4
18.047	84	T3b	9	12
18.048	53	T2a	7	16,4
18.049	69	T3a	9	36

**Tabelle 3:** Auflistung der Patientenprobendaten.

## 2.1.2 GERÄTSCHAFTEN

Abzug Captair:	Erlab, Frankreich
Cell Observer Spinning Disc Mikroskop:	Zeiss, Deutschland
Deckgläser:	Thermo Fisher Scientific, USA, Roth, Deutschland
Einbettenschälchen:	Tissue Tec, Sakura Finek, USA
Envision Multilabel Reader:	Perkin Elmer, USA
Erlenmeyerkolben steril:	Corning, USA
FACS Melody:	BD, USA
Feinwaage:	Mettler Toledo, USA
Großraum-Gefrierbehälter N2:	teclab GmbH, Worthington Industrie, USA
Inkubator:	Binder, Deutschland
Magnetrührer:	IKA Labortechnik, Deutschland
MikroCam:	Bresser, Deutschland
Mikroskop Axiophot:	Zeiss, Deutschland
Mikroskop Axiovert 200M:	Zeiss, Deutschland
Mikroskop Eclipse TE300:	Nikon, Japan
Mikroskop:	Nikon, Japan
Mikrowelle:	Sharp, Japan
Modulares Paraffineinbettssystem:	medite Medizintechnik, Deutschland
Multiwellplatten:	Corning, USA
Objektträger Strecktisch:	medite Medizintechnik, Deutschland
Objektträger:	Thermo Fisher Scientific, USA
Orbitalschüttler:	Neolab Deutschland
Paraffinstreckbad:	medite Medizintechnik, Deutschland
pH-Meter:	Mettler Toledo, USA
Pipetten:	Corning, USA
Pipetten:	Eppendorf, Deutschland

Röhrchen 15ml, 50ml:	greiner Bio one, Deutschland
Röhrchen:	Corning, USA
Rotationsmikrotom:	Leica Biosystems, Deutschland
Sepmate Röhrchen:	Stemcell, USA
Skalpell:	Schreiber Instrumente, Deutschland
Spritze:	Braun, Deutschland
Stereomikroskop:	Novex, Holland
Sterilbank HERAsafe:	Thermo Fisher Scientific, USA
Sterilfilter 0,45µm:	Corning, USA
Tiefkühltruhe -80°:	Sanyo, Japan
Waage:	Mettler Toledo, USA
Wärmeschrank Histologie:	Bachhofer, Deutschland
Wasserbad:	GFL, Deutschland
Zellkulturflasche 25ml, 75ml:	Corning, USA
Zellkulturflaschen Ultra low Attachment:	greiner bio one, Deutschland
Zellkulturplatte Ultra low Attachment:	Corning, USA
Zellsieb 0,5mm:	VWR, USA
Zellsieb 40µm:	BD Falcon, USA
Zentrifuge 5810R:	Eppendorf, Deutschland
Zentrifuge heraeus Instruments:	Thermo Fisher Scientific, USA
Zentrifuge Universal 2S:	Hettich, Deutschland

### 2.1.3 VERWENDETE LÖSUNGEN, MEDIEN UND SUBSTANZEN

#### Chemikalien:

Abirateronacetat 1mM:	Selleckchem, USA
Agar-Agar bakteriologisch:	Roth, Deutschland
Avidin Novocastra:	Leica, Deutschland
Biotin Lösung:	Leica, Deutschland
BSA: Albumin Fraktion 5:	Roth, Deutschland

---

Calcein AM:	Invitrogen, USA
Carboplatin 1mM:	Selleckchem, USA
Celltox green Dye:	Promega, USA
Choleratoxin:	Sigma Aldrich, Deutschland
Collagenase/Hyaluronidase:	Stemcell, USA
CV Mount:	Leica, Deutschland
Cytofix/Cytoperm Fixation: Permeabilization Kit	BD, USA
DAB Chromogen Novocastra:	Leica, Deutschland
DAB Substrate Buffer Novolink:	Leica, Deutschland
Dihydrotestosteron 1.0 mg/ml:	Sigma Aldrich, Deutschland
DMEM:	Gibco, Großbritannien
DMSO:	Roth, Deutschland
Docetaxel 1mM:	Selleckchem, USA
Dynabeads Human Activator: CD3 CD28	Thermo Fisher Scientific, USA
EDTA:	Roth, Deutschland
Enzalutamid:	Selleckchem, USA
Eosin:	Leica, Deutschland
Essigsäure:	Sigma Aldrich, Deutschland
Ethanol:	Roth, Deutschland
Ethidium Homodimer: 2mM in 1:4 DMSO:H2O	Invitrogen, USA
FKS:	Gibco, Großbritannien
Gelatine:	Sigma Aldrich, Deutschland
Glutamin:	Gibco, Großbritannien
HBSS:	Gibco, Großbritannien
Hematoxylin Novocastra:	Leica, Deutschland
Hematoxylin:	Leica, Deutschland
Histogel:	Thermo Fisher Scientific, USA
Histol:	Roth, Deutschland
Human IFN- $\gamma$ ELISpot <sup>PRO</sup> (ALP), strips:	Mabtech, Schweden

---

IL15:	Peprotech, USA
IL2:	Peprotech, USA
IL7:	Peprotech, USA
Ipilimumab:	Selleckchem, USA
Liberase:	Roche, Schweiz
Lymphoprep:	Stemcell, USA
MEM Vitamin:	Thermo Fisher Scientific, USA
Nivolumab 10mg/ml:	Bristol-Myers Squibb, USA
Normal Goat Serum:	Jackson Immuno Research, USA
Novo Pen:	Leica, Deutschland
PBS:	Gibco, Großbritannien
Pen-Strep:	Gibco, Großbritannien
Peroxidase Block Novocastra:	Leica, Deutschland
Primocin:	Invitrogen, USA
Primocin:	Invitrogen, USA
R1881 (DHT):	Sigma Aldrich, Deutschland
Renaissance essential Tumor Media:	Cellaria, USA
RETM Medium phenolrotfrei:	Thermo Fisher Scientific, USA
Roti Histofix 4%:	Roth, Deutschland
RPMI 1640:	Gibco, Großbritannien
Streptavidin-HRP Novocastra:	Leica, Deutschland
Supplement:	Cellaria, USA
Sytox Orange 5mMin DMSO:	Invitrogen, USA
Triton:	Roth, Deutschland
Trizma base:	Sigma Aldrich, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,05%:	Gibco, Großbritannien
IHC Staining Kit: Lab Vision™ UltraVision™ Detection System: anti-Polyvalent, AP	Thermo Fisher Scientific, USA

**Medien und Puffer:**Digestion Medium:

20 ml DMEM  
1% Pen-Strep  
430µl Liberase

Stammzellmedium:

500 ml Renaissance essential  
Tumor Media  
15ml Supplement  
125µl Cholera toxin,  
1ml Primocin

T-Zell-Medium:

500ml MEM Vitamin  
25ml FKS  
5ml Glutamin  
1ml Primocin

Medium DU145:

500ml DMEM  
5ml Pen-Strep  
50ml FKS  
5ml Glutamin

Färbepuffer FACS:

PBS

Medium LNCaP:

500ml RPMI 1640  
5ml Pen-Strep  
50ml FKS  
5ml Glutamin  
0,1nM R1881 (DHT)

Medium PC3-M:

500ml RPMI 1640  
5ml Pen-Strep  
50ml FKS  
5ml Glutamin

RETM-Medium phenolrotfreiTE-Puffer IHC:

1l destilliertes Wasser  
10mM Trizma base  
1mM EDTA

Blockin- Medium IHC:

50ml PBS,  
0,25% Triton (Roth)  
10% Normal Goat Serum  
10% FKS

**Zelllinien:**

DU145:	ATCC, USA
LNCaP:	ATCC, USA
PC3-M:	ATCC, USA

**Antikörper:**Erstantikörper IHC:

Human PSA	nsj Bioreagents, USA
Human KI-67	RD Systems, USA
Human KI-67	Dako, USA

Zweitantikörper IHC:

Biotin-SP (long spacer) AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson Immuno Research, USA
--	------------------------------

ELISpot:

Pos. Kontrolle: mAB CD3-2	Mabtech, Schweden
Detection Antibody: 7-B6-ALP	Mabtech, Schweden

FACS:

PE/Cy7 anti human CD4, SK3 Klon	Bioledgend, USA
FITC anti human CD8a	Bioledgend, USA
FITC anti human FOXP3	Bioledgend, USA
Zombie Violet Fixable Viability Kit	Bioledgend, USA

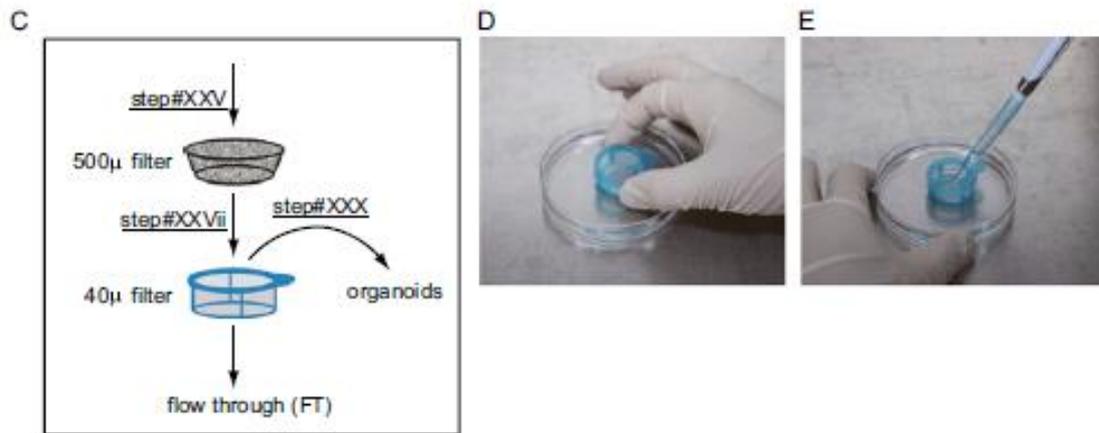
## 2.2 METHODEN

### 2.2.1 GEWINNUNG DER MIKROTUMORE

Sämtliche Mikrotumore wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert. Alle Arbeitsschritte wurden steril unter keimfreier Atmosphäre in einer Zellkulturwerkbank durchgeführt.

Die Gewinnung der Mikrotumore erfolgte am Tag der Operation nach dem modifizierten Protokoll zur Sphäroidgewinnung aus Colonkarzinom von Kondo et al. [49]. Das entnommene Prostatakarzinomfrischgewebe wurde sofort nach der Operation in Lagermedium gegeben und direkt zur Weiterverarbeitung ins Labor transportiert. Dort wurde das Lagermedium verworfen und die Probe mit 20ml HBSS gewaschen. Auch das Waschmedium wurde verworfen. Erneut wurden 20ml HBSS hinzugegeben und die Probe in eine 10cm-Kulturschale überführt. Dort wurden mithilfe einer Pinzette und eines Skalpells bei Bedarf nekrotische Teile entfernt und dann das Gewebe in ca. 1 mm große Stücke zerkleinert. Die Probe wurde mitsamt dem Medium in einem 50ml-Zentrifugenröhrchen 5 Minuten bei 4°C und 200g zentrifugiert. Diese Angaben gelten auch für sämtliche weiteren Zentrifugationsschritte. Das Medium im Überstand wurde nun verworfen, die Probe erneut mit 20ml HBSS gewaschen und wiederum zentrifugiert. Die Waschlösung wurde verworfen und das entstandene Pellet in 20ml des Verdaumediums resuspendiert. Dazu wurde noch frisch 430µl Liberase gegeben. Zum Verdau wurde alles in einem sterilen Kolben für 2h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Nach 2 Stunden wurde das Medium in ein 50ml-Röhrchen überführt und abzentrifugiert. Das Medium wurde verworfen und die Probe noch einmal mit 20ml HBSS gewaschen. Mithilfe eines Drahtgitters (Lochgröße 500µm) wurde die Probe gefiltert. Das Filtrat wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und abermals gefiltert, dieses Mal mit einem Zellsieb (Lochgröße 40µm). Der Durchfluss enthält tumorinfiltrierende Lymphozyten (TILs), diese wurden später weiterverarbeitet. Die Unterseite des Zellsiebs wurde in 20ml HBSS in einer 10cm-Kulturschale getaucht, um durch vorsichtiges Herumschwenken Ablagerungen, einzelne Zellen und Zellklumpen mit einem Durchmesser <40µm zu entfernen. Das Zellsieb wurde dann in eine

neue Kulturschale mit 30ml HBSS getaucht. Mithilfe einer 1000 $\mu$ l-Pipette konnten nun die im Sieb verbliebenen Mikrotumore gesammelt und in ein 15ml-Röhrchen überführt werden.



**Abbildung 5** Filtrationsschritte und Sammeln der Mikrotumore aus Kondo, J., et al., *Retaining cell-cell contact enables preparation and culture of spheroids composed of pure primary cancer cells from colorectal cancer* [49]

Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde die Probe mit 15ml HBSS gewaschen und abzentrifugiert. Das HBSS wurde entfernt und zu dem Pellet 4ml Stammzellmedium gegeben. Zu jedem Ansatz wurden zusätzlich noch 0,1nM Dihydrotestosteron (DHT) pipettiert. Die Mikrotumore wurden dann in 6cm Schälchen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage. Dazu wurden die Zellen in ein 15ml-Röhrchen überführt und abzentrifugiert. Das alte Medium wurde verworfen und 4ml neues Stammzellmedium und die entsprechende Konzentration an DHT auf die Zellen gegeben. Nach ca. 2 Tagen verdichteten sich die Mikrotumore und konnten für weitere Experimente eingesetzt werden.

Der Durchfluss mit den enthaltenen TILs wurde abzentrifugiert, in 500 $\mu$ l T-Zell-Medium resuspendiert und mit 400 $\mu$ l FKS und 100 $\mu$ l DMSO bei -80°C eingefroren und nach 1-2 Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

Aufgrund der geringen Anzahl an erhaltenen Mikrotumoren wurden verschiedene Abänderungen des Protokolls durchgeführt. Anstatt des zweistündigen Verdaus wurde das Gewebe 4h oder 16 h über Nacht verdaut. [50] Des Weiteren erfolgte

ein Verdau mit 1ml Collagenase/Hyaluronidase, einer Enzymmischung speziell für den Verdau von Prostata und Brustgewebe in 10ml Verdaumedium.

### **2.2.2 VITALITÄTSFÄRBUNG**

Zur Qualitätskontrolle wurde einige Tage nach der Präparation eine Vitalitätsfärbung mit anschließender konfokaler Lebendzellmikroskopie durchgeführt. Dazu wurden 150µl Medium mit Mikrotumoren entnommen und auf eine 96-Well-Platte überführt. Zu den Mikrotumoren wurde 2µM Calcein als Lebendzellfarbstoff und 4µM Ethidium Homodimer oder Sytox Orange in einer 1:1000 Verdünnung als Totzellfarbstoff gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden Bilder am konfokalen Mikroskop im Durchlichtkanal, GFP, und im Roten Kanal angefertigt.

### **2.2.3 HYDROGELEXPERIMENTE**

Aufgrund der geringen Anzahl an gewonnenen Mikrotumoren aus dem Patientenmaterial wurde nach einer Möglichkeit gesucht, Zellen des Patientengewebes in vitro auswachsen zu lassen. So sollten aus Einzelzellen Mikrotumore gewonnen werden, die dann in weiteren Experimenten eingesetzt werden können.

Dazu wurden die gewonnenen Mikrotumore im ersten Schritt in PBS gewaschen und in 1 ml Trypsin resuspendiert. Nach ca. 10 min waren fast alle Zellen vereinzelt und die Zellen wurden in PBS mit 2% FKS wieder aufgenommen, um den Verdau zu stoppen. Schließlich wurden die erhaltenen Einzelzellen wieder in Medium resuspendiert. Die Zellen wurden nun auf ein kurz vor der Marktreife stehendes Hydrogel gegeben, das den Zellen die Möglichkeit bieten sollte, in das Gel einzuwandern, dort auszuwachsen und neue Sphäroide zu bilden. Die Besonderheit dieses Hydrogels besteht in dessen Dichte, die vom Boden bis zur Oberfläche des Gels hin abnimmt und das Gel an der Oberfläche schließlich zu Wasser wird. Dadurch soll das Eindringen der Zellen erleichtert werden, ohne dass weitere Schritte zur Vorbereitung der Zellen notwendig sind. Um lebende Zellen sichtbar zu machen, wurden pro 150µl Medium pro Well 0,75µl CalceinAM

hinzugegeben. Das Verhalten und Einwandern der Zellen wurde mithilfe konfokaler Mikroskopie beobachtet.

#### **2.2.4 KOKULTUR MIT T-LYMPHOCYTEN**

Sowohl für die Kokultur von Mikrotumoren im Hydrogel wie für die FACS und ELISpot-Analyse der T-Zellen wurden tumorinfiltrierende T-Zellen (TILs) expandiert. Dazu wurden die eingefrorenen TILs aufgetaut und mitsamt Medium in ein 15ml-Röhrchen gegeben. Dazu wurde 3ml T-Zell-Medium gegeben und alles 5 min bei 300g zentrifugiert. Das Medium wurde verworfen. Zu 1ml des T-Zell Mediums wurde 1µl IL-2 (100 U/ml), 2µl IL-7 (10 U/ml) und 2,4µl IL-15 (23,8 U/ml) gegeben. Das bei der Zentrifugation entstandene Pellet wurde in 100µl des T-Zell-Mediums mit den Interleukinen aufgenommen und in ein Well einer 96-Well Platte überführt. Zusätzlich wurden 2µl (ca. 80000) CD3/CD28 Dynabeads zu den T-Zellen gegeben. Ein Mediumwechsel (50µl Mediumentnahme und Zugabe von 50µl neuem T-Zell-Medium) erfolgte alle 2 Tage. Nach 14 - 21 Tagen waren die T-Zellen soweit expandiert, dass sie in weiteren Experimenten eingesetzt werden konnten.

Um das Verhalten der T-Zellen in Kokultur mit den Tumorzellen und eine eventuelle Migration der T-Zellen zu den Tumorzellen zu beobachten, wurden die expandierten T-Zellen zu den Tumorzellen in das Hydrogel gebracht. Um die beiden Zellarten voneinander unterscheiden zu können, wurden die T-Zellen vor dem Einbringen in das Hydrogel mit Calcein red angefärbt. Die Kokultur wurde ebenfalls mithilfe konfokaler Mikroskopie beobachtet.

#### **2.2.5 KULTIVIERUNG ZELLINIEN**

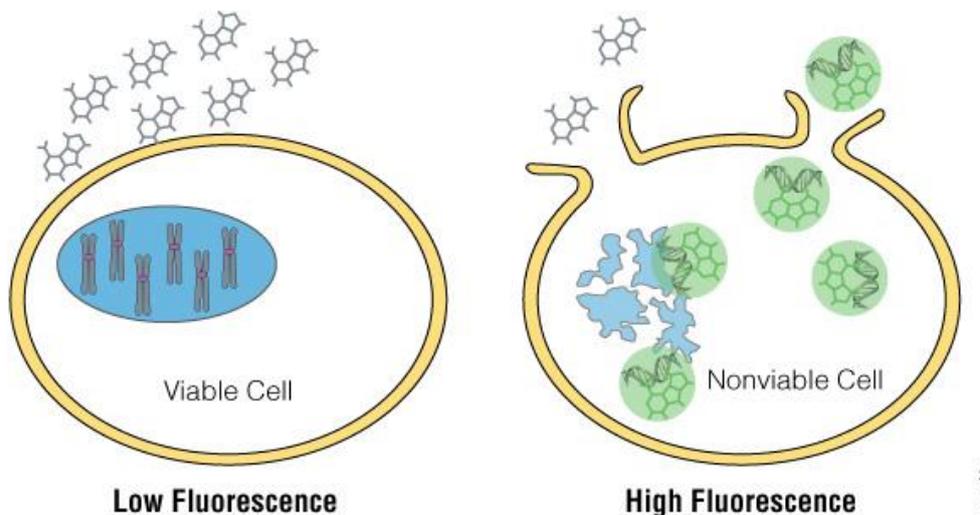
Die Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Begasung kultiviert. Alle Arbeitsschritte wurden steril unter keimfreier Atmosphäre in einer Zellkulturwerkbank durchgeführt.

Aufgrund der geringen Menge an Mikrotumoren aus Patientenmaterial wurden die Prostatakarzinomzelllinien DU145, PC3-M und LNCaP kultiviert, um im nächsten Schritt erste Substanztestungen an diesen durchzuführen. Die Zellen

wurden von ATCC bezogen. Die Anzucht erfolgte für DU145 in DMEM, für LNCaP und PC-3 in RPMI1640 mit jeweiligen Zusätzen. Die Zelllinien wurden zuerst in Zellkulturflaschen adherent angezüchtet. Je nach Zellwachstum wurden die Zelllinien alle 1 bis 3 Tage bei Semikonfluenz gesplittet. Dafür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5ml DMEM gewaschen. Nachfolgend wurden 2ml Trypsin auf die Zellen gegeben und die Zellkulturflasche einige Minuten inkubiert, bis sich die Zellen vom Untergrund lösten. Um die Trypsinreaktion abzustoppen, wurden 3ml Medium zugegeben und die Zellen 1:10 wieder ausgesät. Dazu wurden 15ml neues Medium zu den Zellen gegeben. Um aus den Zelllinien ebenfalls Sphäroide zu gewinnen, wurden die Zellen wie beim Splitten abgelöst und in Zellkulturflaschen mit zellabweisender Oberfläche weiter kultiviert. Nur die Zelllinien DU145 und LNCaP bildeten Sphäroide aus, daher wurden nur diese beiden Zelllinien weiterverwendet. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage. Dafür wurde das Medium mitsamt den enthaltenen Sphäroiden abzentrifugiert, das alte Medium verworfen und die Sphäroide in 5ml neuem Medium aufgenommen.

### **2.2.6 SUBSTANZTESTUNG**

Zur Quantifizierung der Sensitivität von Wirkstoffen auf die patientenabgeleiteten Mikrotumore sollte der CellTox™-Green-Cytotoxicity-Assay von Promega verwendet werden. Das Prinzip des Assays basiert auf der selektiven Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes Celltox Green in Zellen mit beeinträchtigter Integrität der Plasmamembran. Nach Aufnahme des Farbstoffes in die Zellen bindet dieser an die DNA und die Fluoreszenz erhöht sich um ein Vielfaches. In lebende Zellen kann der Farbstoff nicht eindringen. Die Erhöhung des Fluoreszenzsignals ist damit proportional zur Anzahl der toten Zellen und damit zur Zytotoxizität des Wirkstoffes



**Abbildung 6** Illustration zur Funktionsweise des CellTox™ Green Cytotoxicity Assays von Promega. Gezeigt wird der Farbstoff, der nicht in lebende sondern nur in tote Zellen eindringen kann. Dort bindet er an DNA und seine Fluoreszenz steigt stark an.

Aufgrund der geringen Anzahl an verfügbaren Mikrotumoren aus Patientenmaterial wurde der Assay im ersten Schritt mit Sphäroiden der beiden Zelllinien durchgeführt. Auf diese Weise sollte eine Konzentration des Medikaments ermittelt werden, bei der sich eine zytotoxische Wirkung auf die Zellen zeigt. Diese Konzentration sollte dann an den patientenabgeleiteten Mikrotumoren getestet werden.

Dazu wurden pro Well einer 96-Well-Platte 100µl phenolrotfreies RETM-Medium pipettiert und dazu die Celltox-Green-Dye in einer 1:1000 Verdünnung gegeben. In 50µl Medium wurden 10 - 15 Sphäroide der jeweiligen Zelllinie pipettiert. Schließlich wurde die jeweilige Behandlung dazugegeben. Die Ansätze erfolgten pro Konzentration in Triplikaten. Einen Überblick liefert folgende Tabelle:

<b>Docetaxel</b>	DMSO Kontrolle	0,5µM	1µM	1,5µM	2µM	4µM	10µM	20µM	Medium
<b>Carboplatin</b>	DMSO Kontrolle	1µM	2µM	4µM	10µM	20µM	40µM	80µM	Medium

**Tabelle 4** Überblick über verwendete Medikamente und Konzentrationen im Celltox-Green-Assay

Die Auswahl der Konzentrationen erfolgte dabei in Anlehnung an  $c_{max}$  –Werte, die in klinischen Studien im Patientenserum erreicht wurden. Diese waren für

Docetaxel Konzentrationen von 0,5 -4 $\mu$ g/ml = 0,62-5  $\mu$ M [27] und für Carboplatin Cmax: 14,3 $\mu$ g/ml = 38,5 $\mu$ M [30].

Die Zunahme der Fluoreszenz wurde nach 0h, 24, 48 und 120h an einem Mikroplatten-Reader gemessen.

### 2.2.7 SUBSTANZTESTUNG MIKROSKOPIE

Aufgrund der geringen Anzahl an Mikrotumoren aus Patientenmaterial konnte der CellTox™-Green-Cytotoxicity-Assay mit Patientenmaterial nicht durchgeführt werden. Um trotzdem die Zytotoxizität einzelner Wirkstoffe testen zu können, wurde ein Mikroskopieverfahren entwickelt. Dabei können anhand einer Lebend-Tot-Färbung einzelne Mikrotumore beobachtet werden. Um geeignete Konzentrationsbereiche für die zu testenden Medikamente zu finden, wurde ebenfalls im ersten Schritt mit den Zelllinien LNCaP und DU145 gearbeitet. Die gefundenen Konzentrationen wurden dann im zweiten Schritt für die Testung an Patientenmaterial verwendet.

Im ersten Schritt wurden jeweils die Zelllinien LNCaP und DU145 mit verschiedenen Konzentrationen der Medikamente Docetaxel und Enzalutamid getestet. Einen Überblick dazu liefert die Tabelle:

Enzalutamid	DMSO Kontrolle	0,5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2 $\mu$ M	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	20 $\mu$ M	Kontrolle
Docetaxel	DMSO Kontrolle	1 $\mu$ M	2 $\mu$ M	5 $\mu$ M	7 $\mu$ M	10 $\mu$ M	20 $\mu$ M	Kontrolle

**Tabelle 5** Überblick über verwendete Wirkstoffe und Konzentrationen im Mikroskopie-Assay

In den Assay-Ansatz wurden dazu in eine Ultra-Low-Attachment-Platte jeweils 150 $\mu$ l Mikrotumore gegeben. Diese wurden zuvor soweit verdünnt, dass sich pro Well 5 – 10 Mikrotumore befanden. Alle Konzentrationen wurden in Triplikaten pipettiert. Zu den Mikrotumoren wurden im nächsten Schritt 0,75 $\mu$ l CalceinAM und 1,5 $\mu$ l 1:10 verdünntes Sytox Orange gegeben. Noch vor Zugabe der Medikamente wurden im konfokalen Mikroskop Aufnahmen von 3 Mikrotumoren pro Well, also 9 Aufnahmen pro Konzentration als Z-Stack im Durchlicht, roten

und im grünen Kanal angefertigt um einen einheitlichen 0h Wert zu erhalten. Nach den 0h-Aufnahmen wurden die Medikamente hinzugefügt. Nach 24h, 48h, 72h und 96h wurden wiederum jeweils 9 Z-Stack Aufnahmen pro Konzentration angefertigt.

Im weiteren Verlauf wurde der Assay insofern abgeändert, als dass nicht zu Beginn alle Mikrotumore angefärbt wurden, sondern dass 3 komplette Ansätze an Tag 1 pipettiert wurden, von denen einer an Tag 1, der zweite an Tag 3 (48h) und der dritte an Tag 5 (96h) angefärbt wurde. Es wurden jeweils 5 wells pro Konzentration und Färbetag pipettiert.

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit Hilfe der Software ZEN lite 2012 sowie Fiji (ImageJ). Die Zelllinie DU145, die sehr einheitlich runde Sphäroide formt, wurde anhand der Größe der Sphäroide im Durchlichtkanal ausgewertet, da die Sphäroide klar abgrenzbar von den toten Zellen um das Sphäroid waren. Es zeigte sich jedoch, dass weder die Zelllinie LNCaP noch die meisten Patiententumoren anhand dieser Methode ausgewertet werden konnten, da sie über eine weniger homogene Struktur verfügten. Daher wurden die LNCaP-Sphäroide und die patientenabgeleiteten Mikrotumore anhand des Verhältnisses der Fläche toter Zellen zur Gesamtgröße des Sphäroids ausgewertet. Um gute Färbeergebnisse zu erhalten, wurde dazu in Anlehnung an Jenkins et al. [51] der Ansatz dreifach pipettiert und erst am Tag der Auswertung angefärbt.

Nach der Validierung des Mikroskopie-Assays anhand der Zelllinien wurde die Konzentration 10 $\mu$ M für Docetaxel und Enzalutamid bestimmt, bei der eine deutliche zytotoxische Wirkung sichtbar wurde. Diese Konzentrationen wurden dann bei patientenabgeleitetem Material verwendet. Auch mit den Mikrotumoren des Patienten wurden 3 Ansätze pipettiert, um sie an Tag 1, 3 und 5 zu färben, allerdings aufgrund der geringen Anzahl an Mikrotumoren nicht in Triplikaten. Zusätzlich wurde eine Kontrolle pipettiert. Die Auswertung erfolgte gleich wie bei den Zelllinien. Pro Zeitpunkt und Konzentration wurden 6 – 10 Mikrotumore ausgewertet.

### **2.2.8 HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DER MIKROTUMORE**

Um, zur genaueren Charakterisierung, alle Mikrotumore eines Patienten einzubetten, wurde das gesamte Medium mitsamt den Mikrotumoren durch ein 40µM-Zellsieb gegeben. Es folgten 2 Waschdurchgänge, wobei das Zellsieb jeweils einige Minuten in Schälchen mit DPBS gewaschen wurde. Nun wurde das Sieb in ein weiteres Schälchen mit Roti Histofix 4% gegeben und für 4h bei Raumtemperatur inkubiert. Um das Auffinden der Mikrotumore später zu erleichtern, wurden die fixierten Mikrotumore 5 min in Harris Hämatoxylin gefärbt. Danach wurde das Sieb 2x für jeweils 15 Minuten in 50%igem Alkohol und 2x für 15 Minuten in 70%igem Alkohol gewaschen. Um die Mikrotumore optimal einbetten zu können, wurden mehrere Methoden getestet.

Methode1: Das Histogel [52] wurde für 1-2 Minuten in der Mikrowelle erwärmt und ein Cryomold (TissueTec) bis zur Hälfte damit gefüllt. Um das Auffinden der Mikrotumore im Paraffinblock später zu vereinfachen, wurde in die Mitte des Blocks während des Abkühlungsprozesses ein Stempel gehalten. In das so entstandene Loch konnten dann die Mikrotumore gegeben werden. Dazu wurden sie unter dem Mikroskop in sehr wenig Volumen (3-4µl) aufgenommen und in das Loch im Histogel überführt. Sobald keine Flüssigkeit mehr im Histogel war, wurde das Cryomold mit weiterem Histogel vollgefüllt und zum Abkühlen in den Kühlschrank gestellt.

Methode 2: Die Mikrotumore wurden mit einer Pipettenspitze auf den Boden des Cryomolds überführt. Nachdem das Ethanol sich verflüchtigt hatte, wurde das zuvor erwärmte Histogel direkt auf die Mikrotumore gegeben. Sollten die Mikrotumore nicht am Boden bleiben, sondern im Gel schwimmen, wurden sie mit einer Pipettenspitze wieder auf den Boden gedrückt, um eine einheitliche Schicht mit Mikrotumoren zu bekommen. Zum Abkühlen wurde das Gel in den Kühlschrank gestellt.

Methode 3: Anstelle des Histogels wurde ein anderes Einbettmedium aus Agar und Gelatine genutzt [53]. Dazu wurde eine 4% w/v Lösung aus Agar und destilliertem Wasser (40°C) sowie eine 5% w/v Lösung aus Gelatine und destilliertem Wasser (40°C) hergestellt. Diese beiden Lösungen wurden 1:1

gemischt, um eine visköse Flüssigkeit mit 2% Agar und 2,5% Gelatine zu erhalten. Die Mikrotumore wurden auf den Boden des Cryomolds gegeben, kurz abgewartet, bis das Ethanol sich verflüchtigt hatte, und das Agargel daraufgegeben.

Sobald das Gel abgekühlt war, konnte es aus dem Cryomold in eine Histokassette gedrückt werden. Die Lagerung der Kassette erfolgte in 70%igem Alkohol.

Um den Gelblock in Paraffin einbetten zu können, wurden folgende Prozessierungsschritte durchgeführt:

#### Fixierung

Histofix	1:00h
Histofix	1:00h

#### Entwässerung

70% Ethanol	0:45h
90% Ethanol	0:45h
100% Ethanol	0:45h
100% Ethanol	0:45h
100% Ethanol	0:45h
100% Ethanol	1:00h

#### Clearing

Histol	0:45h
Histol	1:00h

#### Infiltration

Paraffin (60°C)	Über Nacht
-----------------	------------

Nach der Infiltration des Paraffins über Nacht konnte der Block am nächsten Tag in den Paraffinblock eingebettet werden. Von diesem Block wurden 5µm dicke Schnitte angefertigt und diese auf Objektträger gezogen. Unter einem Stereomikroskop wurde das Vorhandensein der Mikrotumore kontrolliert und deren Position markiert.

Im nächsten Schritt erfolgte die Färbung der Mikrotumore mit Hämatoxylin und Eosin. Dazu wurden die Objektträger für 30 min bei 60°C inkubiert, um das Paraffin zu schmelzen. Es folgten die Schritte:

Entwachsen:

Histol	3:00 min
Histol	3:00 min
100% Ethanol	2:00 min
100% Ethanol	2:00 min
90% Ethanol	2:00 min
70% Ethanol	2:00 min

Leitungswasser	2:00 min
Destilliertes Wasser	0:30 min

Färbung:

Harris Hämatoxylin	2:00 min
Leitungswasser	3:00 min
Essigsäure 2%	2:00 min
Leitungswasser	4:00 min
90% Ethanol	2:00 min

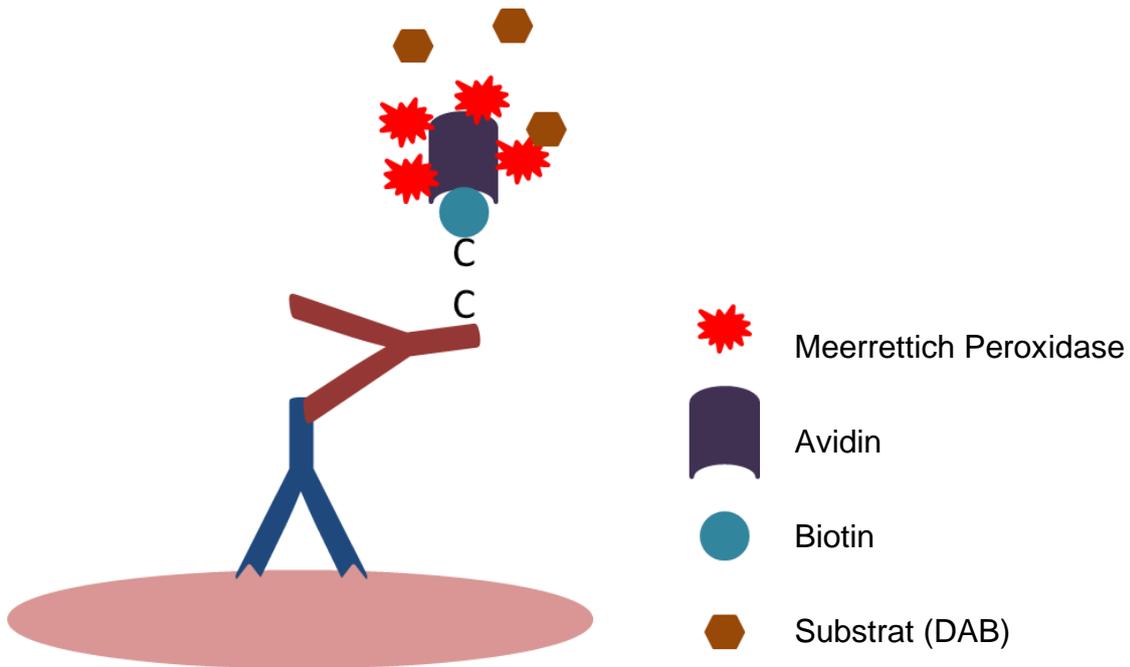
Eosin	2:00 min
Leitungswasser	0:15 min

## Dehydratisierung:

90% Ethanol	1:00 min
100% Ethanol	1:00 min
100% Ethanol	2:00 min
Histol	2:00 min
Histol	2:00 min

Im Anschluss wurden die gefärbten Mikrotumore mit CV Mount eingedeckelt und unter dem Mikroskop betrachtet.

Des Weiteren wurde an anderen Schnitten eine immunhistochemische Färbung der Mikrotumore vorgenommen. Es handelt sich dabei um ein Verfahren, bei dem Antikörper an Epitope auf dem Gewebe binden und diese somit sichtbar gemacht werden können. Es wurde dazu die Labelled-Streptavidin-Biotin-Methode verwendet [54]. Bei dieser Methode bindet ein Primärantikörper an das Epitop auf dem Gewebe. An diesen Primärantikörper bindet ein Sekundärantikörper, an den, um es besser erreichbar zu machen, über einen Kohlenstoffarm Biotin gebunden ist. Dieses Biotin bindet an Streptavidin, an welches direkt die Peroxidase gekoppelt ist. Durch die direkte Kopplung bleibt der Komplex klein, auch wenn viel Enzym an das Streptavidin gekoppelt wird. Dies trägt zur erhöhten Sensitivität dieser Methode bei. An ein Biotin können mehrere Streptavidinkomplexe binden, auch dies trägt zur Erhöhung der Sensitivität bei.



**Abbildung 7** Illustration der immunhistochemischen Färbemethode. Eigene Darstellung.

Um die Schnitte zu färben, wurden die Objektträger 30 min bei 60°C inkubiert um das Paraffin zu schmelzen. Es folgte wieder die Entwachsungsreihe:

Histol	3:00 min
Histol	3:00 min
100% Ethanol	2:00 min
100% Ethanol	2:00 min
90% Ethanol	2:00 min
70% Ethanol	2:00 min
Leitungswasser	Bis zur Weiterverarbeitung

Zur Wiederherstellung der Epitope wurden die Objektträger 20 min in 95-98°C warmem Puffer (10mM Tris/ 1mM EDTA, ph 9.0) inkubiert. Nach der Inkubation konnten die Objektträger in deionisiertem Wasser auskühlen. Es folgten 2 Waschschrte in deionisiertem Wasser für jeweils 2 min.

Mithilfe des NovoPen wurde der Bereich, auf dem sich die Mikrotumore befanden, eingekreist. Der Novopen enthält ein hydrophobes Reagenz, welches es ermöglicht, mit einem möglichst geringen Volumen an Antikörpern zu arbeiten, da diese nicht aus dem „Ring“ um die Mikrotumore herauslaufen können.

Um eventuell endogen vorhandene Peroxidase zu neutralisieren, wurde der Peroxidaseblock für 5 min auf die Schnitte gegeben. Es folgten 2 Waschschriffe in PBS für jeweils 2 min.

Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern, wurden 4 Tropfen der Avidinlösung zu jedem ml des Blockierungsmediums (PBS + 0,25% Triton X-100 + 10% Normal-Goat-Serum) gegeben und je nach Größe des zu färbenden Areal 300 – 500µl auf die Probe pipettiert. Es folgte eine Stunde Inkubation in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Dann folgten 2 Waschschriffe in PBS für jeweils 2 min.

Nun wurde der primäre Antikörper auf die Probe gegeben. Dazu wurde dieser in PBS mit 1% BSA verdünnt.

Es wurden Antikörper gegen PSA und KI67 verwendet. Bei KI67 handelt es sich um einen Proliferationsmarker, durch den teilungsaktives Gewebe sichtbar gemacht werden kann. Der PSA-Antikörper wurde in einer Konzentration von 1µg/ml und der KI67-Antikörper in einer Konzentration von 5µg/ml eingesetzt. Zusätzlich zu dem Antikörper wurden 4 Tropfen Biotin/ml hinzugegeben, um freie Bindungsstellen des Avidins, welches zum Blockiermedium gegeben wurde, zu blockieren. Die Schnitte wurden nun über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Am nächsten Tag folgten 2 Waschschriffe in PBS für jeweils 2min.

Nun wurde der Zweitantikörper auf die Probe gegeben. Dazu wurde der Zweitantikörper (Goat Anti-Mouse bzw. Goat Anti-Rabbit) 1:500 in PBS + 1%BSA verdünnt und jeweils 500µl auf einen Schnitt pipettiert. Die Schnitte mit dem Zweitantikörper wurden 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert.

Es folgten 2 Waschschriffe in PBS für jeweils 2min

Es wurden einige Tropfen Streptavidin-Meerrettichperoxidase auf die Schnitte gegeben und diese für 5 min inkubiert.

Es folgten 2 Waschschrte in PBS für jeweils 2 min.

Um die Färbung zu entwickeln, wurde das in DAB-Substrat-Puffer 1:20 verdünnte DAB-Chromogen auf die Schnitte gegeben und diese für 5 min inkubiert.

Es folgte ein Waschschrte in deionisiertem Wasser.

Um die Zellkerne und die Gewebestruktur sichtbar zu machen, erfolgte nach der immunhistochemischen Färbung noch eine Gegenfärbung mit Hematoxylin. Dafür wurden einige Tropfen des Novocastra Hematxylin auf die Schnitte gegeben und diese 5 min inkubiert.

Nun wurden die Schnitte 5 min in Leitungswasser gewaschen und es folgte die Dehydrationsreihe:

70% Ethanol	1:00 min
90% Ethanol	1:00 min
100% Ethanol	1:00 min
Histol	1:00 min

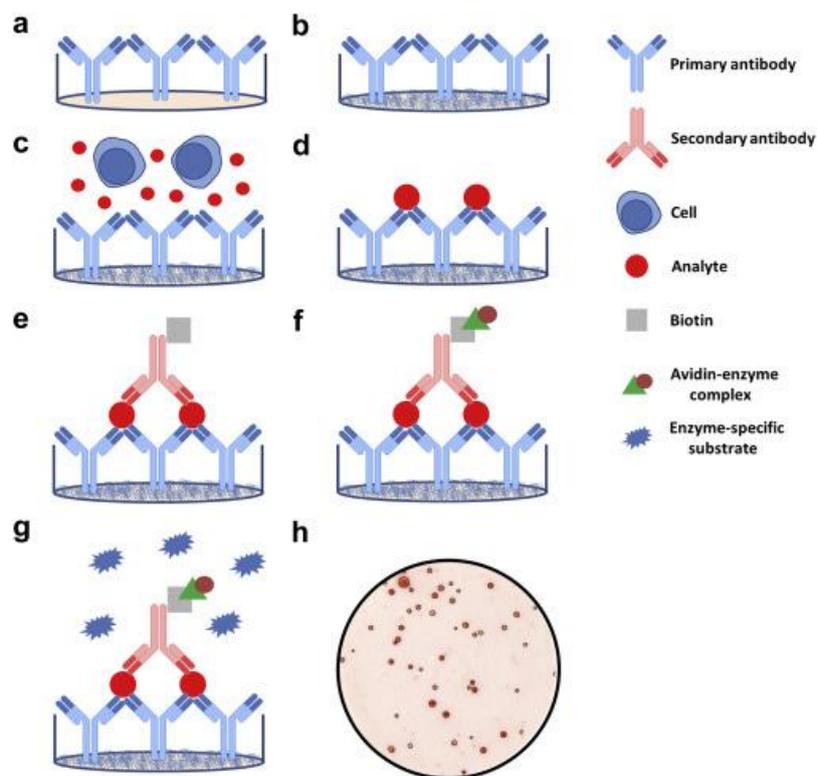
Im Anschluss wurden die gefärbten Mikrotumore mit CV Mount eingedeckelt und unter dem Mikroskop betrachtet.

Zur Färbung von KI67 wurde außer der genannten Schritte noch ein Kit verwendet. Hierzu wurde das Gewebe wie beschrieben deparaffiniert und rehydriert, 2 mal in PBS gewaschen und mit dem im Kit enthaltenen Ultra-V-Block 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Dann wurde der KI67-Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 dazugegeben und die Schnitte über Nacht bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Schnitte wurden 4 mal in PBS gewaschen und mit dem Biotinylated Goat-Anti-Polyvalent-Reagenz (Kit, Thermo Fisher) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren 4 Waschschrten in PBS wurde das Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Reagenz (Kit, Thermo Fisher) auf die Schnitte gegeben

und diese wiederum für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde wieder 4 mal in PBS gewaschen und die Färbung mit dem im Kit mitgelieferten Chromogen entwickelt. Schließlich wurde die Probe wie zuvor beschrieben eingedeckelt.

### 2.2.9 AKTIVITÄTSBESTIMMUNG TILS

Zur genaueren Charakterisierung der T-Zellen wurde deren Aktivität mittels ELISpot bestimmt. Der ELISpot basiert auf dem Nachweis von Zytokinen, die von aktivierten T-Zellen sekretiert werden. Er erfolgt auf mit Antikörpern beschichteten Membranen in einer 96-Well-Platte, an die die Zytokine binden. Im nächsten Schritt bindet ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper an das Zytokin. Nach Zugabe des Substrats werden dunkle Punkte auf der Membran sichtbar. Diese Punkte repräsentieren jeweils eine zytokinsekretierende Zelle. In diesem Assay wurde das Zytokin IFN $\gamma$  nachgewiesen, welches T-Zellen nach Antikörperkontakt sekretieren und das sowohl immunstimulierende wie antitumorale und antivirale Eigenschaften besitzt.



**Abbildung 8** Prinzip des ELISpot-Assays aus Möbs, C. et al, *Research Techniques Made Simple: Monitoring of T-Cell Subsets using the ELISPOT Assay* [55]

Für den Assay wurde das Human IFN $\gamma$  ELISpot Kit von Mabtech verwendet. Der Ansatz erfolgte jeweils in Triplikaten. Die beschichteten Wells wurden 4x mit PBS gewaschen und 30 min mit T-Zell-Medium inkubiert. Danach wurden pro Well 2000 – 3000 T-Zellen und ca. 10 Mikrotumore gegeben. Zur Kontrolle wurden in einen Ansatz nur T-Zellen ohne Mikrotumore und in einen Ansatz nur Medium pipettiert. In weitere Wells wurden noch die Checkpoint-Inhibitoren Nivolumab (50 $\mu$ g/ml) und Ipilimumab (20 $\mu$ g/ml) sowie eine Kombination der beiden pipettiert. Als Positivkontrolle diente der im Kit enthaltene mAb CD3-2 in einer Verdünnung von 1:1000. Die Platte wurde ca. 18h bei 37°C und 5% CO $_2$  inkubiert und dann 5x mit PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper 7-B6-ALP wurde 1:200 in PBS mit 5% FKS verdünnt. Davon wurden 100 $\mu$ l zu jedem Well gegeben und für weitere 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten weitere 5 Waschdurchgänge mit PBS. Die Substratlösung wurde durch einen 0,45 $\mu$ m-Filter gefiltert und 100 $\mu$ l zu jedem Well gegeben. Nach ca. 10 min wurden deutliche Punkte sichtbar, und die Entwicklung wurde durch Abwaschen mit Leitungswasser abgestoppt. Nach der vollständigen Trocknung wurden die Punkte mittels eines Stereomikroskops ausgewertet.

Aufgrund der geringen Anzahl an Mikrotumoren pro Patient wurden für den ELISpot zwar T-Zellen des Patienten verwendet, jedoch wurden anstelle der Mikrotumore dieses Patienten Sphäroide der Zelllinie LNCaP eingesetzt.

### **2.2.10 CHARAKTERISIERUNG DES T-ZELL-POOLS**

Zur weiteren Charakterisierung des T-Zell-Pools erfolgte eine FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) - Analyse des T-Zell-Pools. Bei dieser Analysemethode werden die Zellen in einem Strom aus Flüssigkeit einzeln an einer Laserquelle mit definierter Wellenlänge vorbeigeführt. Durch ihre Größe, Form und Färbung lenken die Zellen die Photonen des Lasers unterschiedlich ab. Diese können dann aufgefangen und analysiert werden und dadurch Aussagen über Charakteristika der Zelle getroffen werden. Durch fluorochromgekoppelte Antikörper können zusätzlich bestimmte Moleküle der Zelle angefärbt werden. Nach Anregung der Fluorochrome durch das Laserlicht fluoreszieren

diese. Diese Fluoreszenz kann von Kollektoren aufgefangen und analysiert werden. Dadurch können verschiedene Zellpopulationen unterschieden werden.

Im Experiment wurden die Oberflächenmarker CD4 und CD8 angefärbt, zusätzlich erfolgte eine intrazelluläre Färbung für FOXP3, einem Protein spezifisch für regulatorische T-Zellen. Schließlich erfolgt noch eine Lebend-Tot-Färbung.

Die Färbung erfolgte in 2 Ansätzen. Im Ansatz 1 wurden CD4, CD8 und der Lebend-Tot-Marker gefärbt. Dazu wurden 1.000.000 Zellen in PBS mit 10% FKS aufgenommen, gewaschen und in PBS ohne FKS resuspendiert. Zur Färbung der toten Zellen wurde die Zombie Violet Dye in einer Verdünnung von 1:1000 hinzugegeben und 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS mit 10% FKS wurden die Antikörper gegen CD4 und CD8 hinzugegeben, jeweils 5µl/100µl Flüssigkeit bzw 5µl/1.000.000 Zellen. Es folgte eine 30minütige Inkubation bei 4°C im Dunkeln. Nach 2 weiteren Waschschritten in PBS mit 10% FKS wurden die Zellen im FACS Melody analysiert.

Im zweiten Ansatz wurden CD4 und FOXP3 gefärbt. Es wurden ebenfalls 1.000.000 Zellen in PBS mit 10% FKS aufgenommen, gewaschen und mit dem Antikörper gegen CD4, ebenfalls in der Verdünnung 1:20, für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach 2 Waschschritten in PBS mit 10% FKS wurden die Zellen in Fixier-Permeabilisierungslösung (Intracellular Staining Kit, BD) für 20 min bei 4°C fixiert. Schließlich wurden die Zellen im Permeabilisierungs-Waschpuffer (Intracellular Staining Kit, BD) gewaschen. Zur intrazellulären Färbung von FOXP3 wurde der Antikörper in einer Verdünnung von 1:20 hinzugegeben und 30 min bei 4° im Dunkeln inkubiert. Nach 2maligem Waschen mit Permeabilisierungs-Waschpuffer wurden die Zellen wieder in PBS mit 10% FKS aufgenommen und im FACS Melody analysiert.

Der CD4-Antikörper (PE/Cy7) wurde im grünen Laser bei 561nm Wellenlänge analysiert. Sowohl der CD8- wie der FOXP3-Antikörper (beide FITC) wurden im blauen Laser bei 488nm analysiert. Der Totfarbstoff Zombie Violet wurde im violetten Laser bei 405nm analysiert.

Das Gating der Zellen erfolgte im ersten Schritt um die Lymphozyten, dann um Einzelzellen und schließlich um die lebenden Zellen.

### **2.3 DATENSCHUTZ**

Der Umgang mit Patientendaten sowie Patientenmaterial erfolgte unter Berücksichtigung des Datenschutzgesetzes sowie der ärztlichen Schweigepflicht. Die Patientendaten wurden vor Weitergabe der Proben an mich durch das urologische Labor der Uniklinik Tübingen anonymisiert. Weitere Patientendaten wurden durch Ärzte der Uniklinik Tübingen oder das urologische Labor der Uniklinik Tübingen anonymisiert und nur in dieser Form an mich weitergegeben.

### **2.4 ETHIKVOTUM**

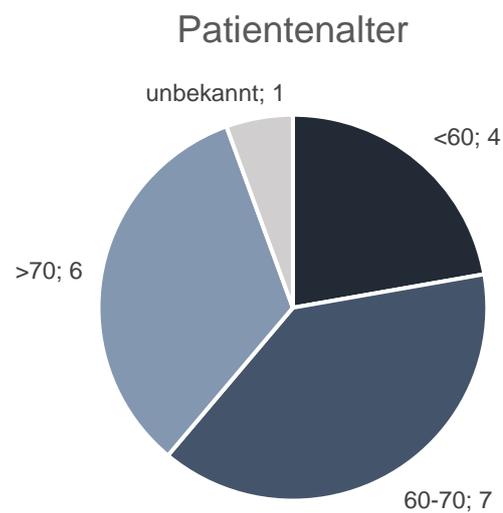
Zur Durchführung der Untersuchungen erfolgte die Erstellung eines genauen Prüfplans. Er enthielt den Titel der Arbeit, wissenschaftliche Hintergrundinformationen und Namen beteiligter Ärzte und Wissenschaftler. Weiterer Inhalt des Prüfplans waren Informationen über Studiendauer und Studienpopulation, Finanzierung und das Ziel der Untersuchungen. Die Einhaltung des Datenschutzgesetzes wurde ebenfalls dargelegt. Der Prüfplan wurde der Tübinger Ethikkommission zur Begutachtung vorgelegt. Er erhielt unter der Projekt-Nr.: 021/2018BO2 ein positives Ethikvotum.

## 3. ERGEBNISSE

### 3.1 PATIENTENKOLLEKTIV

#### 3.1.1 ALTERSVERTEILUNG

Insgesamt konnten vom 9.10.2017 bis zum 31.03.2018 von 18 Patienten Proben gewonnen werden. Alle Proben wurden Patienten im hormonsensiblen Stadium entnommen. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 67,6 Jahre. Der jüngste Patient war zum Zeitpunkt der Operation 53 Jahre alt, der älteste 84 Jahre.

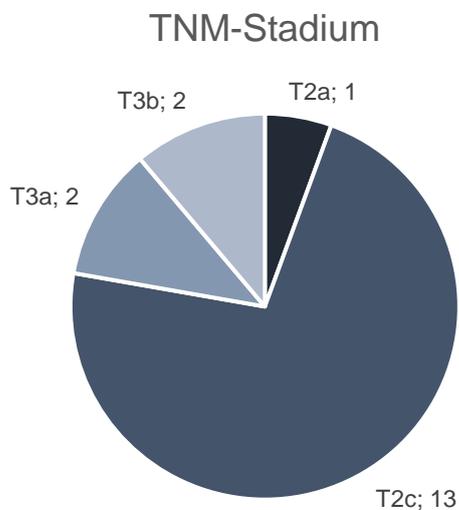


**Abbildung 9** Diagramm zur Altersverteilung der Patientenproben, Angaben in Jahren, Durchschnittsalter: 67,6 Jahre

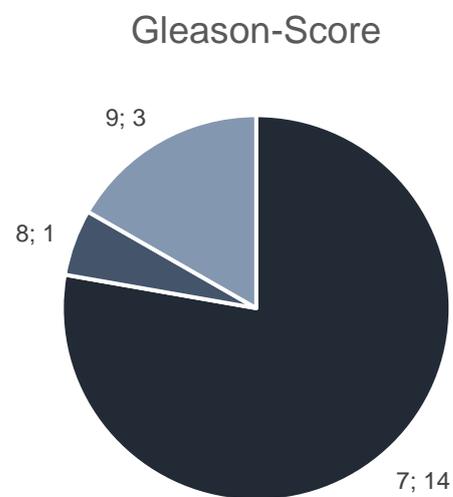
### 3.1.2 TNM-KLASSIFIKATION UND GRADING

Zum Zeitpunkt der Operation befanden sich alle Patienten im hormonsensiblen Stadium. Der Großteil der Proben stammte von Patienten mit einer TNM Einteilung von pT2c pN0 M0, was bedeutet, dass der Tumor beide Seitenlappen befallen, sich jedoch noch nicht über die Prostatakapsel ausgebreitet hat. Dies ist bei einem Stadium ab T3 der Fall.

Bei einem Vergleich der Gleason-Score-Werte wiesen die meisten Patienten einen Gleason-Score von 7 auf. Dies beschreibt Tumore, die zum Teil noch drüsenartige Strukturen bilden, wenngleich auch ungleichmäßig und ohne Lumen.



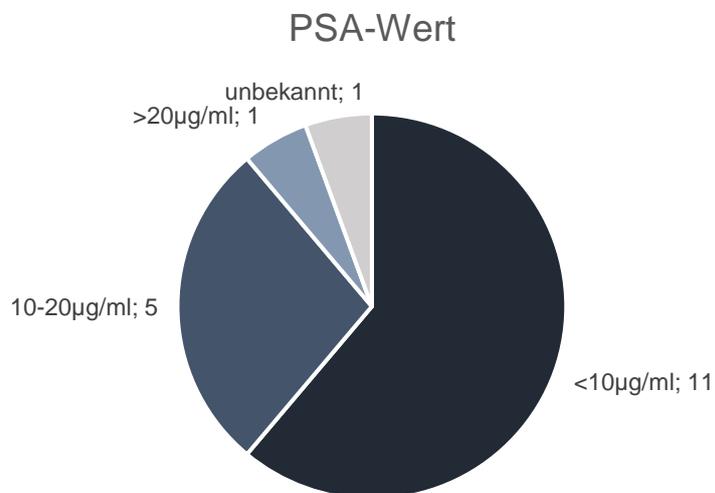
**Abbildung 10** Diagramm zur Darstellung der TNM-Stadien der Patientenproben



**Abbildung 11** Diagramm zur Darstellung der Gleason-Score-Werte der Patientenproben

### 3.1.3 PSA-WERTE

Bei den meisten Patienten, von denen Proben gewonnen wurden lag, ein PSA-Wert von unter 10 $\mu$ g/ml vor. Ein Patient wurde mit einem PSA-Wert von über 20 in die Gruppe der Hochrisikopatienten eingeordnet.



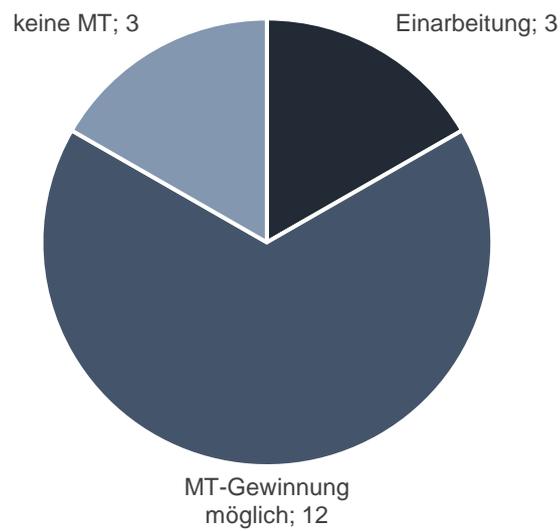
**Abbildung 12** Diagramm zur Verteilung der PSA-Werte der Patientenproben

## **3.2 MIKROTUMORGEWINNUNG**

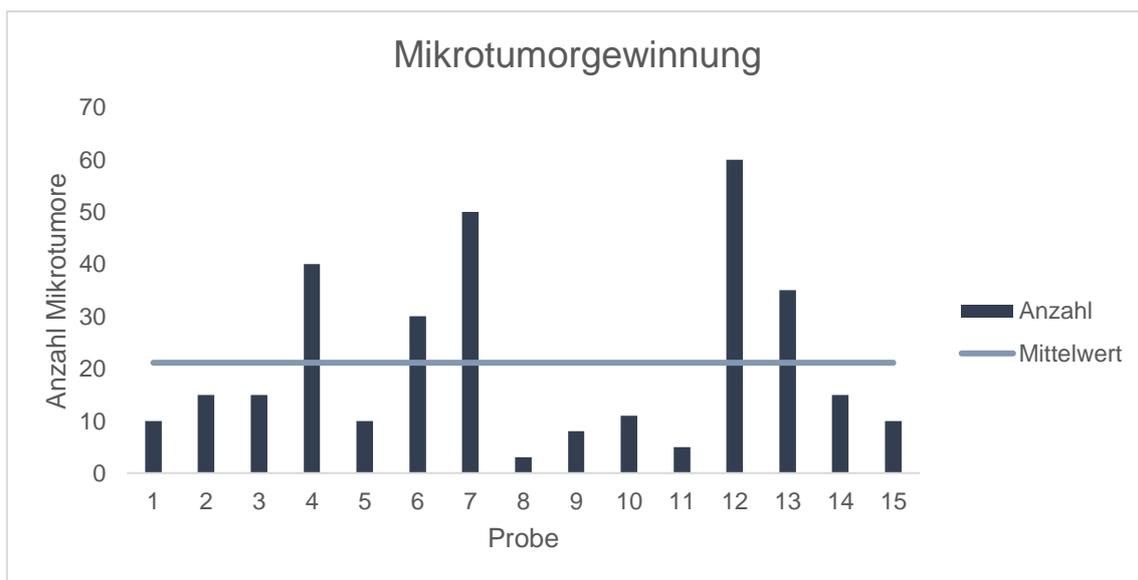
### **3.2.1 MIKROTUMORGEWINNUNG**

Zu Beginn der Arbeit stand das Ziel, aus dem Patientenmaterial, das aus dem urologischen Labor der Uniklinik Tübingen bereitgestellt wurde, möglichst viele Mikrotumore zu isolieren. Zuvor durchgeführte Vorversuche hatten gezeigt, dass die Isolierung von Mikrotumoren aus Prostatakarzinomgewebe sehr viel ineffizienter ist als bei anderen Krebsarten wie dem Kolonkarzinom [49] oder dem Nierenkarzinom. Nach der Einarbeitungsphase wurden daher verschiedene Abänderungen des Protokolls durchgeführt. Es wurden das Verdauenzym (Liberase vs Collagenase/Hyaluronidase) und die Länge des Verdaus (2h, 4h, 16h) variiert. Zusätzlich wurde die Zeit zwischen Operation und Verarbeitung des Gewebes optimiert (2h) und die Größe der Tumorstücke nach der mechanischen Zerkleinerung auf <1mm heruntergesetzt. Trotz dieser Veränderungen des Protokolls wurde eine große Variabilität der Anzahl von erhaltenen Mikrotumoren festgestellt, die vor allem von der Größe des erhaltenen Probengewebes und weniger von den obengenannten Faktoren abhing. Insgesamt konnten aus 15 Patientenproben Mikrotumore gewonnen werden, aus 3 Proben konnten keine Mikrotumore isoliert werden. Aus den Patientenproben, aus denen Mikrotumore isoliert werden konnten, wurden zwischen 3 und 60 Mikrotumore gewonnen, bei einem Mittelwert von 21 Mikrotumoren, wobei die Anzahl an erhaltenen Mikrotumoren stark schwankte.

## Verwendung der Proben



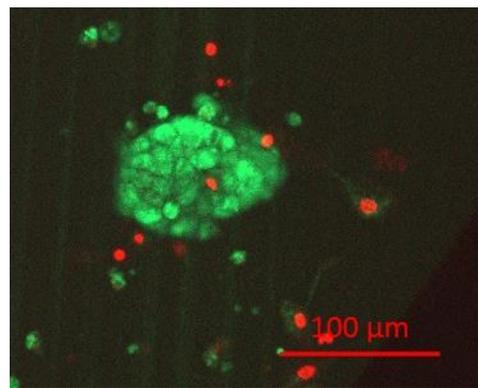
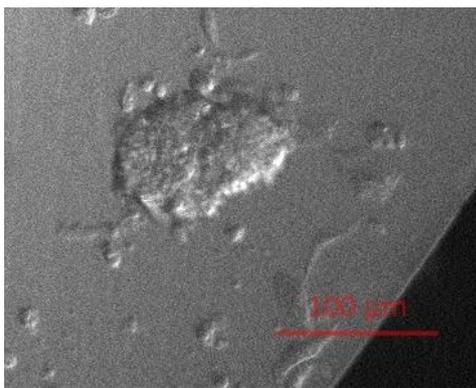
**Abbildung 13** Diagramm zur Darstellung der Proben, aus denen Mikrotumore gewonnen werden konnten. 3 Proben wurden als Einarbeitungsmaterial verwendet, sie wurden nicht für weitere Experimente genutzt.



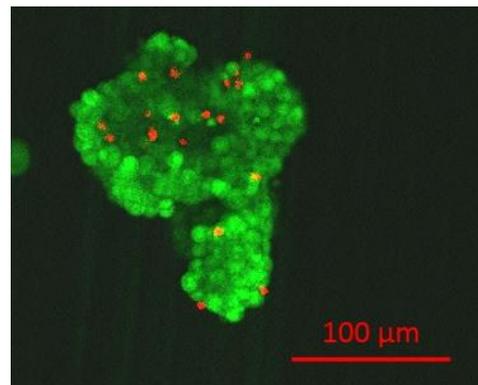
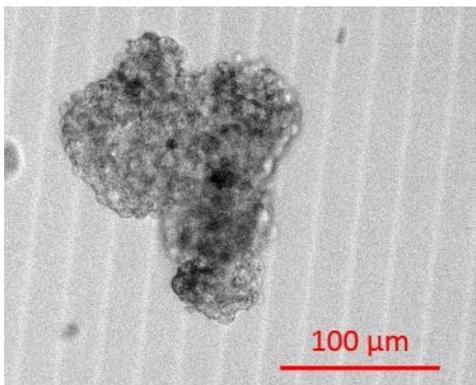
**Abbildung 14** Diagramm zur Darstellung der Anzahl an isolierten Mikrotumoren aus den einzelnen Proben, aus denen Mikrotumore gewonnen werden konnten. Mittelwert von 21.

### 3.2.2 DARSTELLUNG GEWONNENER MIKROTUMORE

Nach der Isolierung der Mikrotumore aus dem Patientengewebe wurde zur Qualitätskontrolle eine Vitalitätsfärbung mit anschließender konfokaler Lebendzellmikroskopie durchgeführt, um die Viabilität der Mikrotumoren zu Beginn des Experiments feststellen zu können. Die Viabilität lag dabei durchschnittlich immer bei >90% lebender Zellen. Größe und Form der Mikrotumoren schwankten sowohl von Patient zu Patient, als auch in einzelnen Patientenproben. Die Größe der Mikrotumore schwankte dabei von 50µm bis 500µm.



PCA 17.293



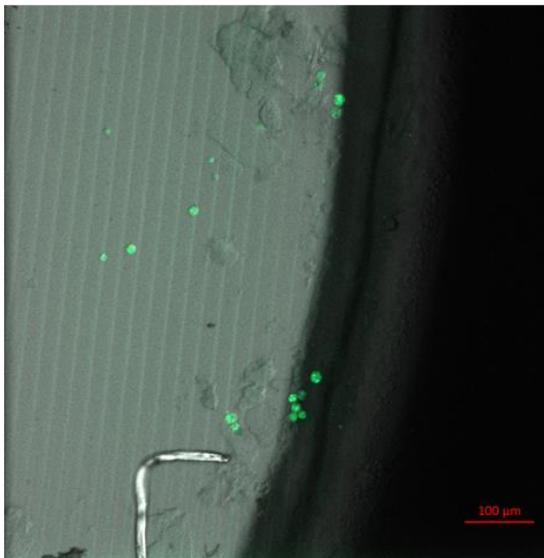
PCA 17.272

**Abbildung 15** Lebend-Tod-Färbung von Mikrotumoren aus Prostatakarzinomgewebe von 2 Patienten (17.293, 17.272). Links Durchlicht, rechts Überlagerung von Calcein-AM (vitale Zellen; grüner Kanal) und Sytox Orange (tote Zellen; roter Kanal). Maßstabsbalken: 100µm.

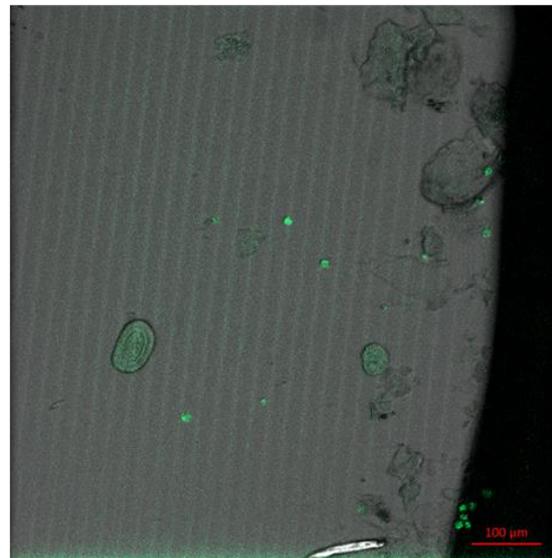
### 3.2.3 DARSTELLUNG DES WACHSTUMS VON MIKROTUMOREN IN HYDROGEL

Aufgrund der geringen Anzahl an gewonnenen Mikrotumoren aus dem Patientenmaterial wurden die Mikrotumore eines Patienten zu Einzelzellen vereinzelt und diese in ein Hydrogel mit zur Oberfläche hin abnehmender Dichte gebracht. Dadurch sollte den Zellen ein Einwandern und Auswachsen zu neuen Mikrotumoren ermöglicht werden. Mittels konfokaler Mikroskopie zeigte es sich jedoch, dass die Zellen nicht, wie erhofft, in das Gel einwanderten, sondern abgekugelt auf der Oberfläche liegenblieben. Auch teilten sich die Zellen nicht und bildeten keine neuen Mikrotumore, blieben aber, anhand der Calceinfärbung erkennbar, weiterhin vital.

Tag 1



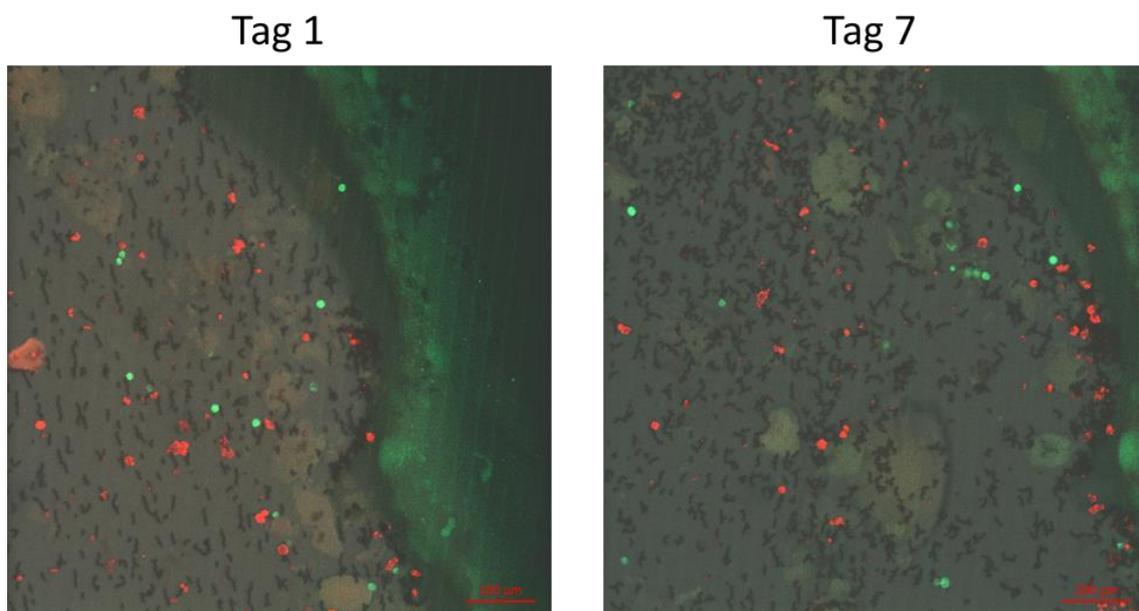
Tag 7



**Abbildung 16** Lebend-Färbung von Mikrotumoreinzellen aus Prostatakarzinomgewebe von Patient 17.272. Links Zellen seit 3 Tagen im Hydrogel, rechts seit 7 Tagen. Überlagerung von Durchlicht und Calcein-AM (vitale Zellen; grüner Kanal). Maßstabsbalken: 100μm.

### 3.2.4 DARSTELLUNG MIKROTUMORE IN KOKULTUR MIT TILS IN HYDROGEL

Auch wenn die Tumorzellen des Patienten nicht in das Gel einwuchsen, sollte dennoch ein erster Test zur Kokultivierung von Tumorzellen mit T- Zellen stattfinden. Dazu wurden die TILs mithilfe von Interleukinen expandiert, mit Calcein Red angefärbt und zu den Tumorzellen in das Gel gebracht. Es sollte beobachtet werden, ob sich die T-Zellen auf die Tumorzellen zubewegen und versuchen diese anzugreifen. Nach einer Woche im Gel zeigte sich allerdings keine gerichtete Migration der T-Zellen auf die Tumorzellen zu. Sowohl die Tumorzellen als auch die T-Zellen waren jedoch weiterhin vital. Auch die die T-Zellen waren wie die Tumorzellen in dieser Zeit nicht in das Gel eingewandert.



**Abbildung 17** Lebend-Färbung von Mikrotumoreinzellen aus Prostatakarzinomgewebe von Patient 17.272. Überlagerung von Durchlicht, Calcein-AM (vitale Mikrotumorzellen; grüner Kanal) und Calcein Red (vitale T-Zellen, roter Kanal). Links T- Zellen seit 3 Tagen im Hydrogel, rechts seit 7 Tagen. Maßstabsbalken 100µm. Schwarze Punkte im Hintergrund: Dynabeads

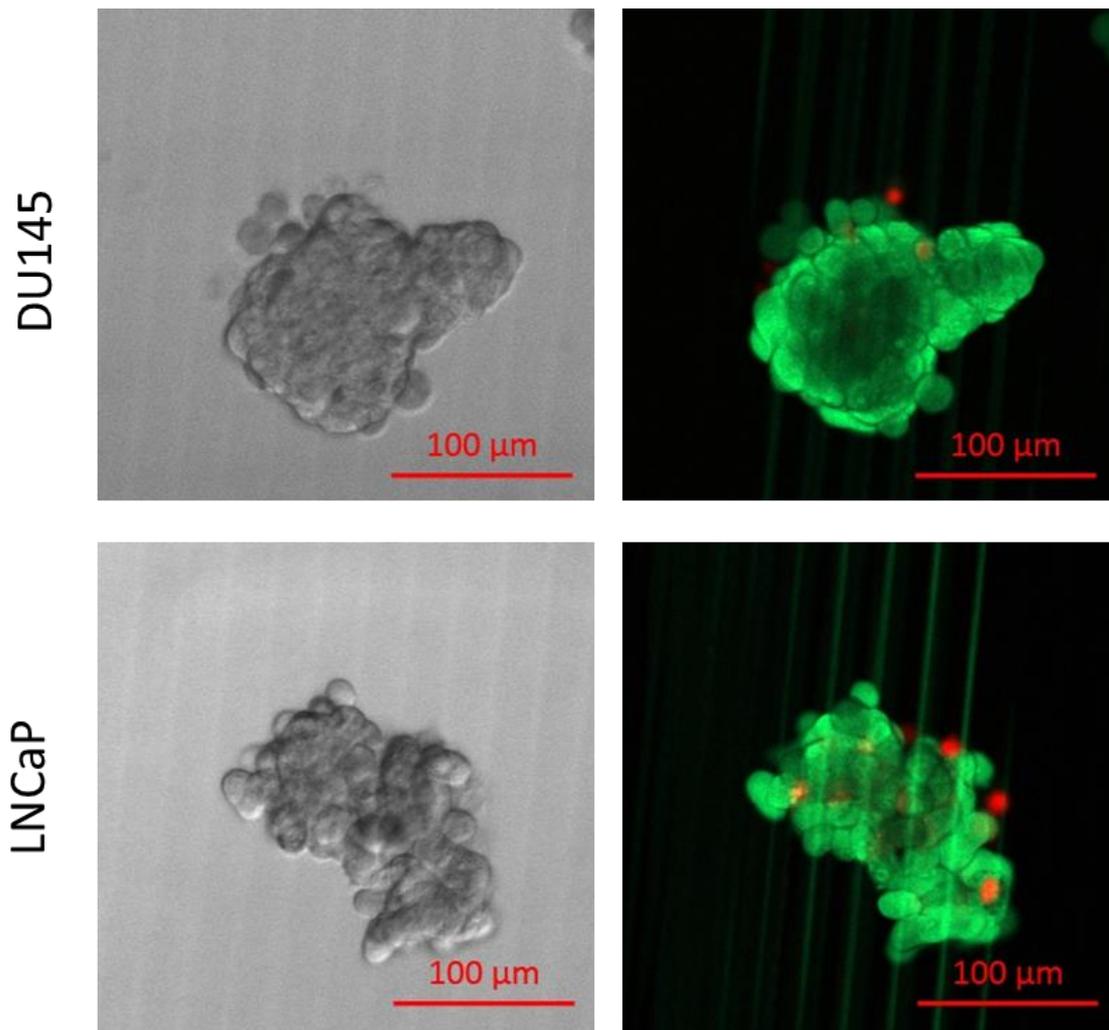
### **3.3 SPHÄROIDGEWINNUNG AUS ZELLINIEN**

#### **3.3.1 DARSTELLUNG GEWONNENER SPHÄROIDE**

Aufgrund der geringen Anzahl an Mikrotumoren aus dem Patientenmaterial wurden die Prostatakarzinomzelllinien DU145, PC3-M und LNCaP kultiviert, um Substanztestungen im ersten Schritt mit den aus der Zelllinie gewonnenen Sphäroiden durchzuführen. In diesen Experimenten sollten geeignete Konzentrationen gefunden werden, bei denen ein zytotoxischer Effekt auf die Zellen sichtbar wird. Im zweiten Schritt wurden diese Konzentrationen dann an Mikrotumoren aus Patientenmaterial getestet. Diese Art der Vorgehensweise bietet die Möglichkeit, Wirkstoffe schon am 3D-Modell testen zu können, ohne dabei auf sehr viel Patientenmaterial zurückgreifen zu müssen. Die Sphäroide konnten innerhalb einer Woche aus Einzelzellen der Zelllinie gewonnen werden. Dazu wurden sie in Flaschen mit zellabweisender Oberfläche kultiviert.

Es zeigte sich, dass nur die beiden Zelllinien DU145 und LNCaP Sphäroide ausbildeten. Daher wurden nur diese beiden Zelllinien in weiteren Experimenten verwendet. Die Zelllinie DU145 bildete runde, sehr dichte Sphäroide aus, wohingegen die Zelllinie LNCaP eher weniger dichte und ungeformte Sphäroide bildete.

Zur Qualitätskontrolle wurde wie bei den Mikrotumoren aus Patientenmaterial zu Beginn der Experimente eine Vitalitätsfärbung durchgeführt, bei der sich im Vergleich zu den Mikrotumoren sogar noch eine höhere Viabilität von 95 – 100% lebenden Zellen zu Beginn zeigte.



**Abbildung 18** Lebend-Tot-Färbung von Mikrotumoren der Zelllinien DU145 und LNCaP. Links Durchlicht, rechts Überlagerung von Calcein-AM (vitale Zellen; grüner Kanal) und Sytox Orange (tote Zellen; roter Kanal). Maßstabsbalken: 100μm.

## 3.4 SUBSTANZTESTS

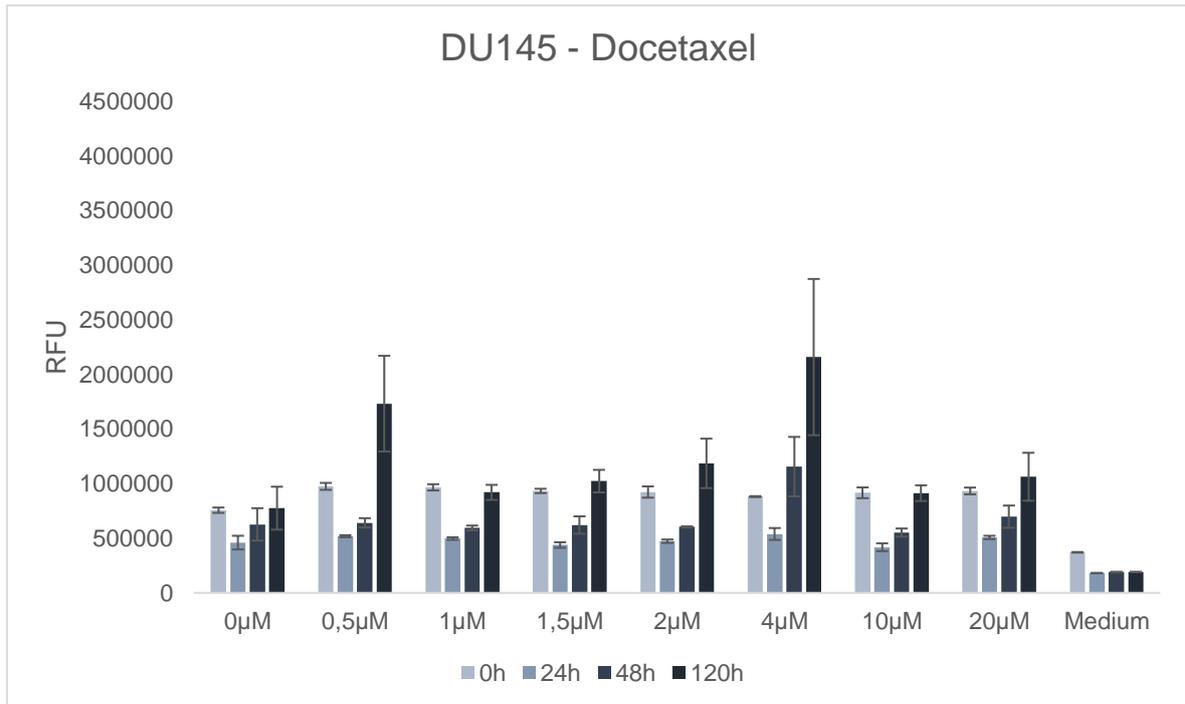
### 3.4.1 CELLTOX™-GREEN-CYTOTOXICITY-ASSAY

Der erste Ansatz zur Substanztestung an den Sphäroiden war der CellTox™-Green-Cytotoxicity-Assay. In diesem Assay werden die Sphäroide mit Celltox Green Dye angefärbt. Kann dieser Farbstoff aufgrund einer beschädigten Zellmembran in Zellen eindringen, bindet er an die DNA und es steigt dessen Fluoreszenz. Die Erhöhung des Fluoreszenzsignals ist damit proportional zur Anzahl der toten Zellen und damit zur Zytotoxizität des Wirkstoffes.

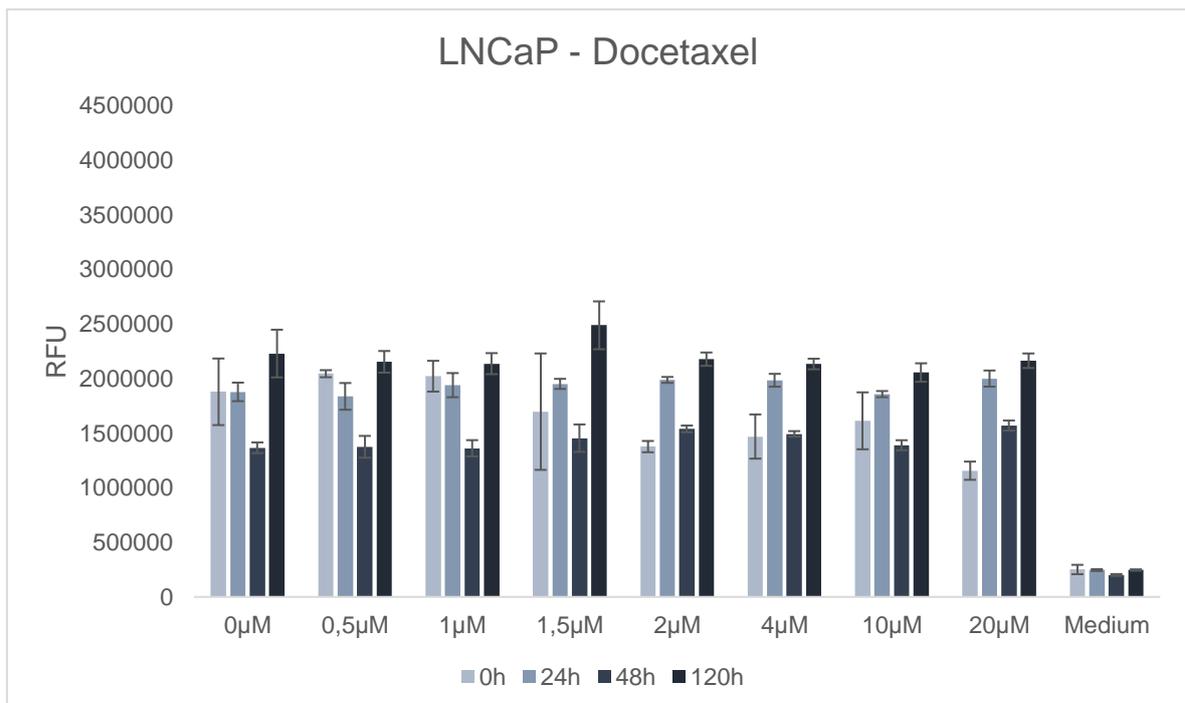
Im Assay wurden pro Well ca. 10-15 Sphäroide eingesetzt und verschiedene Konzentrationen des Medikaments Docetaxel hinzugegeben.

Die Zunahme der Fluoreszenz wurde nach 0h, 24h, 48h und 120h an einem Mikroplatten-Reader gemessen.

Es zeigte sich jedoch bei keiner der beiden Zelllinien eine erkennbare dosisabhängige Wirkung. Grundsätzlich war erkennbar, dass die Sphäroide der Zelllinie LNCaP schon zu Beginn eine größere Menge toter Zellen enthielten als Sphäroide der Zelllinie DU145.



**Abbildung 19** Diagramm DU 145 - Docetaxel CellTox™-Green-Cytotoxicity-Assay. Messung nach 0h, 24h, 48h, 120h. Einheit: Relative Fluorescence Units



**Abbildung 20** Diagramm LNCaP - Docetaxel CellTox™-Green-Cytotoxicity-Assay. Messung nach 0h, 24h, 48h, 120h. Einheit: Relative Fluorescence Units

### 3.4.2 MIKROSKOPIER-ASSAY ZELLINIE

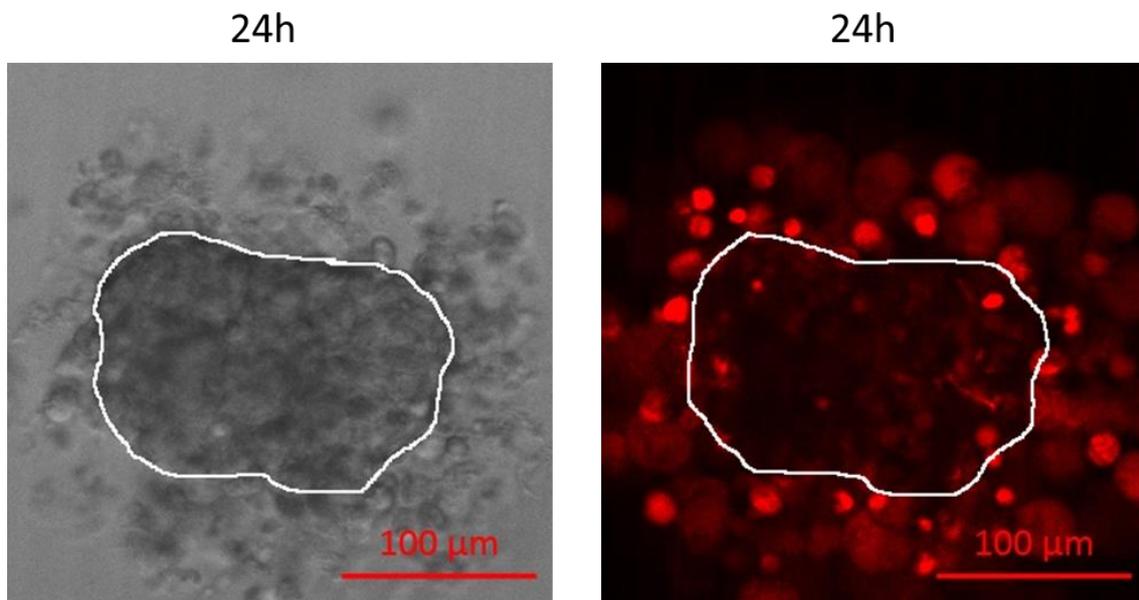
Aufgrund der Tatsache, dass im CellTox™-Green-Cytotoxicity-Assay keine dosisabhängige Wirkung auf die Sphäroide feststellbar war, wurde ein weiteres Verfahren entwickelt, um trotzdem die zytotoxische Wirkung einzelner Substanzen testen zu können. Bei diesem Verfahren wurden die Sphäroide einzeln unter dem Mikroskop beobachtet. Anhand deren Größe bzw. einer Viabilitätsfärbung mit CalceinAM und Sytox Orange wurde dann die Zytotoxizität der Substanz ermittelt.

Auch hier wurde zunächst mit den Zelllinien DU145 und LNCaP gearbeitet um einen passenden Konzentrationsbereich für Tests an den patientenabgeleiteten Mikrotumoren zu finden. Getestet wurden die Medikamente Docetaxel und Enzalutamid mit folgenden Konzentrationen:

Enzalutamid	DMSO Kontrolle	0,5µM	1µM	2µM	5µM	10µM	20µM	Kontrolle
Docetaxel	DMSO Kontrolle	1µM	2µM	5µM	7µM	10µM	20µM	Kontrolle

**DU145**

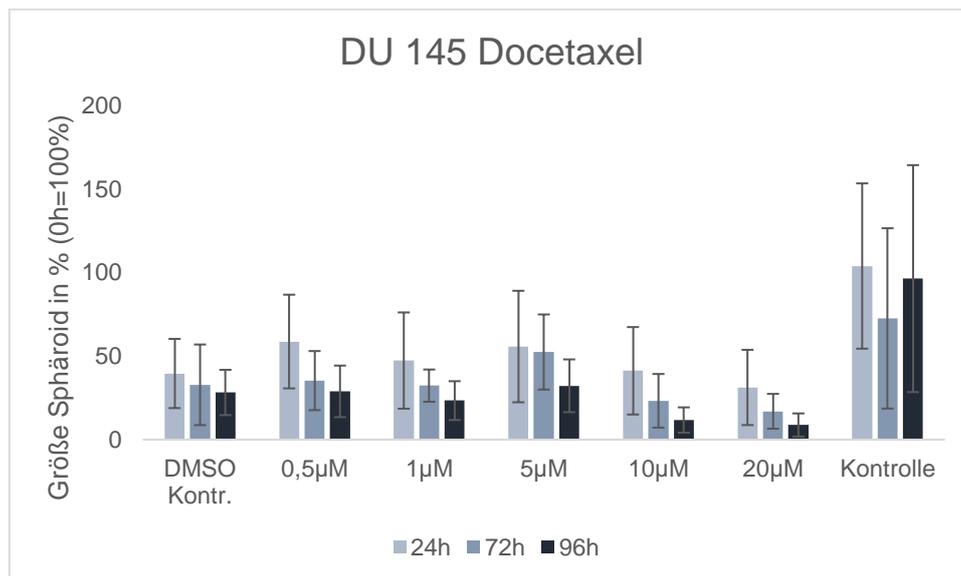
Die Sphäroide der Zelllinie DU145 wurden zu Beginn des Experiments angefärbt. Aufgrund der Form der Sphäroide und der Tatsache, dass die Calceinfärbung schon nach 24h kein geeignetes Signal lieferte, wurde diese Zelllinie nach der Größe der Sphäroide ausgewertet. Dazu wurde stets die innere kompakte Fläche des Sphäroids im Durchlichtkanal gemessen. Wie im untenstehenden Bild sichtbar wird, lösen sich die toten Zellen vom kompakten Kern ab, und der Kern besteht größtenteils aus viablen Zellen. Pro Konzentration wurden etwa 9 Sphäroide gemessen und aus diesen der Durchschnitt ermittelt. Die Größenmessung fand jeweils nach 24h, 72h und 96h mit einem konfokalen Mikroskop als Z-Stack statt.



**Abbildung 21** Sytox Orange Färbung von Mikrotumoren der Zelllinie DU145. Links Durchlicht, rechts Sytox Orange (tote Zellen; roter Kanal). Darübergelegt jeweils eine Maske um den Kern des Sphäroids. Maßstabsbalken: 100µm.

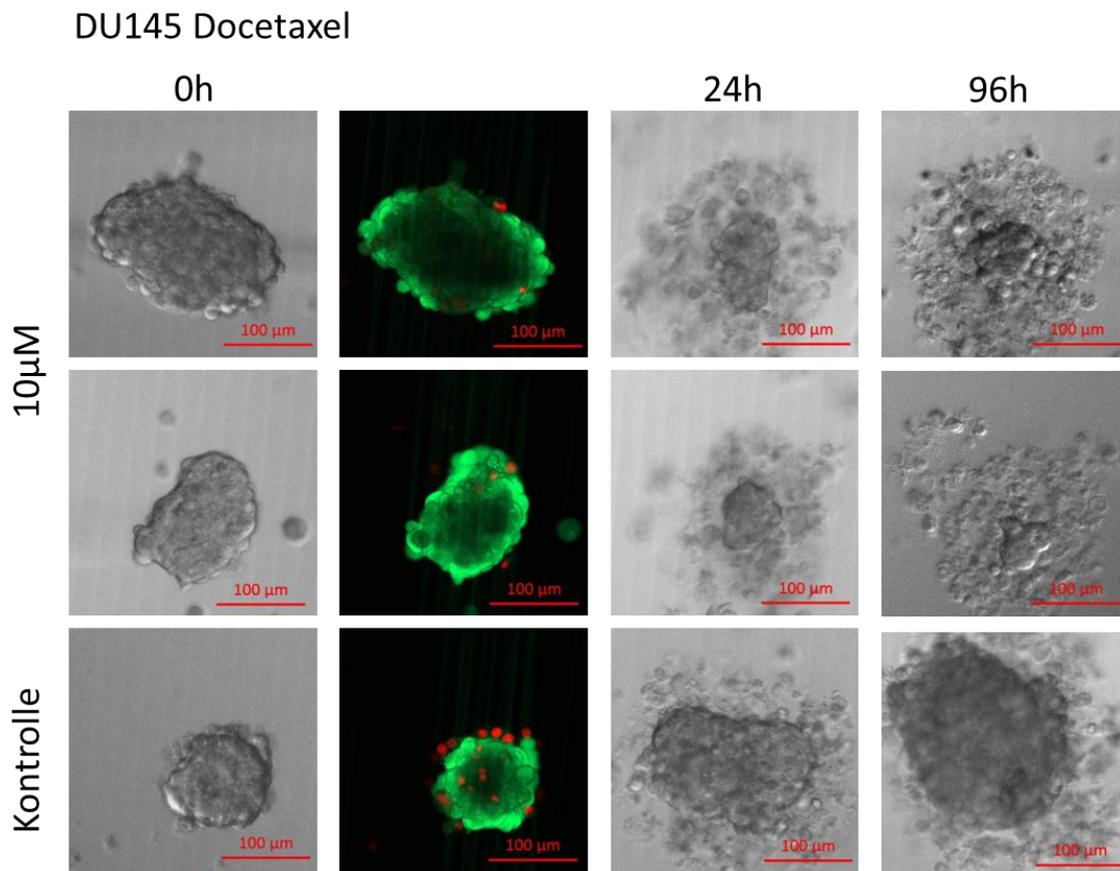
DU145 Docetaxel:

Nach Auswertung der Daten wurde bei allen Konzentrationen sowie bei der DMSO-Kontrolle, bei der gleich viel DMSO enthalten war wie bei der Konzentration von 20µM, schon nach 24h ein deutlicher Effekt auf die Sphäroide sichtbar. Dieser Effekt kann auf die zytotoxische Wirkung des DMSO zurückgeführt werden. Trotzdem kann ein zusätzlicher toxischer Effekt auf die Sphäroide ab einer Konzentration von 10µM beobachtet werden. So lag die Größe bei 10µM Docetaxel nach 96h nur noch bei 7,6% der Ausgangsgröße, bei 20µM sogar nur bei 6,9%. Dies war im Vergleich zur DMSO-Kontrolle eine Halbierung der Größe zu diesem Zeitpunkt, die DMSO-Kontrolle hatte noch eine Größe von 13,5%. Am deutlichsten sichtbar wird dieser Effekt nach einer Inkubationszeit von 96h. Auch in den weiteren Experimenten war der Substanzeffekt nach dieser Zeit am deutlichsten.



**Abbildung 22** Diagramm DU145 Docetaxel. Auswertung anhand der Größe des Kernsphäroids. Größe bei 0h: 100%. Messung nach 24h, 72h, 96h

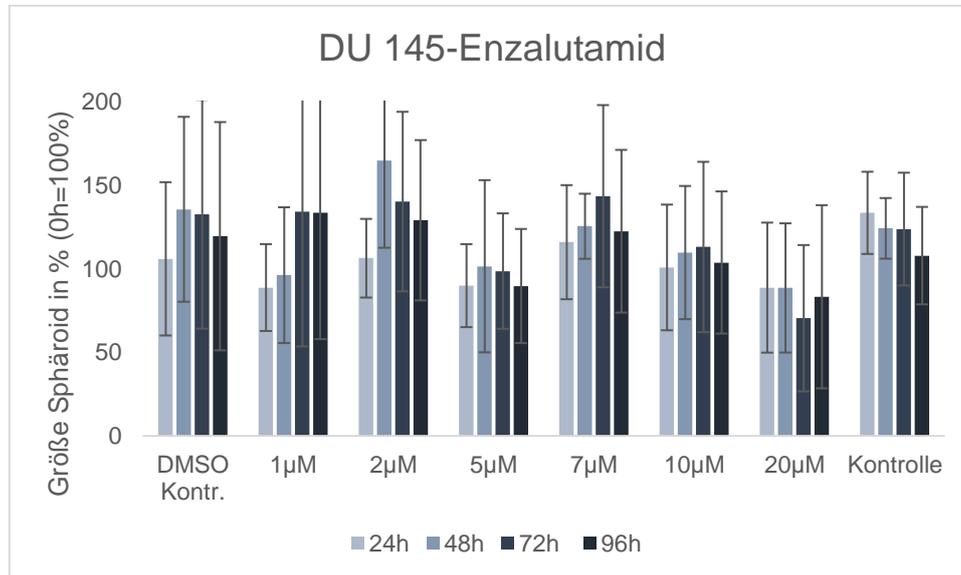
Die Größenabnahme wird exemplarisch an zwei Bildern für die Konzentration von  $10\mu\text{M}$  Docetaxel und an einem Bild der Kontrolle dargestellt. Deutlich sichtbar sind das Kernsphäroid mit den davon abdissoziierenden toten Zellen und die Größenabnahme mit der Zeit. Zu Beginn waren alle Sphäroide gleich viabel, erkennbar an der Lebend-Tot-Färbung zu Beginn des Experiments.



**Abbildung 23** 0h: Lebend-Tot-Färbung von Mikrotumoren der Zelllinie DU145. Links Durchlicht, daneben Überlagerung von Calcein-AM (vitale Zellen; grüner Kanal) und Sytox Orange (tote Zellen; roter Kanal). 24h, 96h: jeweils Durchlichtbilder. Bilder nach Behandlung mit  $10\mu\text{M}$  Docetaxel bei 0h bzw. ohne Behandlung (Kontrolle). Maßstabsbalken:  $100\mu\text{M}$

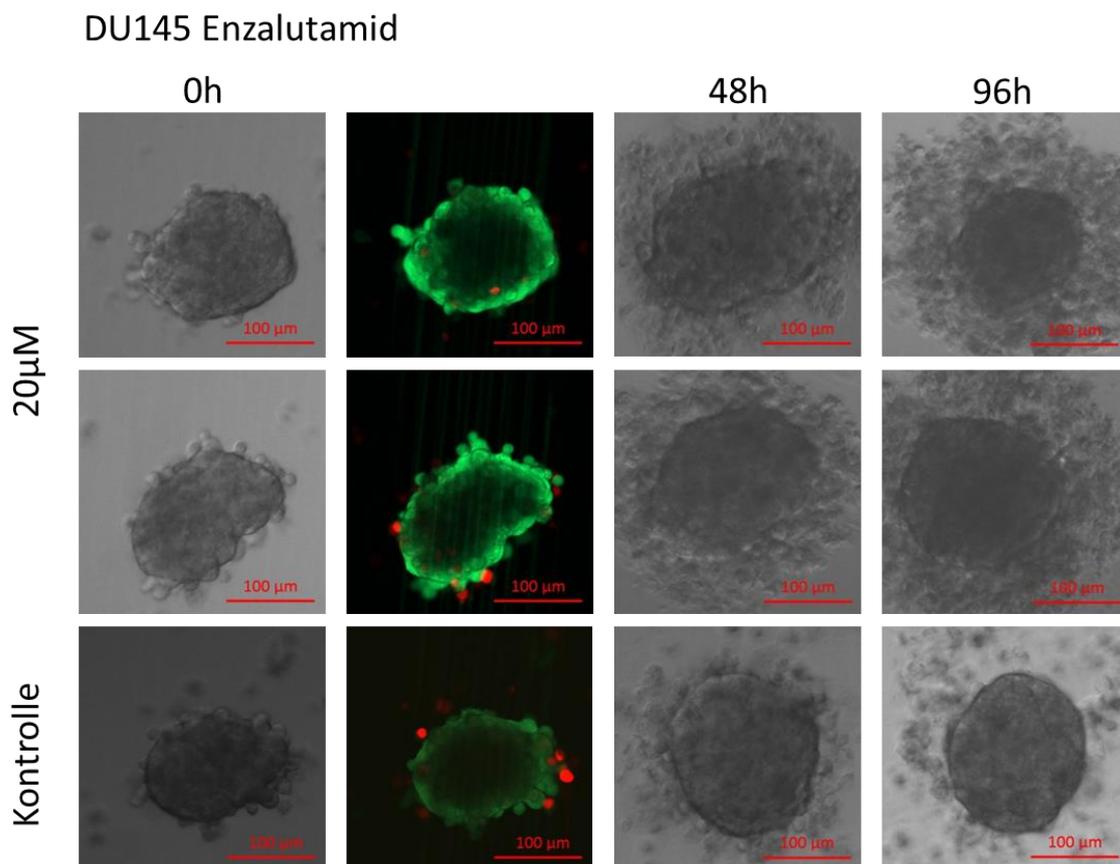
### DU145 Enzalutamid

Die Datenauswertung des Experiments mit Enzalutamid ergab ein deutlich anderes Bild im Vergleich zu Docetaxel. Es konnte kein substanzabhängiger Effekt festgestellt werden.



**Abbildung 24** Diagramm DU145-Enzalutamid. Auswertung anhand der Größe des Kernsphäroids. Größe bei 0h: 100%. Messung nach 24h, 48, 72h, 96h

Die gleichbleibende Größe der Sphäroide wird exemplarisch an zwei Bildern für die Konzentration von 20 $\mu$ M Enzalutamid und an einem Bild der Kontrolle dargestellt. Auch hier sind einige abdissoziierende Zellen erkennbar, das Kernspäroid behält aber weiterhin seine kompakte runde Form und unterliegt nicht einer Größenabnahme wie bei der Behandlung mit Docetaxel. Zu Beginn waren alle Sphäroide gleich viabel, erkennbar an der Lebend-Tot-Färbung zu Beginn des Experiments.



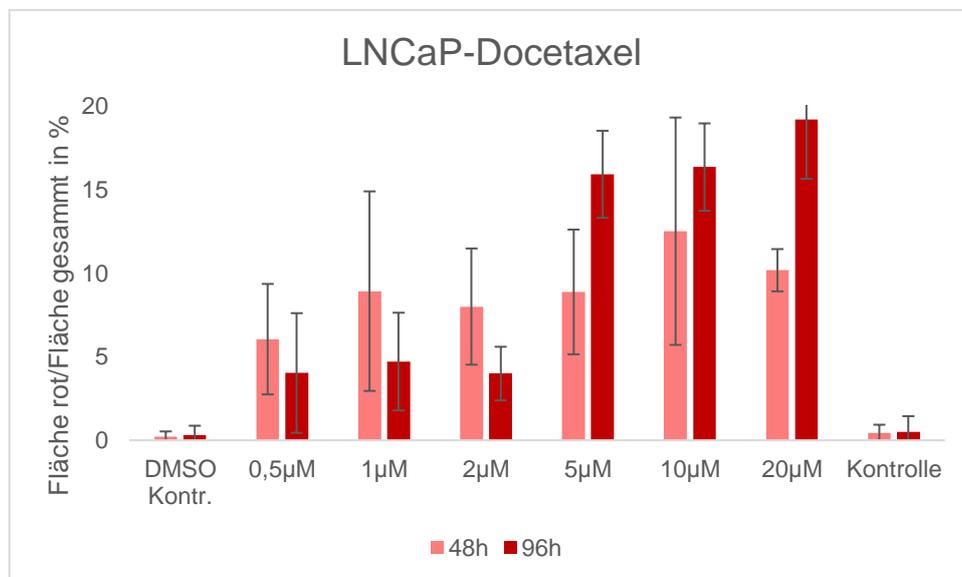
**Abbildung 25** Lebend-Tot-Färbung von Mikrotumoren der Zelllinie DU145. Links Durchlicht, daneben Überlagerung von Calcein-AM (vitale Zellen; grüner Kanal) und Sytox Orange (tote Zellen; roter Kanal). 48h, 96h: jeweils Durchlichtbilder. Bilder nach Behandlung mit 20 $\mu$ M Enzalutamid bei 0h bzw. ohne Behandlung (Kontrolle). Maßstabsbalken: 100 $\mu$ M

## **LNCaP**

Um eine bessere Unterscheidung lebender und toter Zellen zu erreichen, wurde das Färbeverfahren des Assays abgeändert. Anstelle einer Färbung zu Beginn des Experiments wurde der komplette Ansatz dreifach pipettiert und an jedem Messtag (0h, 48h, 96h) ein Ansatz angefärbt. So konnten auch zu späteren Zeitpunkten gut auswertbare Bilder gemacht werden. Zusätzlich wurde die Mikrowellplatte von einer Platte mit planem Boden auf eine Platte mit U-Boden umgestellt. Dies hatte zur Folge, dass die Sphäroide sich in der Mitte des Wells zusammenlagerten. Dadurch konnte ein größerer Bereich zur Auswertung ausgewählt werden, von dem dann der Durchschnitt gebildet wurde. Es wurden jeweils 5 Wells pro Konzentration pipettiert.

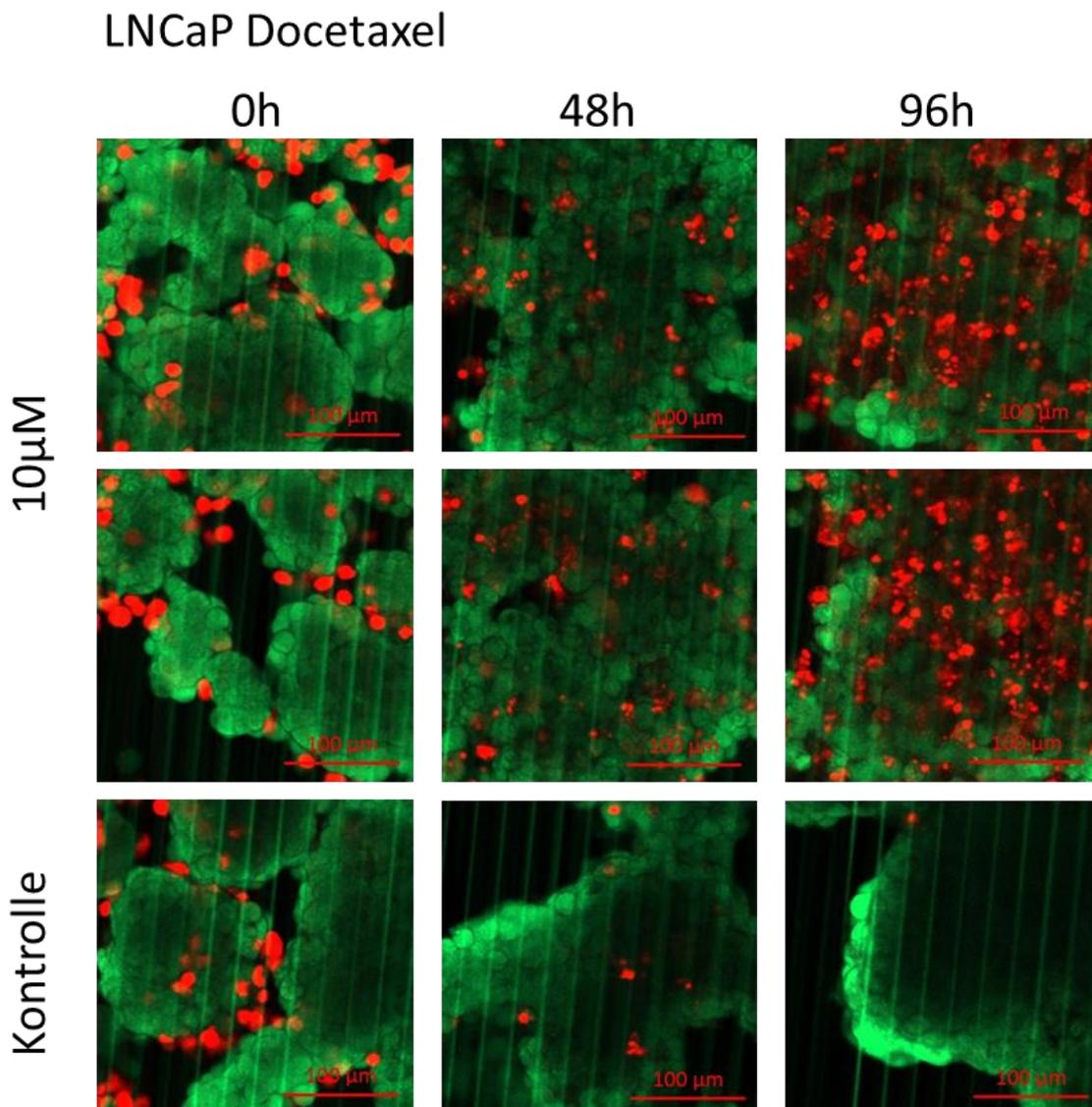
### LNCaP-Docetaxel

Die Auswertung anhand der Lebend-Tot-Färbung des Experiments mit Docetaxel zeigte einen deutlichen zytotoxischen Effekt des Docetaxels auf die Sphäroide. Dieser Effekt war besonders deutlich für Konzentrationen ab 5 $\mu$ M. Waren zu Beginn des Experiments noch unter 1% der Zellen tot, stieg dieser Wert auf 16,3% bei einer Konzentration von 10 $\mu$ M und 19,2% bei einer Konzentration von 20 $\mu$ M an. Weder in der Kontrolle noch in der DMSO-Kontrolle stieg der Wert in dieser Stärke. Wie schon beim vorangegangenen Experiment mit der Zelllinie DU145 war die Effektwirkung nach 96h am deutlichsten.



**Abbildung 26** Diagramm LNCaP-Docetaxel. Auswertung anhand der Fläche toter Zellen zur Gesamtfläche des Sphäroids. Messung nach 48h und 96h

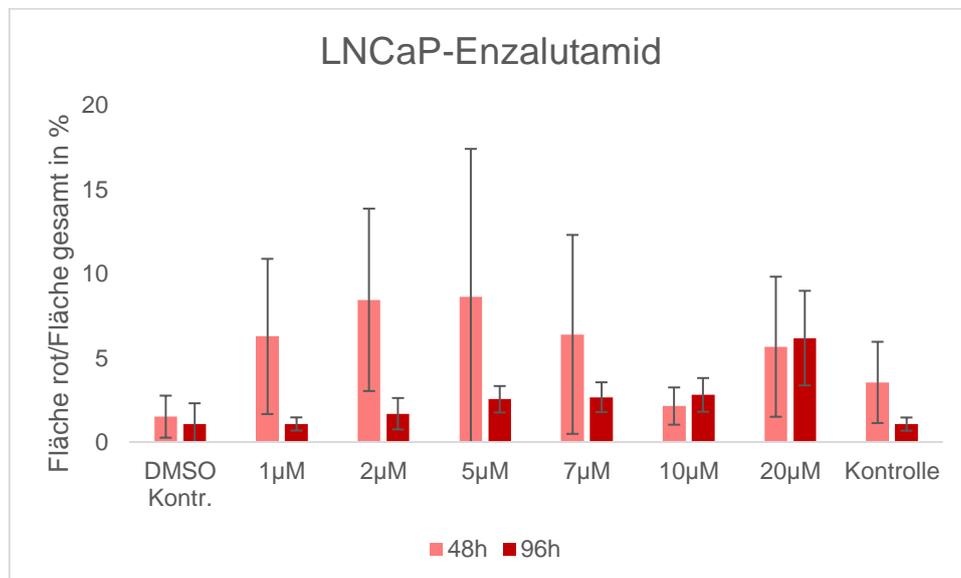
Die Zunahme der Fläche toter Zellen (rot) wird exemplarisch an zwei Bildern für die Konzentration von 10 $\mu$ M Docetaxel und an einem Bild der Kontrolle dargestellt. Zu Beginn sind noch einige tote Zellen im Ansatz, die durch die mechanische Belastung beim Pipettieren des Ansatzes entstehen. Nach 48h ist bei der Konzentration von 10 $\mu$ M schon ein beginnender Effekt zu erkennen, der sich bei 96h noch deutlich verstärkt. Im Gegensatz dazu die Kontrolle, die auch nach 96h kaum tote Zellen aufweist.



**Abbildung 27** 0h, 48h, 96h: Lebend-Tod-Färbung von Mikrotumoren der Zelllinie LNCaP. Überlagerung von Calcein-AM (vitale Zellen; grüner Kanal) und Sytox Orange (tote Zellen; roter Kanal). Bilder nach Behandlung mit 10 $\mu$ M Docetaxel bei 0h bzw. ohne Behandlung (Kontrolle). Maßstabsbalken: 100 $\mu$ M

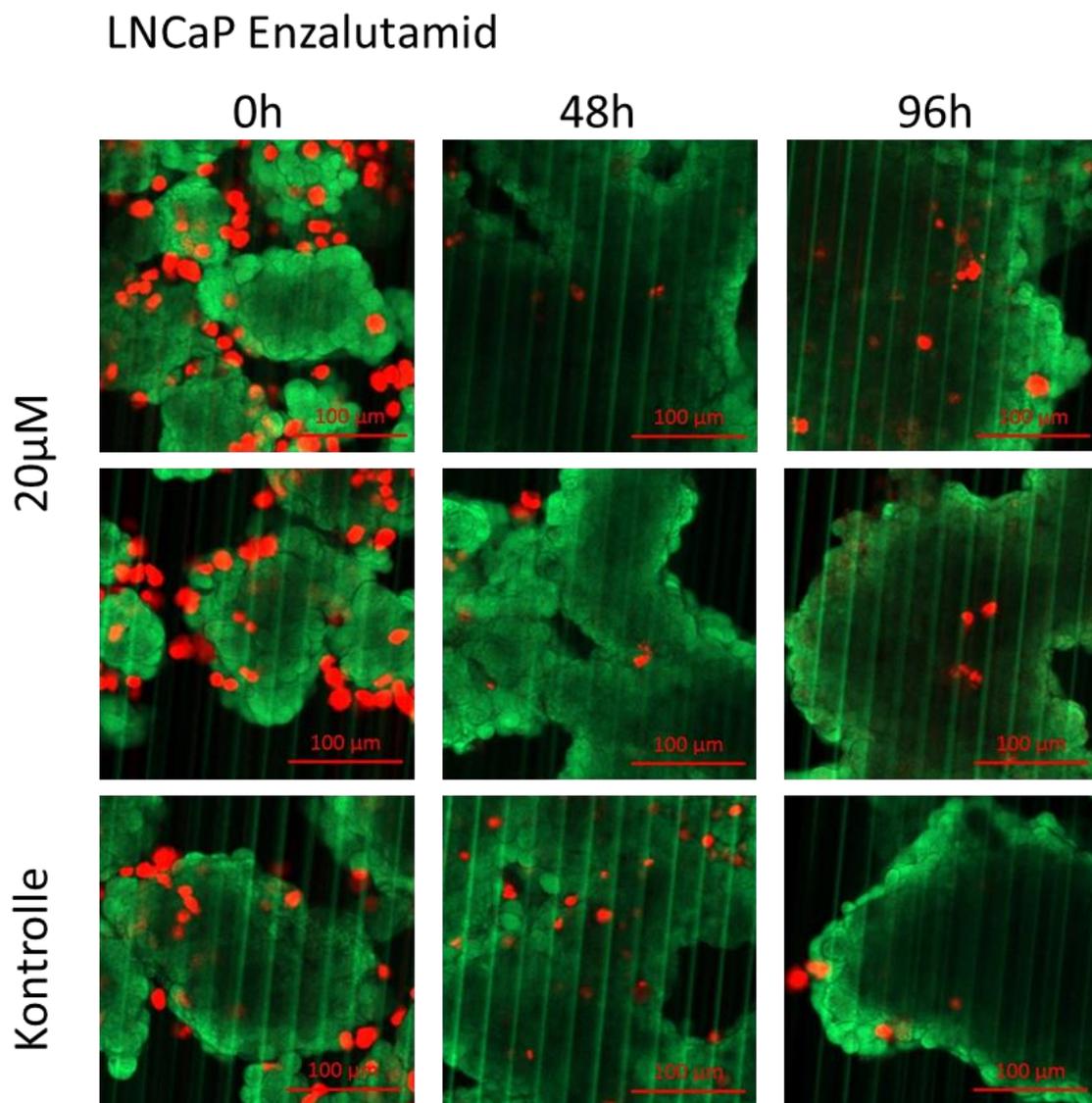
### LNCaP Enzalutamid

Auch die Auswertung anhand der Lebend-Tot-Färbung des Experiments mit Enzalutamid zeigte einen zytotoxischen Effekt des Enzalutamids auf die Sphäroide. Der Effekt war deutlich für Konzentrationen ab 20 $\mu$ M, jedoch nicht in gleichem Ausmaß wie für das Docetaxel. Im Vergleich zur Kontrolle (1% Fläche toter Zellen) konnte nach 96h ein Anstieg auf 6,2% Fläche toter Zellen verzeichnet werden. Der substanzabhängige Effekt ist auch hier nach 96h am deutlichsten sichtbar, da eventuelle tote Zellen, die durch mechanische Belastung beim Pipettieren entstanden sind, nicht mehr in die Auswertung einfließen, was zu einer Verringerung der Standardabweichung und damit zu einem deutlich sichtbareren Effekt führt.



**Abbildung 28** Diagramm LNCaP-Enzalutamid. Auswertung anhand der Fläche toter Zellen zur Gesamtfläche des Sphäroids. Messung nach 48h und 96h

Die Zunahme der Fläche toter Zellen (rot) wird exemplarisch an zwei Bildern für die Konzentration von 20µM Enzalutamid und an einem Bild der Kontrolle dargestellt. Zu Beginn sind noch einige tote Zellen im Ansatz, die durch die mechanische Belastung beim Pipettieren des Ansatzes entstehen. Nach 48h ist ein Effekt noch kaum zu erkennen, nach 96h wird im Vergleich zur Kontrolle eine Zunahme der Fläche toter Zellen deutlich, wenn auch nicht im gleichen Ausmaß wie bei der Behandlung mit Docetaxel.

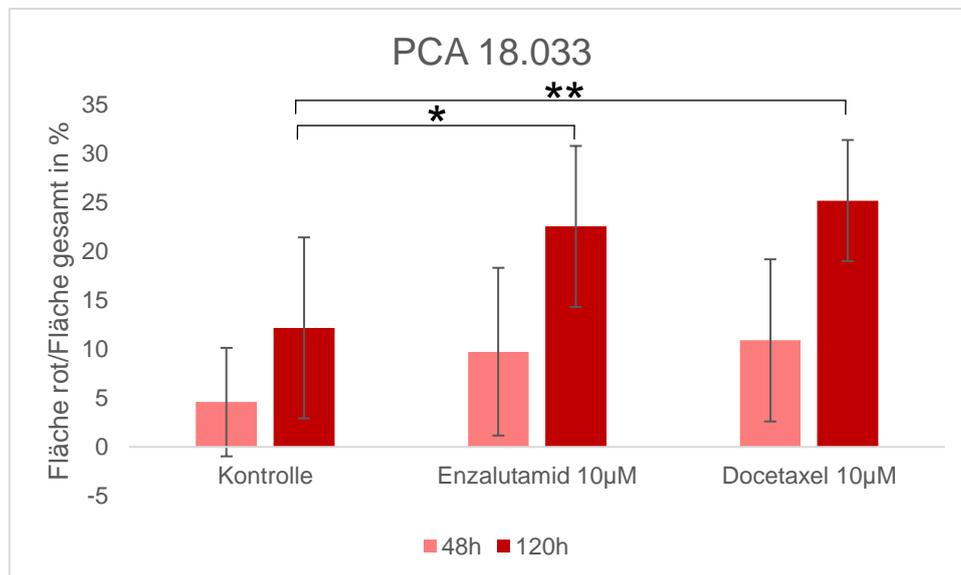


**Abbildung 29** 0h, 48h, 96h: Lebend-Tod-Färbung von Mikrotumoren der Zelllinie LNCaP. Überlagerung von Calcein-AM (vitale Zellen; grüner Kanal) und Sytox Orange (tote Zellen; roter Kanal). Bilder nach Behandlung mit 20µM Enzalutamid bei 0h bzw. ohne Behandlung (Kontrolle). Maßstabsbalken: 100µm

### 3.4.3 MIKROSKOPIER-ASSAY PATIENT

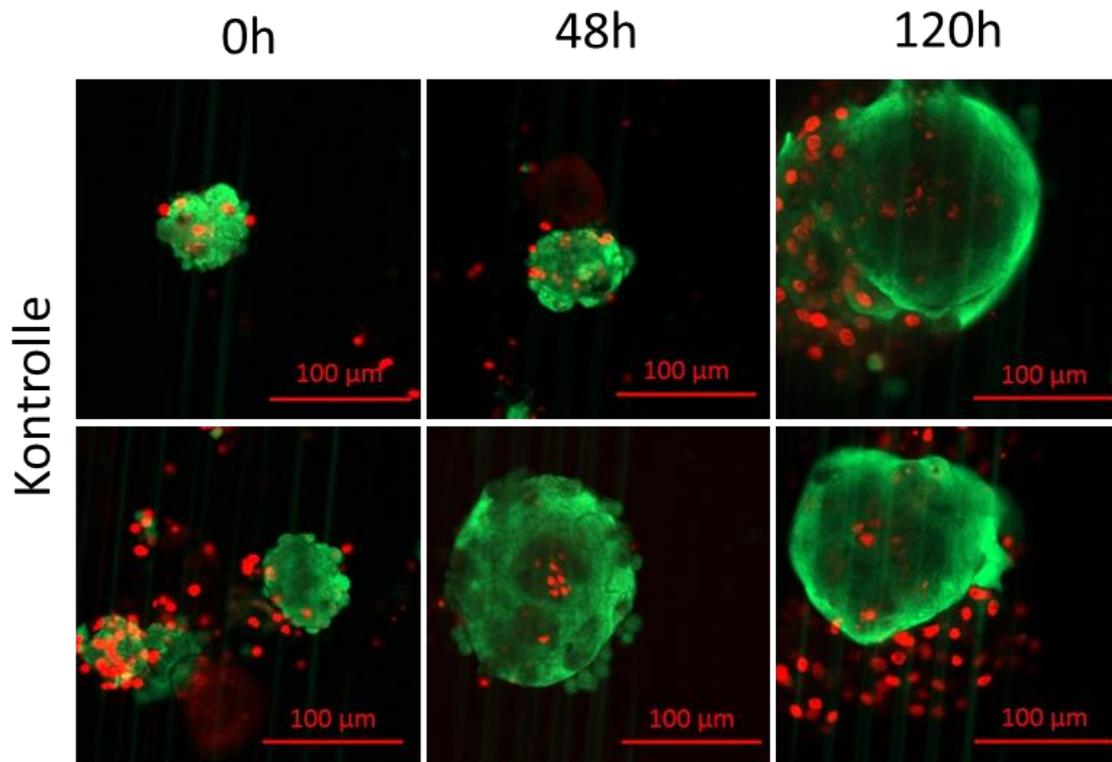
Aufgrund der Ergebnisse des Mikroskopier-Assays an den Zelllinien LNCaP und DU145 wurden für Tests an Mikrotumoren eines Patienten die Konzentrationen 10µM für Docetaxel und Enzalutamid bestimmt. Mit den Mikrotumoren wurde dabei gleich vorgegangen wie mit der Zelllinie LNCaP, indem zu Beginn jeweils 3 Ansätze pipettiert wurden, die dann zum Zeitpunkt der Messung angefärbt wurden. Messungen fanden nach 0h, 48h und 120h statt. Zum Vergleich wurde noch die Kontrolle für jeden Zeitpunkt pipettiert.

Es zeigte sich ein noch deutlicherer Effekt als bei den Zelllinien. Das Mikrotumorgewebe des Patienten sprach sowohl auf Docetaxel wie auf Enzalutamid an. Nach 120h waren in der Kontrolle 12,2% tote Zellen, im Ansatz mit Enzalutamid 22,5% tote Zellen und im Ansatz mit Docetaxel 25,2%. Wie schon bei den Zelllinien war der substanzabhängige Effekt am deutlichsten bei der längsten Inkubationsdauer (120h) sichtbar.



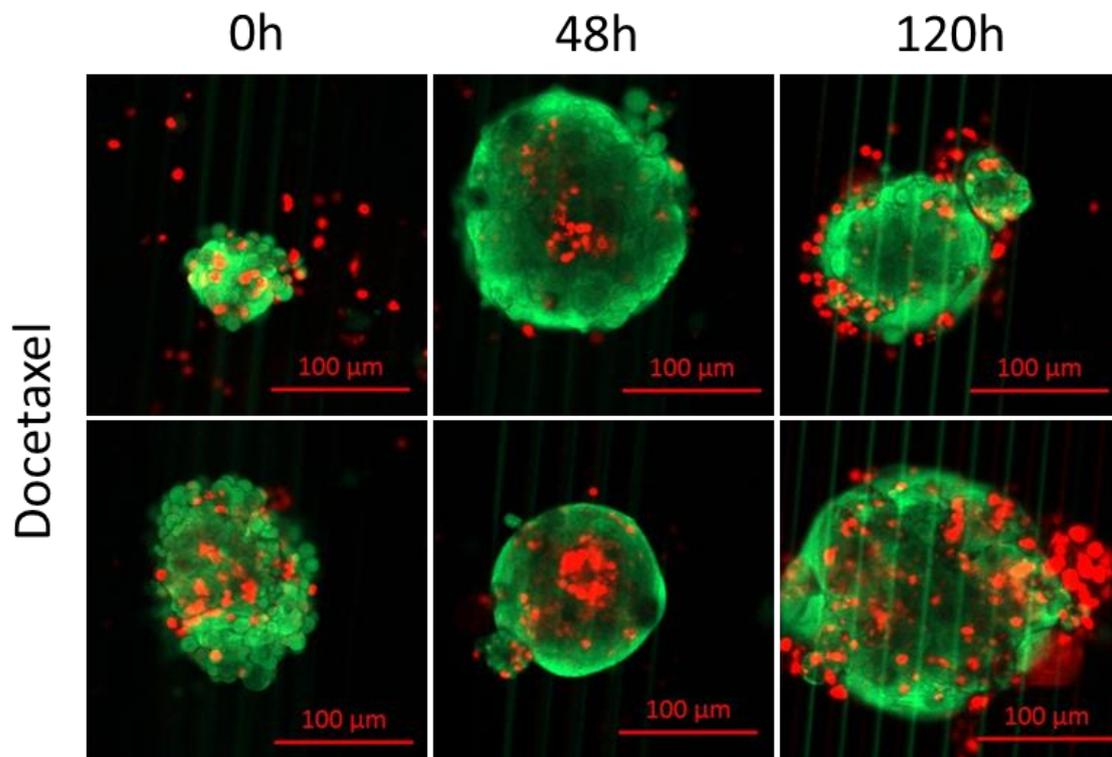
**Abbildung 30** Diagramm PCA 18.033. Auswertung anhand der Fläche toter Zellen zur Gesamtfläche des Sphäroids. Messung nach 48h und 120h. Signifikanz zur Kontrolle: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$

Die Zunahme der Fläche toter Zellen (rot) wird exemplarisch an zwei Bildern für die Kontrolle dargestellt. Es wird deutlich, dass die Anzahl toter Zellen nicht stark ansteigt. Im Vergleich zur Zelllinie sind die Mikrotumore dieses Patienten sehr dicht und rund.



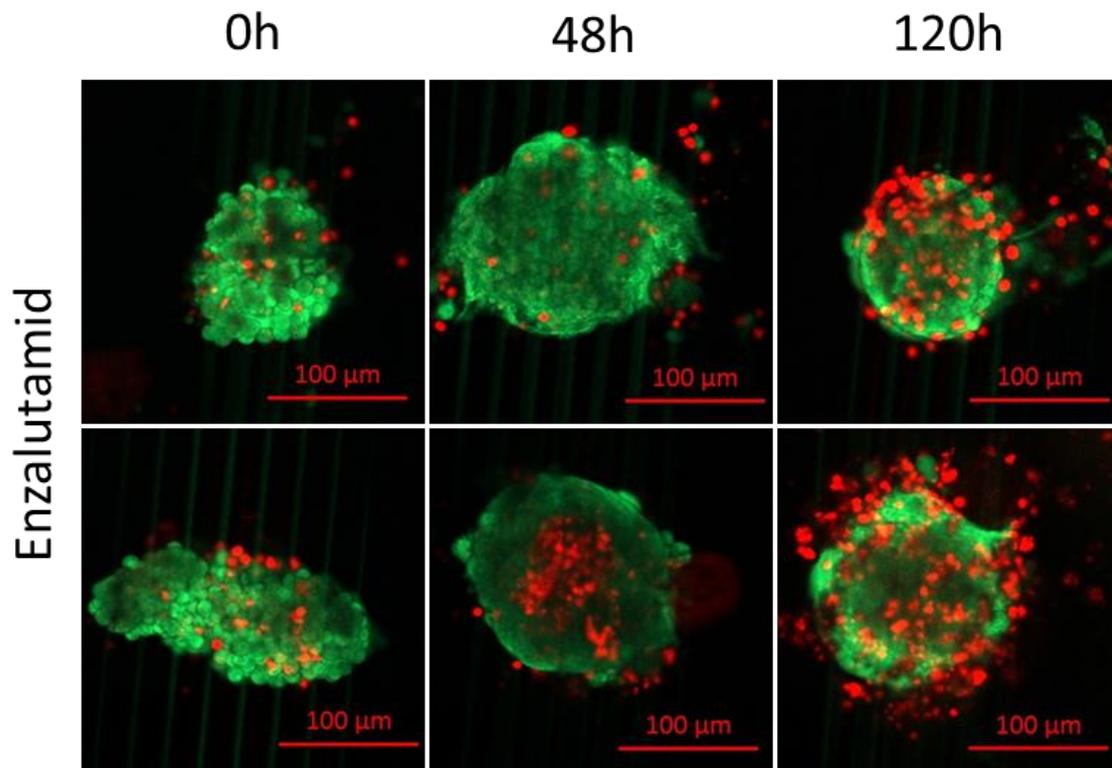
**Abbildung 31** 0h, 48h, 120h: Lebend-Tod-Färbung von Mikrotumoren aus Prostatakarzinomgewebe von Patient 18.033. Überlagerung von Calcein-AM (vitale Zellen; grüner Kanal) und Sytox Orange (tote Zellen; roter Kanal). Bilder ohne Behandlung (Kontrolle). Maßstabsbalken: 100μM

Im Vergleich zur Kontrolle wird an den jeweils 2 exemplarischen Bildern pro Zeitpunkt für die Behandlung mit 10 $\mu$ M Docetaxel die Zunahme der toten Zellen deutlich.



**Abbildung 32** 0h, 48h, 120h: Lebend-Tod-Färbung von Mikrotumoren aus Prostatakarzinomgewebe von Patient 18.033. Überlagerung von Calcein-AM (vitale Zellen; grüner Kanal) und Sytox Orange (tote Zellen; roter Kanal). Bilder nach Behandlung mit 10 $\mu$ M Docetaxel bei 0h. Maßstabsbalken 100 $\mu$ M

Auch für Enzalutamid kann an den 2 exemplarischen Bildern pro Zeitpunkt eine starke Zunahme toter Zellen beobachtet werden.



**Abbildung 33** 0h, 48h, 120h: Lebend-Tod-Färbung von Mikrotumoren aus Prostatakarzinomgewebe von Patient 18.033. Überlagerung von Calcein-AM (vitale Zellen; grüner Kanal) und Sytox Orange (tote Zellen; roter Kanal). Bilder nach Behandlung mit 10µM Enzalutamid bei 0h. Maßstabsbalken: 100µM

### 3.5 HISTOLOGIE

#### 3.5.1 HISTOLOGIE PROSTATATA

Zum Vergleich des Tumorgewebes wurde normales Prostatagewebe immunhistochemisch gegen PSA angefärbt und dann mit Hämatoxylin gegengefärbt. Deutlich erkennbar sind die tubulo-alveolären Drüsenlumina mit Drüsenepithel, welches das PSA produziert und sich daher auch stark anfärbt. Auch der Aufbau der Prostata aus glatten Muskelzellen wird deutlich. Sie umgeben die Drüsen der Prostata und bilden deren Kapsel. So kann bei der Ejakulation das Prostatasekret schnell herausgedrückt werden.

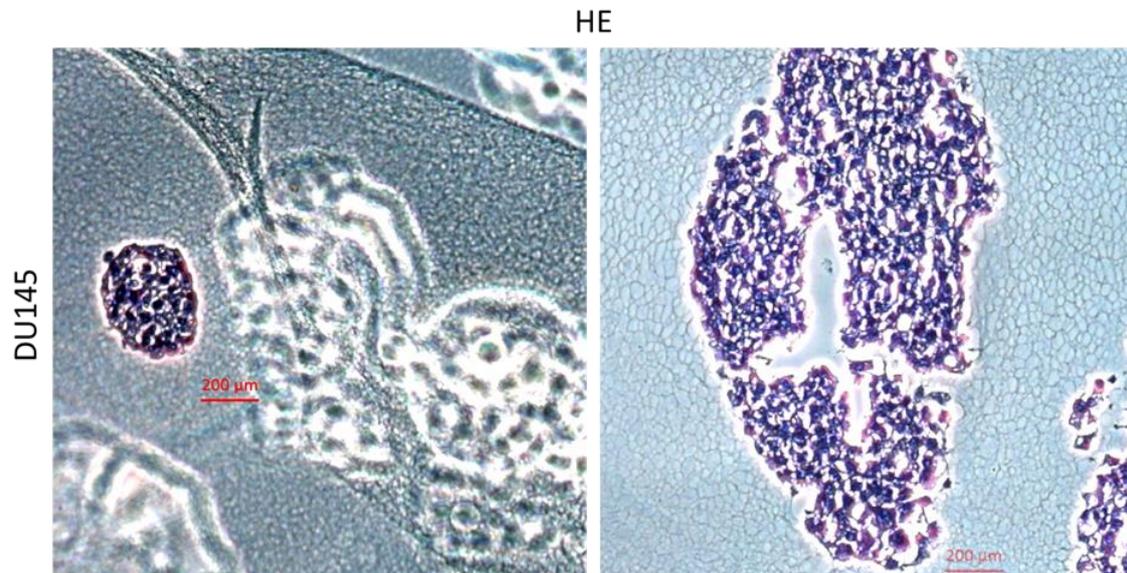
PSA



**Abbildung 34** Immunhistochemische Färbung von Prostatanormalgewebe. Färbung gegen PSA, deutlich exprimiert in den Prostataepithelzellen. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Maßstabsbalken 200µm. Eigene Färbung, Prostatagewebe wurde von der Firma Leica zur Verfügung gestellt.

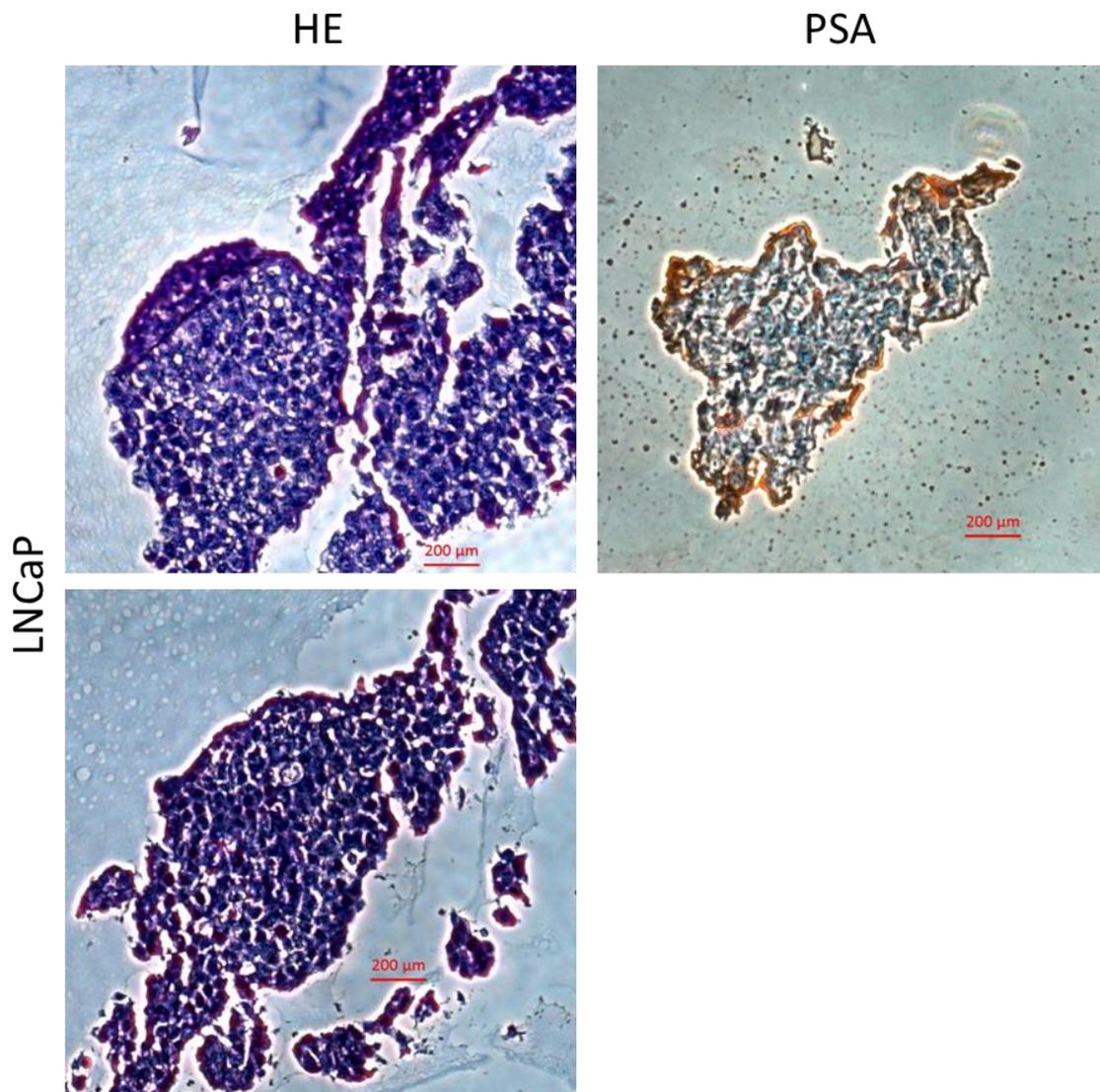
### 3.5.2 HISTOLOGIE ZELLINIE

Nach Anfärbung der Sphäroide der Zelllinie DU145 wird der Aufbau der Sphäroide deutlich. Es handelt sich dabei um Einzelzellen, die aneinandergelagert sind. Es sind keine Strukturen oder Drüsen sichtbar. Die Zelllinie DU145 produziert kein PSA [56].



**Abbildung 35** HE-Färbung von Sphäroiden der Zelllinie DU145. Maßstabsbalken jeweils 200µm

Auch bei Sphäroiden der Zelllinie LNCaP ist die Aneinanderlagerung von Zellen sichtbar. Im Gegensatz zu Zellen der Zelllinie DU145 produziert diese Zelllinie aber das PSA-Protein, was mit der immunohistochemischen Färbung auch angefärbt werden konnte.



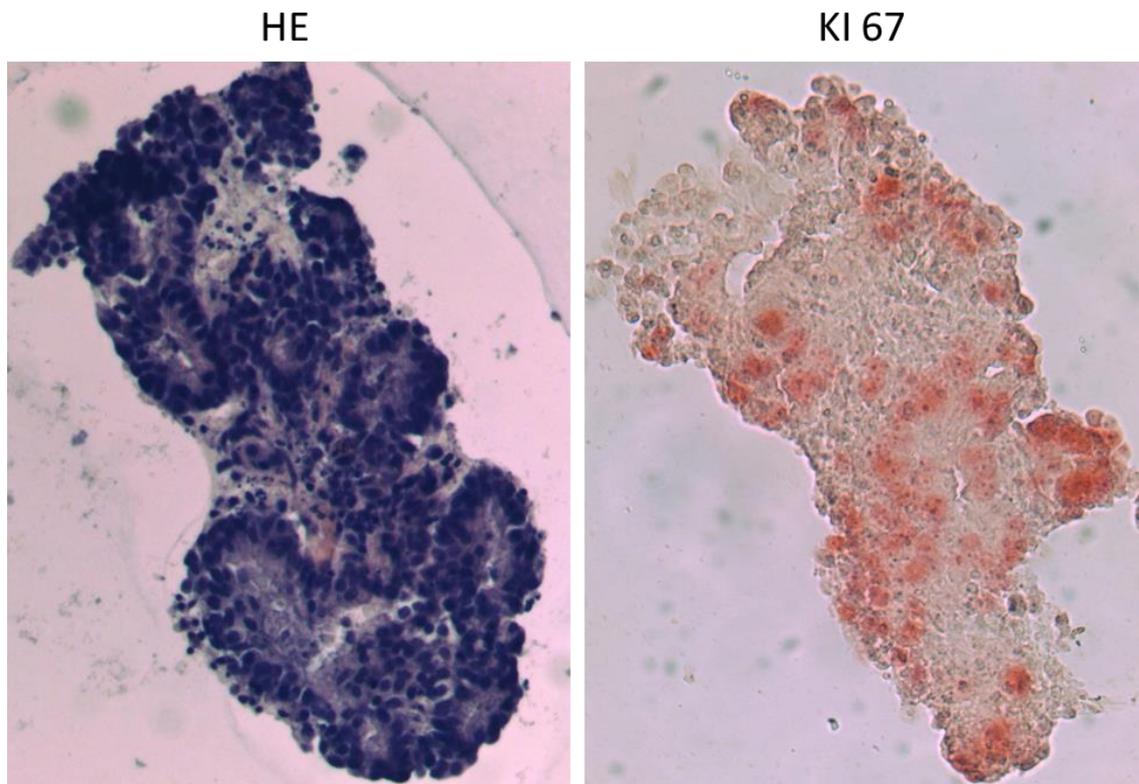
**Abbildung 36** Histologische Färbungen von Sphäroiden der Zelllinie LNCaP. Links HE-Färbung. Rechts IHC Färbung der Zelllinie LNCaP, Färbung gegen PSA. Maßstabsbalken jeweils 200μm

### 3.5.3 HISTOLOGIE PATIENT

Nach Anfärbung der patientenabgeleiteten Mikrotumore wird der grundsätzliche Unterschied zur Zelllinie deutlich. In der HE-Färbung sind drüsenartige Strukturen zu erkennen, wenn auch ohne Lumen. Es sind nicht nur gleiche Zellen wie bei Sphäroiden der Zelllinie zu sehen, sondern auch Bereiche die sich stärker anfärben, und Bereiche, die weniger intensiv blau sind. Der Aufbau des Mikrotumors ähnelt dem Aufbau des Prostatakarzinoms. Der Gleason Score dieses Patienten betrug 7 zum Zeitpunkt der Operation.

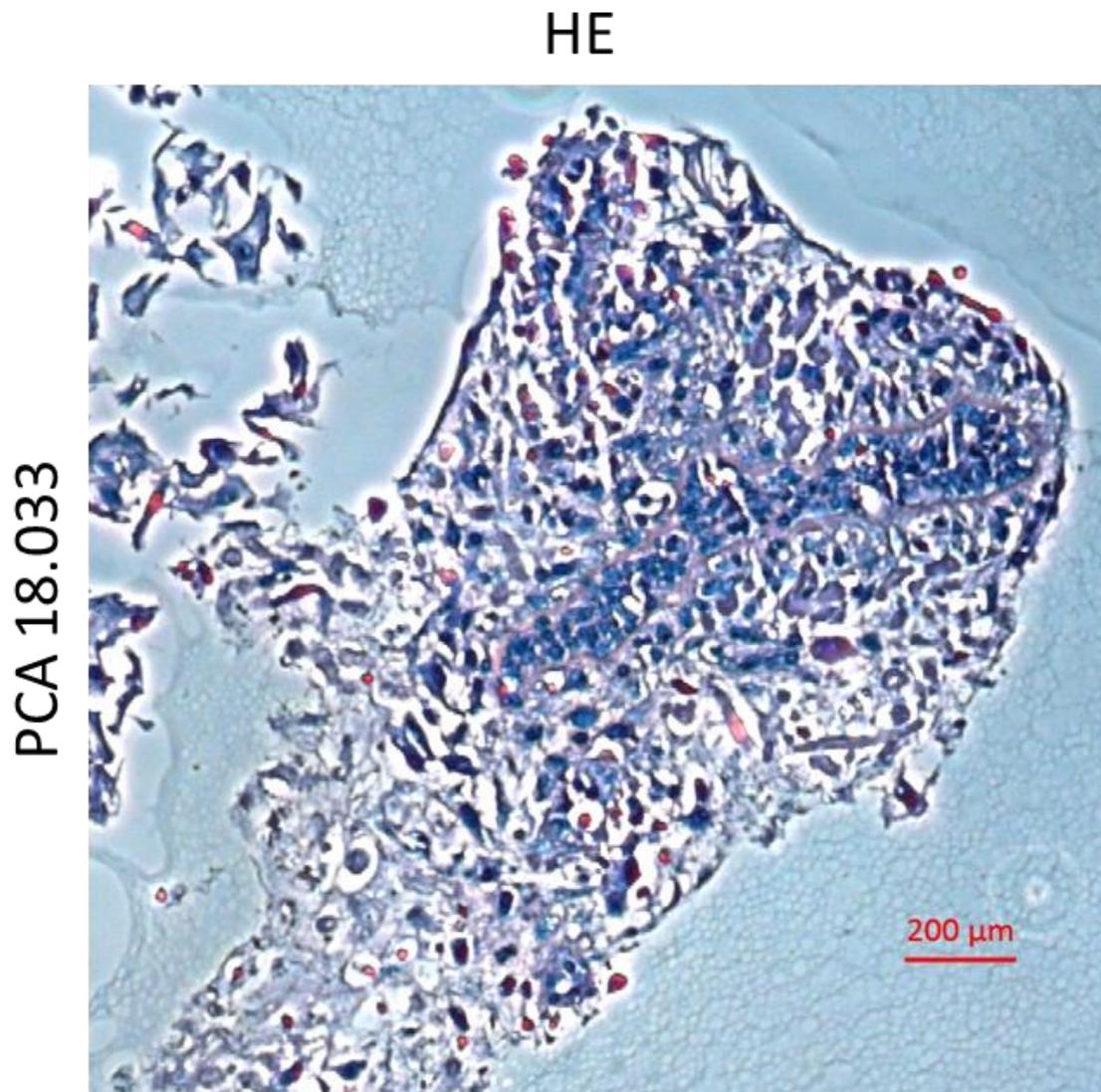
Zusätzlich konnten in der HE-Färbung weitere Merkmale neoplastischen Gewebes beobachtet werden. Dazu zählen ein erhöhtes Nukleus-zu-Zellplasmaverhältnis und eine Hyperchromasie der Tumorzellen.

Bei der KI67-Färbung werden Stellen mit proliferierenden Zellen angefärbt. Interessant ist die Tatsache, dass sich mit dieser Färbung besonders die Ausbuchtungen des Tumors anfärben.



**Abbildung 37** Histologische Färbungen eines Mikrotumors aus Patientenmaterial. Links HE Färbung, rechts gleicher Mikrotumor mit ICH-Färbung. Färbung von KI67. Gleason-Score des Ausgangstumors:7

Auch der zweite angefärbte Mikrotumor enthält verschiedene Strukturen, unter anderem eine drüsenartige Struktur. Der Patient hatte bei Operation einen Gleasonscore von 7.

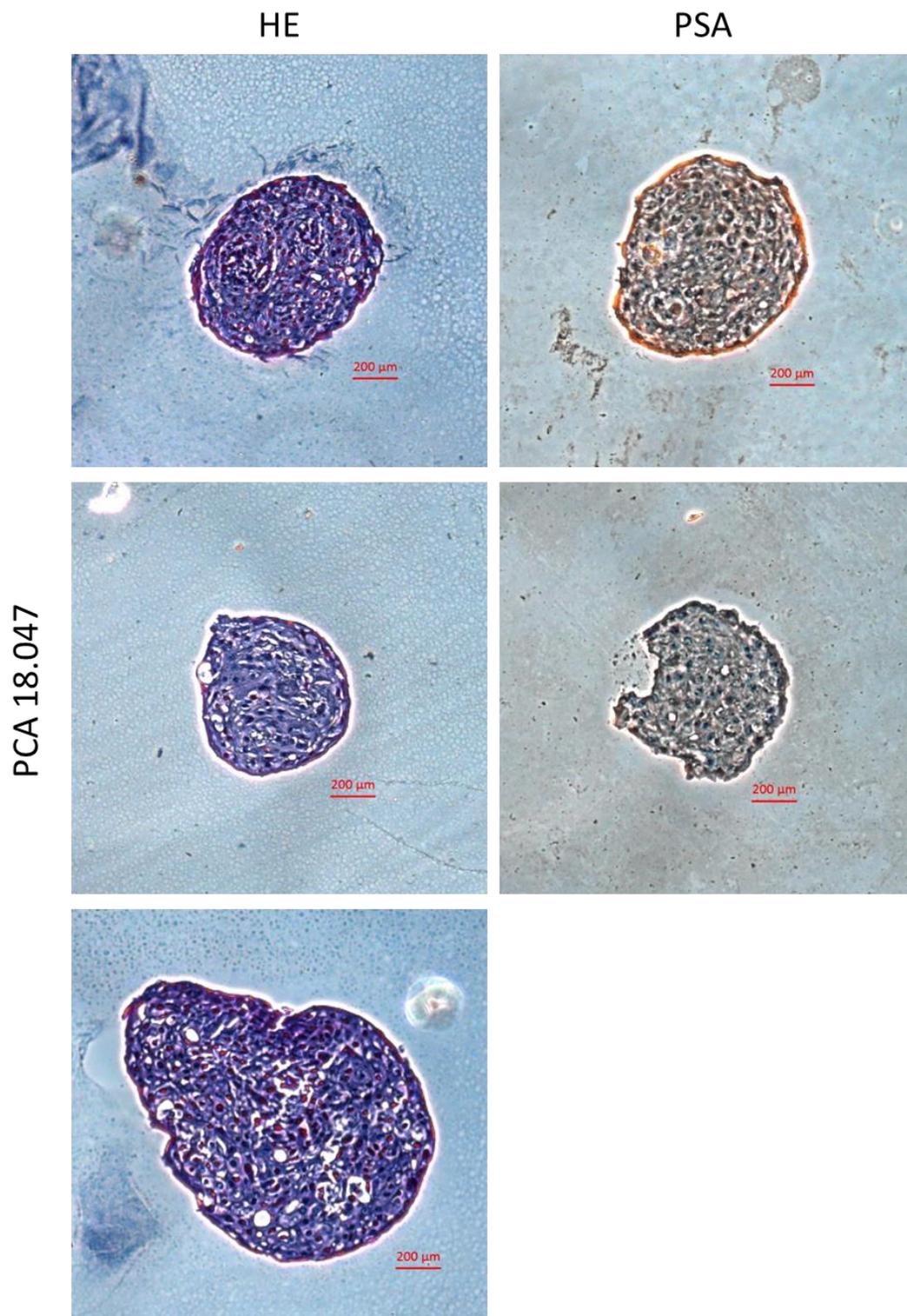


**Abbildung 38** HE-Färbung des Mikrotumors aus Patientenmaterial PCA 18.033. Maßstabsbalken 200μm. Gleason-Score des Ausgangstumors: 7

Das dritte aus patientenabgeleiteten Mikrotumoren gefärbte Material weist im Unterschied zu den vorherigen Mikrotumoren kaum mehr Drüsenstrukturen auf, trotzdem sind aber auch hier unterschiedliche Zelltypen zu sehen und keine bloße Aneinanderlagerung von Einzelzellen. Auch dies passt zum histologischen Befund des Ursprungstumors, der einen Gleason-Score von 9 aufwies. In diesem Stadium sind kaum noch klare Drüsenformationen zu erkennen.

Eine Färbung gegen PSA ergab ein positives Ergebnis, bei der Operation hatte der Patient einen PSA-Wert von 12.

Grundsätzlich konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, Mikrotumore trotz ihrer geringen Größe histologisch und immunhistochemisch zu färben. Der Vergleich zur Zelllinie zeigt deutlich die besonderen Eigenschaften der Mikrotumore, die nicht nur aus Karzinomzellen, sondern zusätzlich aus Bindegewebe und weiteren Zellen bestehen und damit den Originaltumor weitaus besser repräsentieren, als es die Zelllinie könnte. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass mit höherem Gleasonscore des Ausgangstumors die Anzahl an Drüsenstrukturen im Mikrotumor abnimmt.



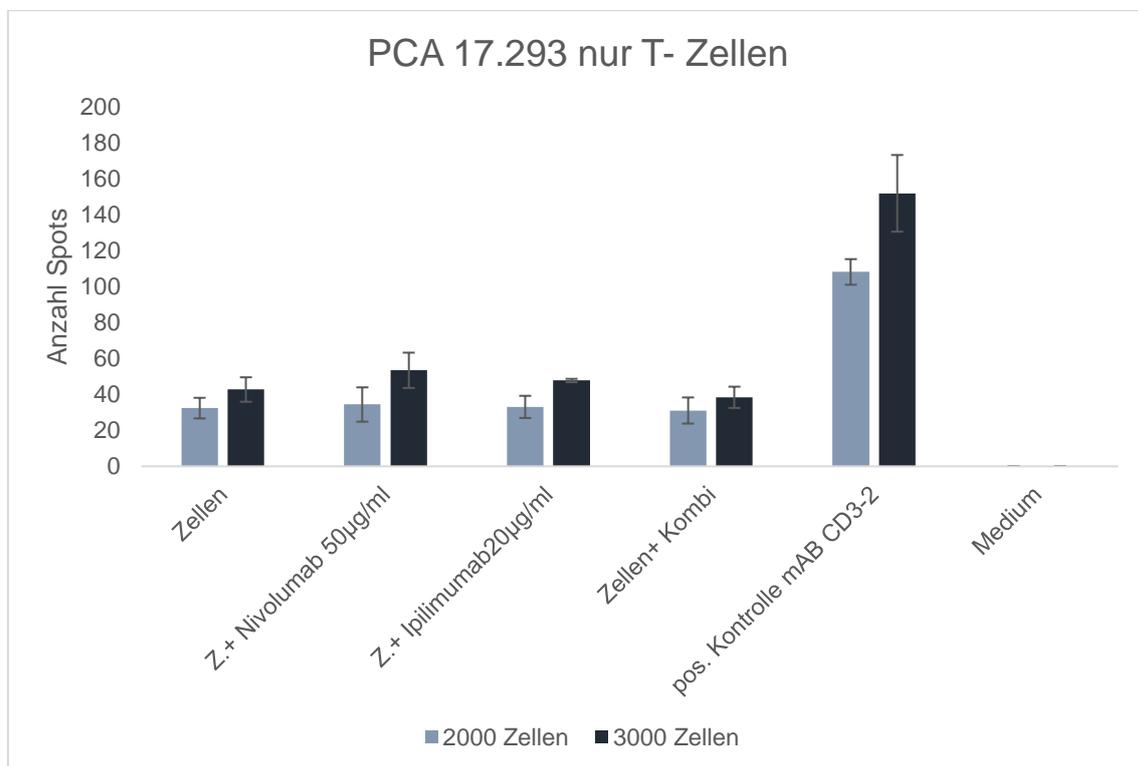
**Abbildung 39** Histologische Färbungen eines Mikrotumors aus Patientenmaterial PCA 18.047. Links HE-Färbung, rechts gleicher Mikrotumor mit IHC-Färbung. Färbung von PSA. Maßstabsbalken 200µm. Gleason-Score des Ausgangstumors: 9

## 3.6 CHARAKTERISIERUNG DER TILS

### 3.6.1 ELISpot

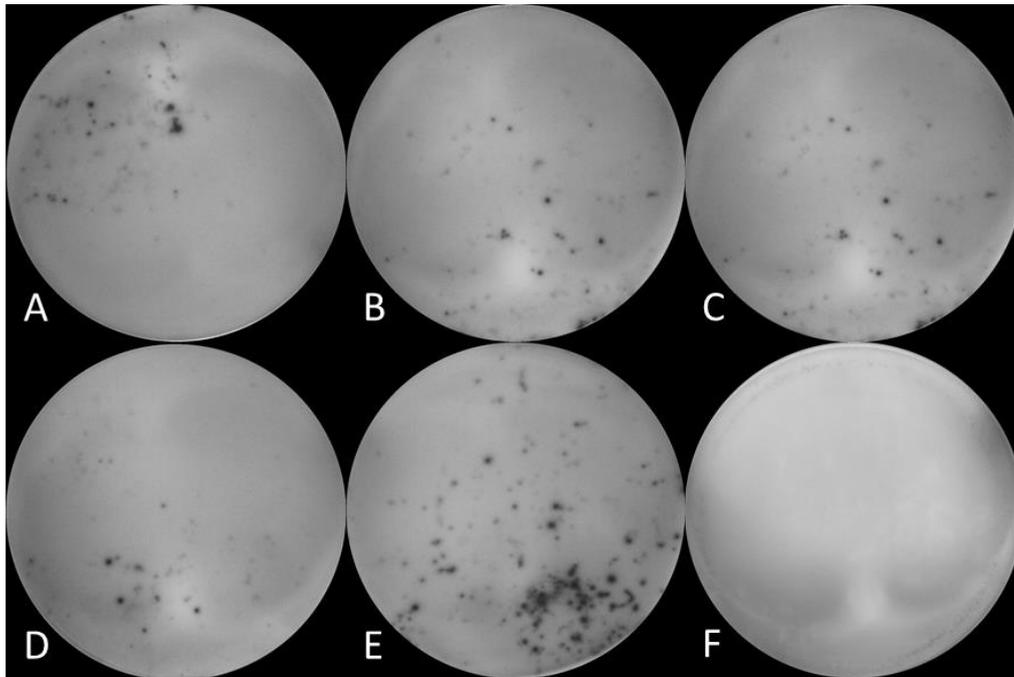
Zur genaueren Charakterisierung der TILs wurde deren Aktivität mittels ELISpot bestimmt. Jeder Punkt auf der ELISpot-Platte steht daher für eine aktive, IFN $\gamma$  produzierende T-Zelle. Dabei sollte die grundsätzliche Aktivität der Zellen sowie deren Ansprechen auf die Checkpoint-Inhibitoren Ipilimumab und Nivolumab getestet werden.

Ohne einen Stimulus, daher ohne Tumorzellen, hatten die TILs eine grundsätzlich geringe Aktivität. Diese war mit einer höheren Anzahl von T-Zellen (2000 vs. 3000 Zellen) etwas höher und stark erhöht bei der Positiv-Kontrolle. Die Checkpoint-Inhibitoren hatten keine Auswirkung auf die Aktivität der TILs.

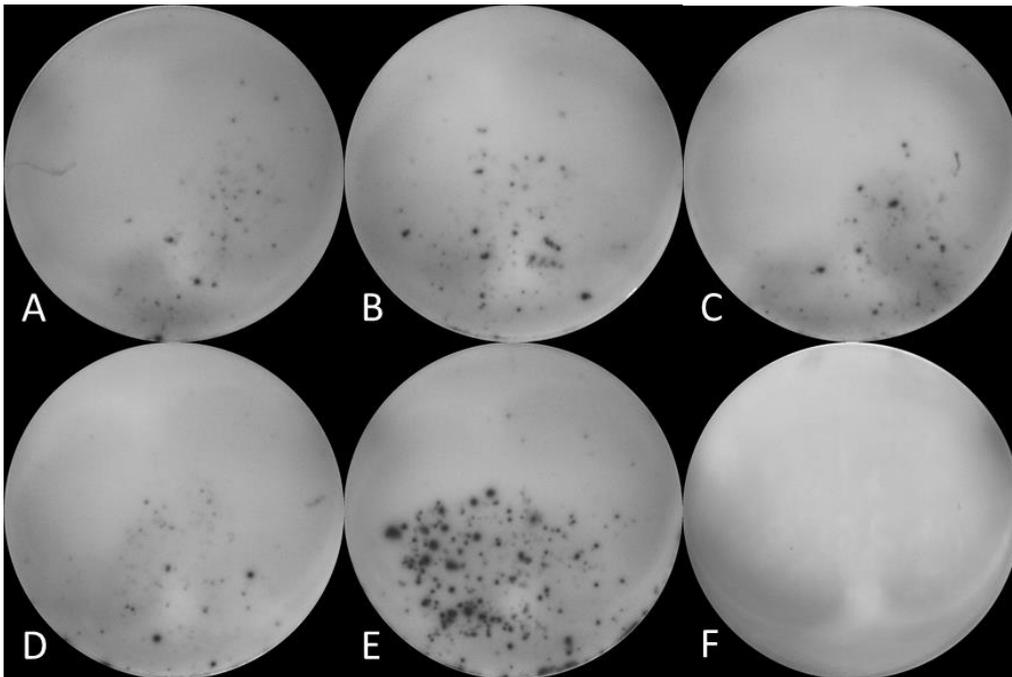


**Abbildung 40** Diagramm ELISpot aus T-Zellen aus Patientenmaterial 17.293, jeweils 2000 bzw. 3000 Zellen

Im Bild wird die grundsätzlich niedrige Aktivität der TILs sichtbar, die nur bei der Positiv-Kontrolle ansteigt.

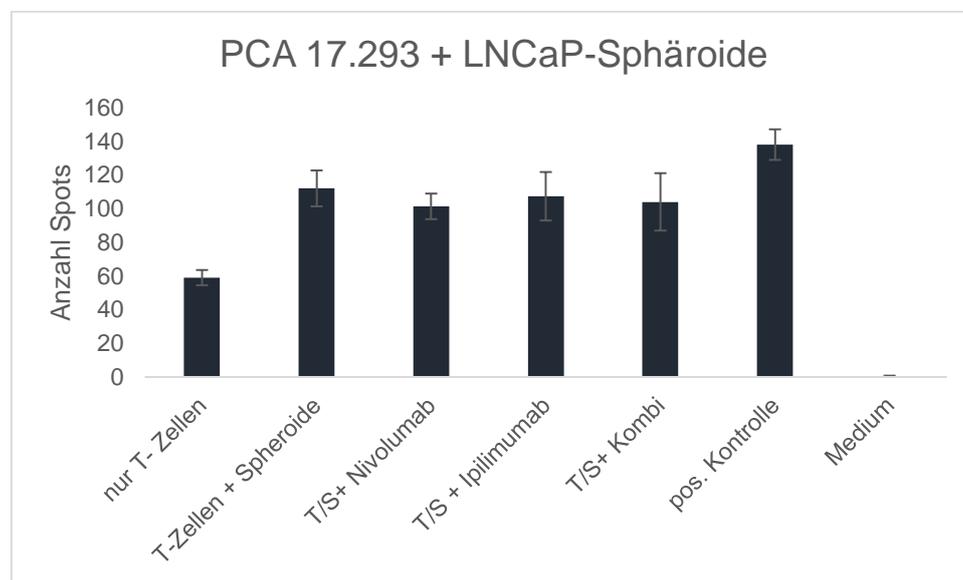


**Abbildung 41** Elispot 2000 Zellen. A: T-Zellen allein, B: T- Zellen + Nivolumab 50 $\mu$ g/ml, C: T-Zellen + Ipilimumab 20 $\mu$ g/ml, D: T-Zellen + Nivolumab 50 $\mu$ g/ml+ Ipilimumab 20 $\mu$ g/ml, E: T- Zellen + mAB CD3-2 (pos. Kontrolle ), F: Mediumkontrolle



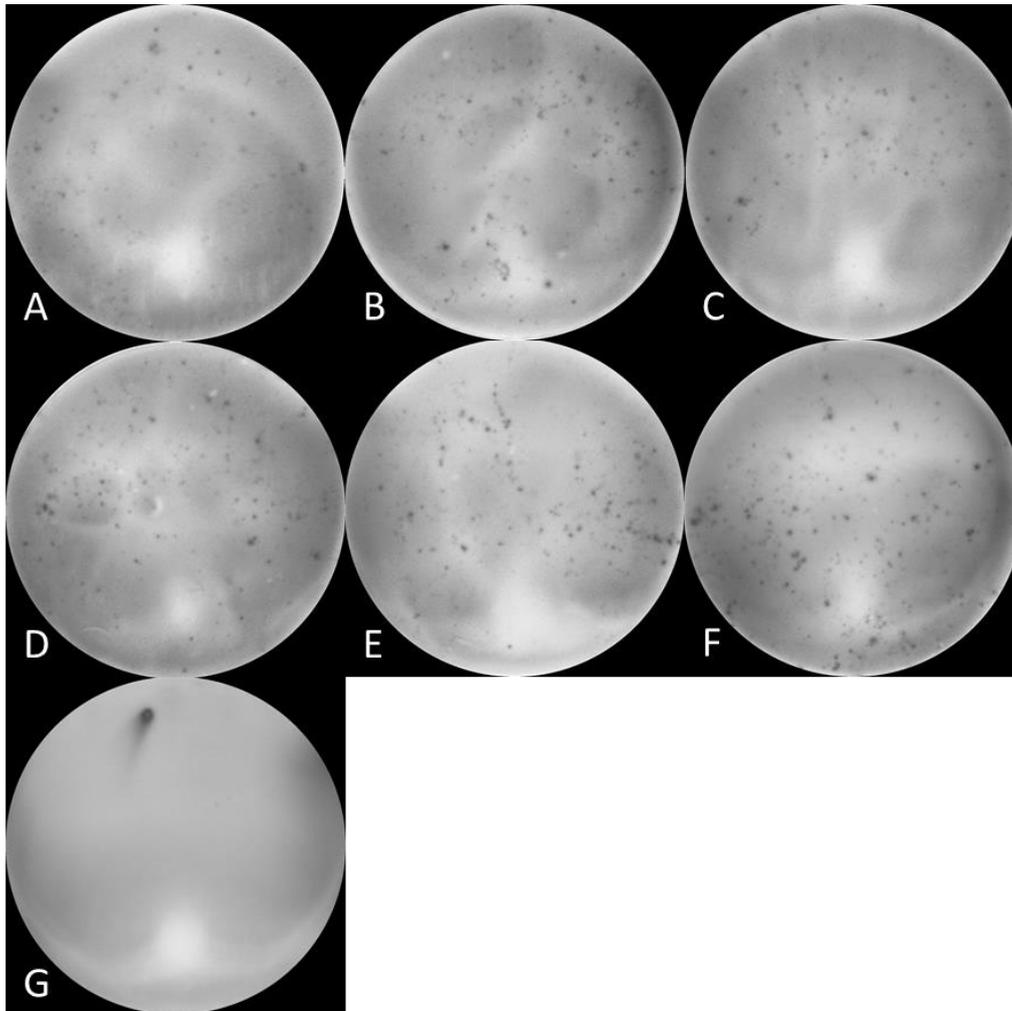
**Abbildung 42** Elispot 3000 Zellen. A: T-Zellen allein, B: T- Zellen + Nivolumab 50 $\mu$ g/ml, C: T-Zellen + Ipilimumab 20 $\mu$ g/ml, D: T-Zellen + Nivolumab 50 $\mu$ g/ml+ Ipilimumab 20 $\mu$ g/ml, E: T- Zellen + mAB CD3-2 (pos. Kontrolle ), F: Mediumkontrolle

Nach Zugabe von LNCaP-Sphäroiden erhöhte sich die Zahl der aktiven TILs auf das ca. zweifache, trotz dass es sich nicht um die Originalmikrotumore des gleichen Patienten handelte. Die Checkpoint-Inhibitoren zeigten weiterhin keine Wirkung auf die TILs.



**Abbildung 43** Diagramm ELISpot aus T-Zellen aus Patientenmaterial 17.293 und Sphäroiden aus der Zelllinie LNCaP. Jeweils 3000 Zellen.

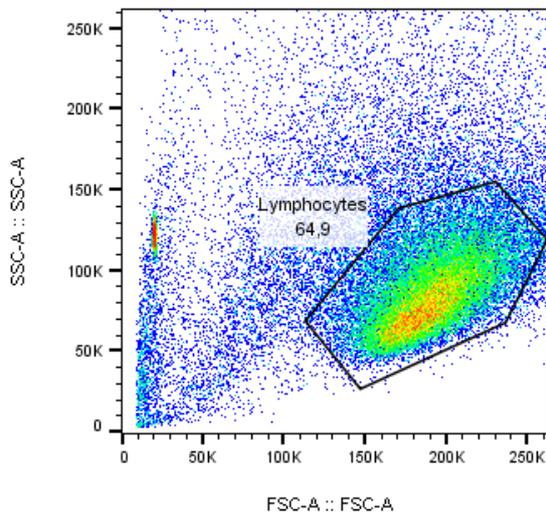
Die Aktivität der TILs steigt zwar nach Zugabe der LNCaP-Sphäroide, jedoch haben die Checkpoint-Inhibitoren keine Auswirkung auf die TILs.



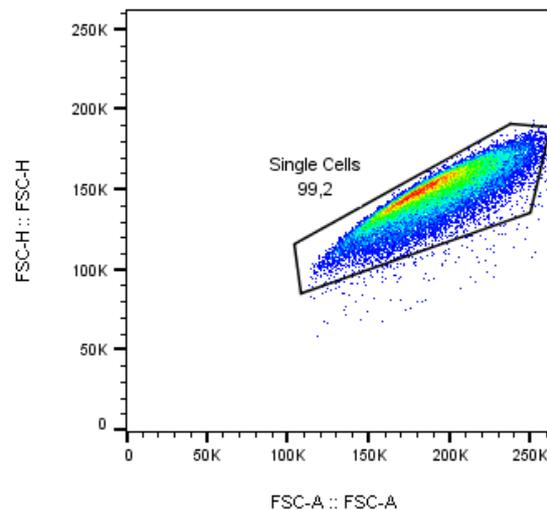
**Abbildung 44** Elispot 3000 Zellen. A: T-Zellen allein, B: T-Zellen+ LNCaP-Sphäroide, C: T- Zellen + LNCaP-Sphäroide + Nivolumab 50µg/ml, D: T-Zellen + LNCaP-Sphäroide+ Ipilimumab 20µg/ml, E: T-Zellen + LNCaP-Sphäroide + Nivolumab 50µg/ml+ Ipilimumab 20µg/ml, F: T- Zellen + LNCaP-Sphäroide +mAB CD3-2 (Pos.-Kontrolle), G: Mediumkontrolle

### 3.6.2 FACS

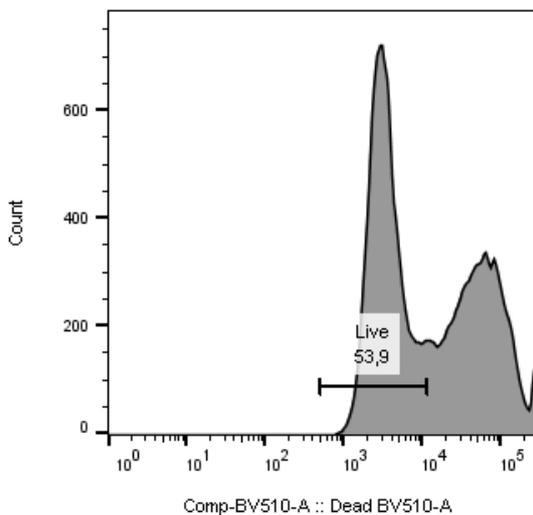
Zur weiteren Charakterisierung der TIL-Population wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Dabei wurden die Oberflächenmarker CD4+, CD8+, das intrazelluläre Protein FOXP3 und tote Zellen angefärbt. In der darauffolgenden Analyse wurden mittels Gating alle Lymphozyten verfolgt, von diesen die Einzelzellen und von den Einzelzellen die lebenden Zellen.



**Abbildung 46** FACS-Analyse der TILs aus Patientenmaterial 17.293. Gating um Lymphozyten

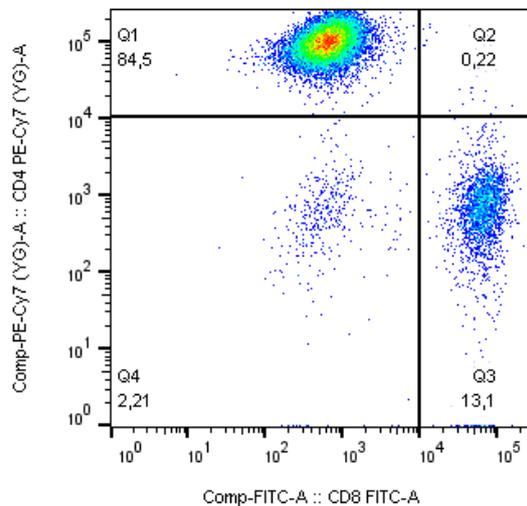


**Abbildung 45** Gating um Einzelzellen

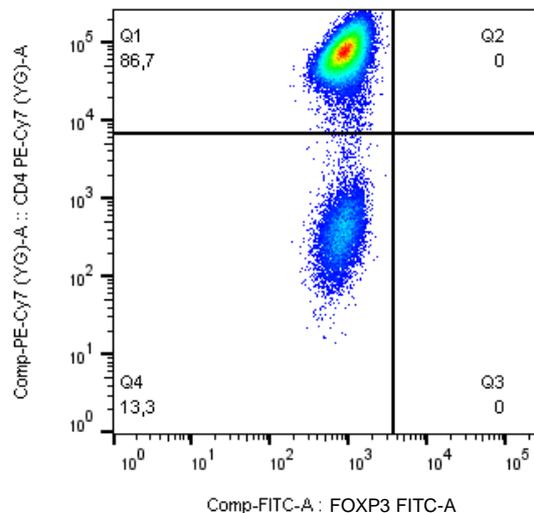


**Abbildung 47** Gating um lebende Zellen

Nach den oben genannten Ausschlusskriterien wurde die Färbung im ersten Ansatz mit CD4 und CD8 ausgewertet. Dabei zeigte sich eine Population von 84,5% CD4+ Zellen und eine Population von 13,1% CD8+ Zellen.



**Abbildung 48** Darstellung der FACS-Analyse aus T-Zellen des Patientenmaterials 18.033. Färbung: CD4+ T-Zellen: 84,5 %, CD8+ T-Zellen: 13,1%



**Abbildung 49** Darstellung der FACS-Analyse aus T-Zellen des Patientenmaterials 18.033. Färbung: CD4+ T-Zellen: 86,7%, Zellen positiv für CD4+ und FOXP3 (T regs): 0%

Im zweiten Ansatz wurden CD4 und FOXP3 angefärbt, um eine Aussage über die Populationsgröße der regulatorischen T-Zellen treffen zu können. Diese sollten sowohl CD4+ als auch FOXP3-positiv sein. Es zeigte sich jedoch, dass in der Probe keine doppelt-positive Population zu finden war. Es zeigten sich lediglich eine CD4+ Population (84,5%) und eine CD4- Population, wobei es sich höchstwahrscheinlich um die CD8-positiven Zellen handelt.

## 4. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit liefert Daten zu Mikrotumoren, die nach radikaler Prostatektomie aus Prostatakarzinomen gewonnen wurden. Die Mikrotumore wurden dabei auf ihr Ansprechen auf routinemäßig verwendete Therapeutika getestet. Zusätzlich wurden die Mikrotumore histologisch charakterisiert. Im Hinblick auf eine mögliche Immuntherapie des Prostatakarzinoms wurden tumorinfiltrierende T-Zellen auf ihren Aktivierungszustand und auf die Zusammensetzung des T-Zell-Pools untersucht.

In der Arbeit sollte untersucht werden, ob die Gewinnung von Mikrotumoren aus Prostatakarzinomgewebe möglich ist und inwieweit diese Mikrotumore als Ex-Vivo-Modell für den Patiententumor dienen können. Dabei stand vor allem die Entwicklung eines Assays zur Quantifizierbarkeit der Sensitivität der Mikrotumore gegenüber verschiedenen Standardtherapeutika im Vordergrund.

In der Literatur sind bereits verschiedene 3D-Modelle in der Krebstherapie bekannt. Zur Herausstellung der Vorteile der patientenabgeleiteten Mikrotumore beschäftigt sich die Arbeit daher ebenfalls mit der histologischen Charakterisierung der Mikrotumore im Hinblick auf deren zelluläre Heterogenität sowie deren Differenzierungsgrad.

Durch die Charakterisierung der TILs sollte der Grundstein für eine Ko-Kultivierung mit den entsprechenden Mikrotumoren gelegt werden, um im nächsten Schritt zu untersuchen, inwieweit die Interaktion von Immunzellen und Tumorzellen Auswirkungen auf das Therapieansprechen haben und Ansatzpunkte für alleinige Immun- oder Kombinationstherapien (Immun- und Chemotherapie) bestehen.

#### **4.1 GEWINNUNG VON MIKROTUMOREN AUS PROSTATAKARZINOMGEWEBE**

Es wurde untersucht, inwieweit die Gewinnung von Mikrotumoren aus Patientenmaterial, gewonnen aus Präparaten nach radikaler Prostatektomie, möglich ist. In den untersuchten Proben (n= 18) war es bei 15 Proben möglich, Mikrotumore zu präparieren. Die Abänderung des Protokolls mit den Verdauenzymen Liberase vs Collagenase/Hyaluronidase sowie eine Abänderung der Verdauzeiten zeigte keinen Effekt auf die Anzahl der gewonnenen Mikrotumore. Auswirkung auf die Menge der erhaltenen Mikrotumore zeigte einzig die Größe der Probe. Ob andere Parameter wie der Gleason-Score oder das TNM-Stadium eine Rolle bei der Anzahl der gewonnenen Mikrotumore spielen, bleibt aufgrund der für diese Analyse zu geringen Probenanzahl zu evaluieren. Die Präparation der Mikrotumore erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Kondo et al. [49]. Die Gruppe zeigte, dass eine Mikrotumorgewinnung aus Kolonkarzinom möglich ist, allerdings mit weitaus höheren Anzahlen von Mikrotumoren als die durchschnittlichen 21 Mikrotumore in der vorliegenden Arbeit. Es spiegelt sich jedoch auch in anderen Arbeiten wieder, dass eine Präparation von Mikrotumoren aus Prostatakarzinomgewebe von Patienten mit einer relativ niedrigen Erfolgsrate einhergeht. Drost et al. kamen bei Untersuchungen von Prostatakarzinomgewebe von Maus und Mensch zu ähnlichen Ergebnissen. Sie hatten bei der Etablierung von Sphäroiden mithilfe eines Matrigels eine Erfolgsquote von 15 - 20% bei fortgeschrittenem Prostatakarzinom, ebenfalls aufgrund der geringen Menge an Karzinomgewebe [57]. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Dong et al. in ihrer Arbeit über Mutationen in Prostatakarzinomsphäroiden, ebenfalls mit einer Erfolgsquote von 15- 20%, in denen die Etablierung einer Sphäroidkultur gelang [58].

Der Großteil der Untersuchungen an Sphäroiden in der Literatur fand bisher an Sphäroiden aus Zelllinien statt. Dieses Modell wurde aufgrund der größeren Menge an Sphäroiden auch in der vorliegenden Arbeit genutzt. Chambers et al. und Mosaad et al. nutzten zellabweisende Oberflächen, um eine

Sphäroidformatierung der Zelllinie zu bewirken [59] [60]. Lang et al. dagegen arbeiteten mit Matrigel, in dem sich die Sphäroide der Zelllinie formatieren konnten [61]. In dieser Arbeit wurden Sphäroide wie bei Chambers et al. in Flaschen mit zellabweisender Oberfläche generiert. Der Versuch Mikrotumore in Hydrogel zu züchten lag der Idee zugrunde aus den wenigen vorhandenen Zellen neue Mikrotumore in 3D auswachsen zu lassen, um so mehr Mikrotumore zu generieren. Es zeigte sich jedoch kein Wachstum. Daher wurde nur mit Mikrotumoren gearbeitet, die direkt aus dem Frischgewebe gewonnen wurden.

## **4.2 SUBSTANZTESTUNGEN AN MIKROTUMOREN**

In der vorliegenden Arbeit sollte die Sensitivität der aus Patientengewebe isolierten Mikrotumore auf Standardtherapeutika untersucht werden. Dazu wurden die Medikamente Docetaxel, ein Zytostatikum, und Enzalutamid, ein Inhibitor des Androgenrezeptor-Signalweges, getestet.

Im Celltox-Green-Cytotoxicity-Assay wurden verschiedene Konzentrationen von 0 $\mu$ M bis 20 $\mu$ M Docetaxel an Sphäroiden der Zelllinien DU145 und LNCaP getestet. Es zeigte sich jedoch kein dosisabhängiger Effekt auf die Sphäroide. Allerdings weist sogar der Hersteller darauf hin, dass dieser Assay für die Verwendung von 2D-Zellkulturen entwickelt und validiert wurde [62]. Grundsätzlich sollte es aber möglich sein, Sphäroide mit dem CelltoxGreen Farbstoff anzufärben, da der Farbstoff klein genug ist, die Sphäroide zu penetrieren. Um diesen Assay für die Verwendung mit Sphäroiden der Prostatakarzinomzelllinien zu validieren, könnte daher die Anzahl der Mikrotumore pro Well erhöht werden. Es wurden jedoch schon im in der Arbeit verwendeten Assay ca. 15 Sphäroide pro Well verwendet. Eine Erhöhung dieser Zahl wäre zwar bei der Verwendung von Zellliniensphäroiden kein Problem, jedoch wäre der Assay dann nicht mehr auf die patientenabgeleiteten Mikrotumore anwendbar, da bei diesen die Zahl der vorhandenen Mikrotumore beschränkt ist.

Eine weitere Überlegung ist, die Anzahl der Konzentrationen des zu testenden Medikaments zu erhöhen. Im Assay war die Fluoreszenz schon zu Beginn erhöht. Daher war der Fluoreszenzanstieg möglicherweise nicht stark genug, um diesen vom Hintergrund abzuheben.

Aufgrund der beschränkten Anzahl an Mikrotumoren aus Patientengewebe wurde daher mit dem Mikroskopie-Assay weitergearbeitet. Dabei wurden die Sphäroide aufgrund ihrer Größe sowie in einem weiteren Versuch aufgrund der Relation der Fläche toter Zellen zur Gesamtfläche des Sphäroids ausgewertet. Es zeigte sich, dass mit dieser Art der Analyse konzentrationsabhängige Effekte sichtbar sind. Aufgrund der geringeren Anzahl an Sphäroiden, die für diese Form der Auswertung nötig sind, war der Assay auch auf patientenabgeleitete Mikrotumore anwendbar.

Dass die Zelllinie DU145 in diesem Assay kaum reagiert war zu erwarten, da es sich um eine androgenunabhängig wachsende Zelllinie handelt. Sie exprimiert den Androgenrezeptor nur in weit geringerer Menge als z.B., die Zelllinie LNCap. Mutationen in den Genen des Androgenrezeptors hemmen dessen Aktivität zusätzlich. [63, 64] Die Wirksamkeit von Enzalutamid entsteht aber durch die Hemmung des Androgenrezeptorsignalweges. Wächst die Zelllinie androgenunabhängig, sollte eine Hemmung dieses Signalweges keinen Effekt aufweisen. Im Gegensatz zur Zelllinie DU145 wächst die Zelllinie LNCaP androgenabhängig, daher war ein stärkerer Effekt des Enzalutamids zu erwarten, was sich auch bestätigt hat. Zu ähnlichen Ergebnissen ist auch die Arbeitsgruppe um Sekhar gekommen, die die Zelllinie DU145 auf das Ansprechen auf Enzalutamid mit nachfolgender Bestrahlung untersucht hat. Auch hier zeigte sich ein weit besseres Ansprechen der androgensensitiven Zelllinie 22Rv1 auf die Vorbehandlung mit Enzalutamid als die kastrationsresistente Zelllinie DU145.

Das Prinzip, die Analyse der Mikrotumore auf deren mikroskopisches Erscheinungsbild zurückzuführen, wurde schon von zahlreichen weiteren Arbeitsgruppen angewendet. Stock et al. analysierten verschiedene 3D-Sphäroide, entstanden im Matrigel oder in Suspension als Endpunkt-Assay in Bezug auf deren Größenänderung nach Behandlung mit verschiedenen

Chemotherapeutika. Die Reduktion der Sphäroidgröße stimmte dabei mit zuvor über den CellTiter-Glo®-3D-Cell-Viability-Assay von Promega ermittelten Wachstumskurven überein. Es zeigte sich ein IC50-Wert von 14.3µM Docetaxel bei der Behandlung von LNCaP-Sphäroiden, die als Suspensionskultur gewachsen waren[65]. In der Arbeit durchgeführten Assay war bei dieser Konzentration ebenfalls ein deutlicher Anstieg der toten Zellen zu verzeichnen.

Jenkins et al. analysierten Sphäroide ebenfalls mikroskopisch. Wie in der vorliegenden Arbeit werteten sie dazu das Verhältnis lebender zu toter Zellen aus [51]. In dieser Arbeit stand allerdings der Einfluss von Checkpointinhibitoren auf die Kokultur von Sphäroiden und T-Zellen im Fokus und nicht der Test chemotherapeutisch wirksamer Substanzen.

Eine weitere Möglichkeit, den Einfluss von zytotoxischen Substanzen zu evaluieren, wäre die Methode von Mosaad et al., die den Einfluss von Docetaxel und Enzalutamid auf Sphäroide der Zelllinie LNCaP ebenfalls mithilfe konfokaler Mikroskopie auswerten, allerdings in Bezug auf den Stoffwechsel. Die Sphäroide wurden mithilfe des Almar-Blue-Assays, der lebende Zellen aufgrund ihrer mitochondrialen Aktivität pink färbt, ausgewertet. Zusätzlich wurde der Durchmesser der Sphäroide bestimmt. Bei der Behandlung mit Enzalutamid zeigte sich dabei, dass die Minderung an verfügbaren Androgenen kaum Einfluss auf das Wachstum der Sphäroide hatte. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch ein, wenn auch geringer, Anstieg toter Zellen ab Konzentrationen von 10 – 20µM beobachtet werden.

Grundsätzlich sind die Ergebnisse des Mikroskopie-Assays deutlich besser mit dem Patiententumor vergleichbar als Substanztests an 2D-Zelllinien. Erstere sind oft sehr viel sensitiver auf die getesteten Substanzen. Zu diesem Ergebnis kommen auch Chambers et al., die ebenfalls den Einfluss von Docetaxel auf LNCaP-Sphäroide untersuchten. Dies könnte darin begründet liegen, dass die Zellen in 3D-Sphäroiden langsamer proliferieren und der Einfluss von Docetaxel auf die Zellen daher geringer ausfällt [59].

Der große Vorteil einer mikroskopischen Auswertung der Sphäroide besteht in der geringeren Anzahl benötigter Sphäroide. Daher kann diese Art der

Auswertung, im Vergleich zu einem Assay basierend auf dem Fluoreszenzanstieg, auch mit Mikrotumoren des Patienten durchgeführt werden. Der Nachteil dieser Auswertemethode ist die zeitaufwändige Gewinnung der Bilder und deren Auswertung.

In weiteren Versuchen können nun weitere Substanzen auf ihre Zytotoxizität an Zelllinien getestet werden. Nach dem Test an Zelllinien würde dann die Testung an patientenabgeleitetem Material erfolgen. Sehr interessant wäre auch die Testung einer Kombination von Substanzen und deren Auswirkung auf die Sphäroide bzw. Mikrotumore.

### **4.3 HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DER MIKROTUMORE**

Um die patientenabgeleiteten Mikrotumore und Sphäroide der Zelllinien histologisch genauer zu charakterisieren, wurden aus diesen 5µM-Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden dann mit HE-Färbung und immunhistochemischer Färbung gegen KI67 und PSA gefärbt.

Es zeigte sich, dass die Mikrotumore einerseits klar in ihrer Struktur von den aus Zelllinien gewonnenen Sphäroiden unterschieden werden konnten, andererseits, dass die Mikrotumore Strukturen aufwiesen, die auch im Prostatakarzinom vorkommen.

Um die Mikrotumore einbetten zu können, wurde HistoGel benutzt. Dieses durchdringt die Proben und macht es möglich, selbst kleinste Gewebeproben zu schneiden. Auch Wong et al. [52] betteten ihre Sphäroide in dieses Medium ein und erreichten gute Ergebnisse.

Als weitere Methode zur Einbettung von Mikrotumoren kann wie bei Jeppesen et al. [66] 2% Agarose verwendet werden. Eine Weiterentwicklung des Einbettmediums besteht in einer Mischung von 2,5% Agarose und 2,5% Gelatine [53].

Nach erfolgter Färbung konnte beobachtet werden, dass die Mikrotumore Merkmale neoplastischen Gewebes enthielten wie ein erhöhtes Nukleus zu

Zellplasmaverhältnis, Hyperchromasie der Tumorzellen sowie prominente Nukleoli und drüsenartige Strukturen ohne Lumen. Zu diesen Resultaten kamen auch Jeppesen et al. [66] bei ihren Untersuchungen an Mikrotumoren aus Kolonkarzinomen.

#### **4.4 UNTERSUCHUNGEN AN TUMORINFILTRIERENDEN LYMPHOZYTEN**

Zusätzlich zu den Mikrotumoren sollten auch die tumorinfiltrierenden Lymphozyten charakterisiert werden, um deren Ansprechen auf die Checkpoint-Inhibitoren Ipilimumab und Nivolumab in Anwesenheit von Sphäroiden zu testen. Dazu wurde mittels ELISpot die Aktivität der T-Zellen und deren Reaktion auf Checkpoint-Inhibitoren analysiert. Mittels FACS Analyse wurden die verschiedenen T-Zell-Populationen charakterisiert.

Es konnte in Anwesenheit von Sphäroiden der Zelllinie LNCaP eine Aktivitätssteigerung der T-Zellen beobachtet werden. Die Checkpoint-Inhibitoren hatten jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität der T-Zellen. Dies war für Nivolumab allerdings zu erwarten, da die Zelllinie LNCaP kein PD-L1 exprimiert [67].

Grundsätzlich ist das Prostatakarzinom ein eher mäßig immunogener Tumor. Erste Therapieansätze zeigen sich in der Zulassung des Impfstoffs Sipuleucel in den USA [34]. Patienten mit guten prognostischen Faktoren haben hier die größten Chancen, tatsächlich von dieser Therapie zu profitieren [68]. Trotzdem waren Versuche, die beim Melanom gut wirksamen CTLA-4 Inhibitoren als Monotherapie anzuwenden, kaum erfolgreich [69]. Derzeit wird untersucht, ob eine Kombinationstherapie mit zum Beispiel der Androgendeprivationstherapie die Therapie mit CTLA-4 oder PD-L1/ PD-1 Antikörpern erfolgreicher macht. [68]. So wurde in der aktuellen Checkmate 650 Studie eine Kombinationstherapie aus Nivolumab und Ipilimumab verabreicht, bei der sich bei 25% der Patienten nach 11 Monaten eine signifikante Reaktion auf die Therapie zeigte. Aufgrund der starken Nebenwirkungen erhielt jedoch nur ein Viertel der Patienten die

geplanten 4 Zyklen [70]. In der Keynote Studie 199 konnte zudem eine Reaktion auf den PD-1 Inhibitor Pembrolizumab gezeigt werden [71]. In der Keynote Studie 365 wurde Pembrolizumab noch mit Olaparib, einem PARP- Inhibitor kombiniert. Nur 7% der Patienten wiesen jedoch eine signifikante Reduktion des Tumorgewebes auf. Die Untergruppe der Patienten mit Tumor nur im Weichteilgewebe profitierte am meisten von der Therapie. Die, im Gegensatz zu anderen Tumoren eher geringe Reaktion auf PD-Inhibitoren in der Prostatakarzinomtherapie kann auch auf die geringe Expression von PD-L1 auf dem Prostatakarzinomgewebe zurückzuführen sein. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass, sobald T-Zellen in den Tumor einwandern, sowohl die Aktivität der T-Zellen als auch die Expression von Checkpoints wie CTLA-4 und PD-1 ansteigt, um eine Überreaktion des Immunsystems zu verhindern. Dies führt auch zu einer Hochregulierung von PD-L1 im Tumorgewebe. Damit könnte eine Therapieoption in der Kombination von Sipuleucel-T, welches die T-Zellen zum Einwandern in den Tumor bringt, und Nivolumab bestehen.

Aufgrund der geringen Expression von PD-L1 in Sphäroiden der Zelllinie LNCaP war im Versuch keine Reaktion der TILs auf die Zugabe von Nivolumab zu erzielen. Es bleibt jedoch zu untersuchen, ob die Checkpoint-Inhibitoren eine Wirkung bei, durch Mikrotumore des gleichen Patienten stimulierten, T-Zellen, erzielen. Auch eine etwaige Wirkung der Checkpoint-Inhibitoren in Kombinationstherapie oder nach vorausgegangener antiandrogener Therapie bleibt zu untersuchen. Zudem zeigte sich in den genannten Studien, dass nur ein geringer Anteil der Patienten tatsächlich eine Reaktion auf die Checkpointinhibitoren hat. In der vorliegenden Arbeit wurden T-Zellen von wenigen Patienten getestet, was das Ausbleiben einer Reaktion erklären kann.

Zusätzlich wurde die Größe der Populationen an CD4+, CD8+ und regulatorischen T-Zellen untersucht. Es konnte jedoch keine Population an regulatorischen T-Zellen gefunden werden.

Die Anwesenheit von regulatorischen T-Zellen war in Untersuchungen von Davidsson et al. mit einem erhöhten Risiko, an dem Prostatakarzinom zu versterben, verknüpft. Beim Vergleich der Proben in der Quartile mit den

wenigsten regulatorischen T-Zellen mit der Quartile mit den meisten regulatorischen T-Zellen ergab sich ein beinahe zweifach erhöhtes Risiko, am Prostatakarzinom zu versterben. Die Anzahl der CD4+ und CD8+ Zellen konnten in der Studie jedoch nicht mit dem Tumorstadium oder dem Gleasongrading korreliert werden [72].

Um zu beobachten, inwiefern sich die Zusammensetzung der T-Zell-Populationen ändert und ob diese einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf des Patienten haben, sind weitere Untersuchungen notwendig. Die grundsätzliche Möglichkeit, diese Untersuchungen an aus dem Tumorgewebe isolierten T-Zellen durchzuführen, wurde aber in der vorliegenden Arbeit gezeigt.

#### **4.5 LIMITIERENDE FAKTOREN**

Die vorliegende Arbeit weist folgende relevanten Limitationen auf:

Durch die geringe Zahl von 18 Patientenproben, aus denen bei 15 Proben Mikrotumore generiert werden konnten, kann keine allgemeingültige Aussage über das Verhalten von Mikrotumoren des Prostatakarzinoms in der Kultivierung, Substanztestung und Histologie getroffen werden. Da es sich bei dieser Arbeit allerdings um eine Pilotstudie handelt, stand mehr die Etablierung der einzelnen Protokolle im Vordergrund. Mit diesen Methoden kann dann an einer größeren Studienkohorte weitergearbeitet werden.

Die Auswertung des Mikroskopie-Assays wurde aufgrund der einfacheren Handhabung anhand von 2D-Bildern vorgenommen. Da es sich bei den Mikrotumoren und Sphäroiden jedoch um 3D-Konstrukte handelt, kann es bei dieser Arte der Auswertung zu Fehlern kommen. Die Ergebnisse anhand der 2D-Auswertung spiegeln dennoch wieder, was mit dem bloßen Auge in 3D sichtbar war.

Der Mikroskopie-Assay wurde nur an einem, die Histologie an drei Patiententumoren durchgeführt. Dies ist natürlich zu wenig, um allgemeingültige Aussagen zu treffen. Doch auch hier stand die Etablierung eines Assays mit in

der Auswertung signifikanten Unterschieden zwischen Behandlung und Kontrolle im Vordergrund. Dieser Assay muss dann an mehreren Patientenproben bestätigt werden.

Im ELISpot wurden aufgrund der geringen Zahl an verfügbaren Mikrotumoren Sphäroide der Zelllinie LNCaP als Stimulus für die T-Zellen genutzt. In weiteren Tests wäre eine nochmalige Durchführung dieses Versuchs mit Mikrotumoren und T-Zellen des gleichen Patienten wichtig und interessant.

Ein weiterer limitierender Faktor ergibt sich aus dem untersuchten Patientenkollektiv. Es wurde Gewebe, gewonnen nach RPE verwendet. Das Ziel des Projekts ist jedoch die Etablierung eines patientenabgeleiteten Modells zu Darstellung der Effektivität einer Chemotherapie oder anderen systemischen Therapie, die bei Patienten im hormonsensiblen metastasierten Stadium Anwendung findet. Bei diesen Patienten wird jedoch außerhalb der Biopsie zur Diagnosesicherung in der Regel kein Gewebe entnommen. Es wäre daher unethisch gewesen diesen Patienten zusätzlich operativ Gewebe zu entnehmen. Da bei Patienten im hormonsensiblen lokal fortgeschrittenen Stadium jedoch ein hohes Rezidivrisiko besteht, kommt das untersuchte Patientenmaterial dem eigentlich zu untersuchenden Patientenkollektiv sehr nahe.

## **4.5 SCHLUSSFOLGERUNG**

Die vorliegende Arbeit ist eine Pilotarbeit zu geplanten Untersuchungen an aus Prostatakarzinomgewebe gewonnenen Mikrotumoren. Sie zeigt die Möglichkeit der Kultivierung der Mikrotumore auf, was in bisherigen Studien nur für andere humane Karzinomgewebe gezeigt wurde. Zudem wurde ein Assay zur Testung verschiedener zytotoxischer Substanzen entwickelt, der angepasst ist an die Besonderheiten des Prostatakarzinoms, daher vor allem die geringe Zahl an Mikrotumoren. Zur Bestätigung der Hypothese, dass die Mikrotumore dem Patiententumor in Ihren histopathologischen Eigenschaften ähneln, wurden

histologische Färbungen vorgenommen. Zusätzlich wurden die TILs genauer charakterisiert, da in nachfolgenden Studienebenenfalls eine Ko-Kultivierung von Mikrotumoren mit TILs geplant ist.

Zur Validierung der oben genannten Beobachtungen sind weitere Untersuchungen notwendig. Die Beobachtungen können aber als vielversprechend für die weitere Arbeit zur Etablierung eines Ex-vivo-Modellsystems aus Mikrotumoren der Prostata angesehen werden.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Prostatakarzinom ist der häufigste solide Tumor des Mannes und damit ein sehr wichtiges Thema der urologischen Forschung. Die vorliegende Arbeit beschreibt ein Modell an dem an dem anhand eines 3D-Modells, gewonnen aus dem Tumor des Patienten, verschiedene Substanzen getestet werden können. So kann das Ansprechen des Tumors auf die Therapie in vitro bestätigt werden. Ein solches Modellsystem für das Prostatakarzinom fehlt bisher, für andere Tumorentitäten wie das Kolonkarzinom wurden bereits erste Studien durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde an der Etablierung des Modellsystems gearbeitet. Aus Patientengewebe wurden durch mechanische Zerkleinerung und Verdau Mikrotumore gewonnen, an denen dann weitere Tests durchgeführt wurden. Die Vorteile dieses Modells liegen auf der Hand: im Vergleich zu Xenografts ist deren Präparation einfach, schnell und billig. Im Vergleich zu in 2D wachsenden Zelllinien ist ein Gradient von Sauerstoff und Nährstoffen vorhanden, was dem Orginaltumorgewebe näherkommt und nicht zuletzt liefert dieses Modell individuelle Ergebnisse für den jeweiligen Patienten, da die Tests direkt am Tumorgewebe des Patienten stattfinden. Auch in der präklinischen Forschung könnte dieses Modell zur Anwendung kommen und damit den Einsatz von Tierversuchen minimieren.

Im ersten Schritt der Arbeit wurden dazu die Präparationsbedingungen zur Gewinnung der Mikrotumore optimiert, es zeigte sich jedoch eine starke Abhängigkeit der Anzahl erhaltener Mikrotumore von der Größe der Probe. Dies ist allerdings ein in der Literatur bekanntes Problem. Im nächsten Schritt wurden Substanztestungen an den Mikrotumoren durchgeführt, bei denen sich signifikante Ergebnisse bei Behandlung der Mikrotumore mit Docetaxel und Enzalutamid zeigten. Die Mikrotumore wurden dazu mit den genannten Substanzen inkubiert und die Rate lebender zu toter Zellen ausgewertet. Die Auswertung dieser Experimente erfolgte anhand konfokaler Mikroskopie. Schließlich erfolgte eine histologische Charakterisierung der Mikrotumore, wobei die Methodik der Einbettung der Mikrotumore in Paraffin etabliert wurde. Die

Schnitte wurden dann mittels immunhistochemischer Färbung untersucht. Zusätzlich wurden HE-Schnitte angefertigt. Es zeigten sich strukturelle Merkmale des Prostatakarzinoms. Die Mikrotumore unterschieden sich eindeutig von den aus Zelllinien entstandenen Sphäroiden. Als Grundlage zur Testung von Immuntherapien an den Mikrotumoren wurden Tests mit tumorinfiltrierenden Lymphocyten durchgeführt. Diese wurden aus dem Tumorgewebe isoliert und expandiert. Die Aktivität der TILs alleine, in Anwesenheit von Sphäroiden und in Anwesenheit der Checkpointinhibitoren Nivolumab und Ipilimumab konnte mittels ELISpot ermittelt werden. Schließlich wurde die Zusammensetzung (CD4+/CD8+/T-reg) der TILS mittels FACS analysiert. Durch die Etablierung der genannten Methoden ist die Grundlage für weitere Experimente an größeren Fallzahlen gelegt.

## 6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 1</b> Einzelne Zellen aggregieren und bilden multizelluläre Tumorsphäroide aus Weiswald et al, Spherical cancer models in tumor biology [46] .....	23
<b>Abbildung 2</b> Tumorstammzellen proliferieren und bilden Sphäroide aus Weiswald et al, Spherical cancer models in tumor biology [46].....	23
<b>Abbildung 3</b> Tumor wird zerkleinert und bildet im Medium Sphäroide aus Weiswald et al, Spherical cancer models in tumor biology [46].....	24
<b>Abbildung 4</b> Tumor wird zerkleinert und verdaut und bildet dann Sphäroide aus Weiswald et al, Spherical cancer models in tumor biology [46].....	24
<b>Abbildung 5</b> Filtrationsschritte und Sammeln der Mikrotumore aus Kondo, J., et al., Retaining cell-cell contact enables preparation and culture of spheroids composed of pure primary cancer cells from colorectal cancer [49].....	35
<b>Abbildung 6</b> Illustration zur Funktionsweise des CellTox™ Green Cytotoxicity Assays von Promega. Gezeigt wird der Farbstoff, der nicht in lebende sondern nur in tote Zellen eindringen kann. Dort bindet er an DNA und seine Fluoreszenz steigt stark an. ....	39
<b>Abbildung 7</b> Illustration der immunhistochemischen Färbemethode. Eigene Darstellung. ....	46
<b>Abbildung 8</b> Prinzip des ELISpot-Assays aus Möbs, C. et al, Research Techniques Made Simple: Monitoring of T-Cell Subsets using the ELISPOT Assay [55].....	49
<b>Abbildung 9</b> Diagramm zur Altersverteilung der Patientenproben, Angaben in Jahren, Durchschnittsalter: 67,6 Jahre.....	53
<b>Abbildung 11</b> Diagramm zur Darstellung der Gleason-Score-Werte der Patientenproben .....	54
<b>Abbildung 10</b> Diagramm zur Darstellung der TNM-Stadien der Patientenproben.....	54
<b>Abbildung 12</b> Diagramm zur Verteilung der PSA-Werte der Patientenproben.....	55
<b>Abbildung 13</b> Diagramm zur Darstellung der Proben, aus denen Mikrotumore gewonnen werden konnten. 3 Proben wurden als Einarbeitungsmaterial verwendet, sie wurden nicht für weitere Experimente genutzt. ....	57
<b>Abbildung 14</b> Diagramm zur Darstellung der Anzahl an isolierten Mikrotumoren aus den einzelnen Proben, aus denen Mikrotumore gewonnen werden konnten. Mittelwert von 21. ....	57
<b>Abbildung 15</b> Lebend-Tod-Färbung von Mikrotumoren aus Prostatakarzinomgewebe von 2 Patienten (17.293, 17.272). Links Durchlicht, rechts Überlagerung von Calcein-AM (vitale Zellen; grüner Kanal) und Sytox Orange (tote Zellen; roter Kanal). Maßstabsbalken: 100µm. ....	58
<b>Abbildung 16</b> Lebend-Färbung von Mikrotumoreinzelzellen aus Prostatakarzinomgewebe von Patient 17.272. Links Zellen seit 3 Tagen im Hydrogel, rechts seit 7 Tagen. Überlagerung von Durchlicht und Calcein-AM (vitale Zellen; grüner Kanal). Maßstabsbalken: 100µm. ....	59
<b>Abbildung 17</b> Lebend-Färbung von Mikrotumoreinzelzellen aus Prostatakarzinomgewebe von Patient 17.272. Überlagerung von Durchlicht, Calcein-AM (vitale Mikrotumorzellen; grüner Kanal)	

und Calcein Red (vitale T-Zellen, roter Kanal). Links T- Zellen seit 3 Tagen im Hydrogel, rechts seit 7 Tagen. Maßstabsbalken 100µm. Schwarze Punkte im Hintergrund: Dynabeads .....	60
<b>Abbildung 18</b> Lebend-Tot-Färbung von Mikrotumoren der Zelllinien DU145 und LNCaP. Links Durchlicht, rechts Überlagerung von Calcein-AM (vitale Zellen; grüner Kanal) und Sytox Orange (tote Zellen; roter Kanal). Maßstabsbalken: 100µm.....	62
<b>Abbildung 19</b> Diagramm DU 145 - Docetaxel CellTox™-Green-Cytotoxicity-Assay. Messung nach 0h, 24h, 48h, 120h. Einheit: Relative Fluorescence Units .....	64
<b>Abbildung 20</b> Diagramm LNCaP - Docetaxel CellTox™-Green-Cytotoxicity-Assay. Messung nach 0h, 24h, 48h, 120h. Einheit: Relative Fluorescence Units .....	64
<b>Abbildung 21</b> Sytox Orange Färbung von Mikrotumoren der Zelllinie DU145. Links Durchlicht, rechts Sytox Orange (tote Zellen; roter Kanal). Darübergelegt jeweils eine Maske um den Kern des Sphäroids. Maßstabsbalken: 100µm. ....	66
<b>Abbildung 22</b> Diagramm DU145 Docetaxel. Auswertung anhand der Größe des Kernsphäroids. Größe bei 0h: 100%. Messung nach 24h, 72h, 96h .....	67
<b>Abbildung 23</b> 0h: Lebend-Tot-Färbung von Mikrotumoren der Zelllinie DU145. Links Durchlicht, daneben Überlagerung von Calcein-AM (vitale Zellen; grüner Kanal) und Sytox Orange (tote Zellen; roter Kanal). 24h, 96h: jeweils Durchlichtbilder. Bilder nach Behandlung mit 10µM Docetaxel bei 0h bzw. ohne Behandlung (Kontrolle). Maßstabsbalken: 100µM.....	68
<b>Abbildung 24</b> Diagramm DU145-Enzalutamid. Auswertung anhand der Größe des Kernsphäroids. Größe bei 0h: 100%. Messung nach 24h, 48, 72h, 96h .....	69
<b>Abbildung 25</b> Lebend-Tot-Färbung von Mikrotumoren der Zelllinie DU145. Links Durchlicht, daneben Überlagerung von Calcein-AM (vitale Zellen; grüner Kanal) und Sytox Orange (tote Zellen; roter Kanal). 48h, 96h: jeweils Durchlichtbilder. Bilder nach Behandlung mit 20µM Enzalutamid bei 0h bzw. ohne Behandlung (Kontrolle). Maßstabsbalken: 100µM.....	70
<b>Abbildung 26</b> Diagramm LNCaP-Docetaxel. Auswertung anhand der Fläche toter Zellen zur Gesamtfläche des Sphäroids. Messung nach 48h und 96h .....	72
<b>Abbildung 27</b> 0h, 48h, 96h: Lebend-Tot-Färbung von Mikrotumoren der Zelllinie LNCaP. Überlagerung von Calcein-AM (vitale Zellen; grüner Kanal) und Sytox Orange (tote Zellen; roter Kanal). Bilder nach Behandlung mit 10µM Docetaxel bei 0h bzw. ohne Behandlung (Kontrolle). Maßstabsbalken: 100µM.....	73
<b>Abbildung 28</b> Diagramm LNCaP-Enzalutamid. Auswertung anhand der Fläche toter Zellen zur Gesamtfläche des Sphäroids. Messung nach 48h und 96h .....	74
<b>Abbildung 29</b> 0h, 48h, 96h: Lebend-Tot-Färbung von Mikrotumoren der Zelllinie LNCaP. Überlagerung von Calcein-AM (vitale Zellen; grüner Kanal) und Sytox Orange (tote Zellen; roter Kanal). Bilder nach Behandlung mit 20µM Enzalutamid bei 0h bzw. ohne Behandlung (Kontrolle). Maßstabsbalken: 100µM.....	75
<b>Abbildung 30</b> Diagramm PCA 18.033. Auswertung anhand der Fläche toter Zellen zur Gesamtfläche des Sphäroids. Messung nach 48h und 120h. Signifikanz zur Kontrolle: * p<0,05, ** p<0,001 .....	76

<b>Abbildung 31</b> 0h, 48h, 120h: Lebend-Tod-Färbung von Mikrotumoren aus Prostatakarzinomgewebe von Patient 18.033. Überlagerung von Calcein-AM (vitale Zellen; grüner Kanal) und Sytox Orange (tote Zellen; roter Kanal). Bilder ohne Behandlung (Kontrolle). Maßstabsbalken: 100µM.....	77
<b>Abbildung 32</b> 0h, 48h, 120h: Lebend-Tod-Färbung von Mikrotumoren aus Prostatakarzinomgewebe von Patient 18.033. Überlagerung von Calcein-AM (vitale Zellen; grüner Kanal) und Sytox Orange (tote Zellen; roter Kanal). Bilder nach Behandlung mit 10µM Docetaxel bei 0h. Maßstabsbalken 100µM .....	78
<b>Abbildung 33</b> 0h, 48h, 120h: Lebend-Tod-Färbung von Mikrotumoren aus Prostatakarzinomgewebe von Patient 18.033. Überlagerung von Calcein-AM (vitale Zellen; grüner Kanal) und Sytox Orange (tote Zellen; roter Kanal). Bilder nach Behandlung mit 10µM Enzalutamid bei 0h. Maßstabsbalken: 100µM.....	79
<b>Abbildung 34</b> Immunhistochemische Färbung von Prostatanormalgewebe. Färbung gegen PSA, deutlich exprimiert in den Prostataepithelzellen. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Maßstabsbalken 200µm. Eigene Färbung, Prostatagewebe wurde von der Firma Leica zur Verfügung gestellt. .	80
<b>Abbildung 35</b> HE-Färbung von Sphäroiden der Zelllinie DU145. Maßstabsbalken jeweils 200µm .....	81
<b>Abbildung 36</b> Histologische Färbungen von Sphäroiden der Zelllinie LNCaP. Links HE-Färbung. Rechts IHC Färbung der Zelllinie LNCaP, Färbung gegen PSA. Maßstabsbalken jeweils 200µm .....	82
<b>Abbildung 37</b> Histologische Färbungen eines Mikrotumors aus Patientenmaterial. Links HE Färbung, rechts gleicher Mikrotumor mit ICH-Färbung. Färbung von KI67. Gleason-Score des Ausgangstumors:7 .....	83
<b>Abbildung 38</b> HE-Färbung des Mikrotumors aus Patientenmaterial PCA 18.033. Maßstabsbalken 200µm. Gleason-Score des Ausgangstumors: 7.....	84
<b>Abbildung 39</b> Histologische Färbungen eines Mikrotumors aus Patientenmaterial PCA 18.047. Links HE-Färbung, rechts gleicher Mikrotumor mit ICH-Färbung. Färbung von PSA. Maßstabsbalken 200µm. Gleason-Score des Ausgangstumors: 9.....	86
<b>Abbildung 40</b> Diagramm ELISpot aus T-Zellen aus Patientenmaterial 17.293, jeweils 2000 bzw. 3000 Zellen.....	87
<b>Abbildung 41</b> Elispot 2000 Zellen. A: T-Zellen allein, B: T- Zellen + Nivolumab 50µg/ml, C: T-Zellen + Ipilimumab 20µg/ml, D: T-Zellen + Nivolumab 50µg/ml+ Ipilimumab 20µg/ml, E: T- Zellen + mAB CD3-2 (pos. Kontrolle ), F: Mediumkontrolle.....	88
<b>Abbildung 42</b> Elispot 3000 Zellen. A: T-Zellen allein, B: T- Zellen + Nivolumab 50µg/ml, C: T-Zellen + Ipilimumab 20µg/ml, D: T-Zellen + Nivolumab 50µg/ml+ Ipilimumab 20µg/ml, E: T- Zellen + mAB CD3-2 (pos. Kontrolle ), F: Mediumkontrolle.....	89
<b>Abbildung 43</b> Diagramm ELISpot aus T-Zellen aus Patientenmaterial 17.293 und Sphäroiden aus der Zelllinie LNCaP. Jeweils 3000 Zellen. ....	90

---

<b>Abbildung 44</b> Elispot 3000 Zellen. A: T-Zellen allein, B: T-Zellen+ LNCaP-Sphäroide, C: T- Zellen + LNCaP-Sphäroide + Nivolumab 50µg/ml, D: T-Zellen + LNCaP-Sphäroide+ Ipilimumab 20µg/ml, E: T-Zellen + LNCaP-Sphäroide + Nivolumab 50µg/ml+ Ipilimumab 20µg/ml, F: T- Zellen + LNCaP-Sphäroide +mAB CD3-2 (Pos.-Kontrolle), G: Mediumkontrolle .....	91
<b>Abbildung 45</b> Gating um Einzelzellen .....	92
<b>Abbildung 46</b> FACS-Analyse der TILs aus Patientenmaterial 17.293. Gating um Lymphozyten .....	92
<b>Abbildung 47</b> Gating um lebende Zellen.....	92
<b>Abbildung 48</b> Darstellung der FACS- Analyse aus T-Zellen des Patientenmaterials 18.033. Färbung: CD4+ T-Zellen: 84,5 %, CD8+ T-Zellen: 13,1% .....	93
<b>Abbildung 49</b> Darstellung der FACS-Analyse aus T-Zellen des Patientenmaterials 18.033. Färbung: CD4+ T-Zellen: 86,7%, Zellen positiv für CD4+ und FOXP3 (T regs): 0% .....	93

## 7. TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 1</b> TNM-Klassifikation .....	14
<b>Tabelle 2</b> Gleason - Graduierung, modifiziert durch die International Society of Urological Pathology (ISUP) 2014 (Epstein et al., 2016).....	15
<b>Tabelle 3:</b> Auflistung der Patientenprobendaten. ....	27
<b>Tabelle 4</b> Überblick über verwendete Medikamente und Konzentrationen im Celltox-Green-Assay .....	39
<b>Tabelle 5</b> Überblick über verwendete Wirkstoffe und Konzentrationen im Mikroskopie-Assay..	40

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., *Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe.* 2015, Berlin
2. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., *Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe.* 2015, Berlin. p. 94- 97.
3. Statistisches Bundesamt Pressestelle (Hrsg), *Neue Bevölkerungsvorausberechnung für Deutschland bis 2060* 2015: Wiesbaden.
4. Haas, G.P., et al., *The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies.* Can J Urol, 2008. **15**(1): p. 3866-71.
5. e.V., R.K.-I.u.d.G.d.e.K.i.D., *Krebs in Deutschland - Prostata.* 2013/2014.
6. Tan, D.S., T.S. Mok, and T.R. Rebbeck, *Cancer Genomics: Diversity and Disparity Across Ethnicity and Geography.* J Clin Oncol, 2016. **34**(1): p. 91-101.
7. Jansson, K.F., et al., *Concordance of tumor differentiation among brothers with prostate cancer.* Eur Urol, 2012. **62**(4): p. 656-61.
8. Bratt, O., *Hereditary prostate cancer: clinical aspects.* J Urol, 2002. **168**(3): p. 906-13.
9. Sfanos, K.S. and A.M. De Marzo, *Prostate cancer and inflammation: the evidence.* Histopathology, 2012. **60**(1): p. 199-215.
10. Klap, J., M. Schmid, and K.R. Loughlin, *The relationship between total testosterone levels and prostate cancer: a review of the continuing controversy.* J Urol, 2015. **193**(2): p. 403-13.
11. Philip, J., et al., *Is a digital rectal examination necessary in the diagnosis and clinical staging of early prostate cancer?* BJU Int, 2005. **95**(7): p. 969-71.
12. Kirby, R., *The role of PSA in detection and management of prostate cancer.* Practitioner, 2016. **260**(1792): p. 17-21, 3.
13. Rübben, H., *Früherkennung des Prostatakarzinoms: PSA-Test nur nach Aufklärung und Einwilligung des Patienten.* Dtsch Arztebl 2004; 101: A 1736–1738 [Heft 24], 2004.
14. Harvey, C.J., et al., *Applications of transrectal ultrasound in prostate cancer.* Br J Radiol, 2012. **85 Spec No 1**: p. S3-17.
15. Universitätsklinikum Tübingen Klinik für Urologie. *Leistungsspektrum Prostatakarzinom Diagnostik.* 2017 [cited 2017 14.11.]; <http://www.uro-tuebingen.de/leistungsspektrum/prostata/prostatakarzinom/diagnostik.html>].
16. Mischinger, J., et al., *Targeted vs systematic robot-assisted transperineal magnetic resonance imaging-transrectal ultrasonography fusion prostate biopsy.* BJU Int, 2018. **121**(5): p. 791-798.
17. N. Mottet (Chair), J.B., E. Briers (Patient Representative), M. Bolla, L. Bourke, P. Cornford (Vice-chair), M. De Santis, A.M. Henry, S. Joniau, T.B. Lam, M.D. Mason, H.G. van der Poel, T.H. van der Kwast, O. Rouvière, T.

- Wiegel and R.C.N.v.d.B. Guidelines Associates: N. Arfi, T. van den Broeck, M. Cumberbatch, N. Fossati, T. Gross, M. Lardas, M. Liew, P. Moldovan, I.G. Schoots, P.M. Willemse, *Guidelines on Prostate Cancer*. 2017 [cited 2017 09.11.2017]; [http://uroweb.org/guideline/prostate-cancer/#1\\_4](http://uroweb.org/guideline/prostate-cancer/#1_4)].
18. D'Amico, A.V., et al., *Cancer-specific mortality after surgery or radiation for patients with clinically localized prostate cancer managed during the prostate-specific antigen era*. J Clin Oncol, 2003. **21**(11): p. 2163-72.
  19. D'Amico, A.V., et al., *Identifying Men Diagnosed With Clinically Localized Prostate Cancer Who are at High Risk for Death From Prostate Cancer*. The Journal of Urology, 2006. **176**(6, Supplement): p. S11-S15.
  20. Clarke, N.W., C.A. Hart, and M.D. Brown, *Molecular mechanisms of metastasis in prostate cancer*. Asian J Androl, 2009. **11**(1): p. 57-67.
  21. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF), *Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Kurzversion 4.0*. 2016 [cited 2017 09.11.2017]; <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Prostatakarzinom.58.0.html>].
  22. Roach, M., et al., *Four prognostic groups predict long-term survival from prostate cancer following radiotherapy alone on Radiation Therapy Oncology Group clinical trials*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2000. **47**(3): p. 609-15.
  23. Hendrik Isbarn, H.H., Markus Graefen, *Ergebnisse der radikalen Prostatektomie beim neu diagnostizierten Prostatakarzinom* Deutsches Ärzteblatt 2013. **Jg. 110 Heft 29-30** p. 497-503.
  24. Bolla, M., et al., *Postoperative radiotherapy after radical prostatectomy for high-risk prostate cancer: long-term results of a randomised controlled trial (EORTC trial 22911)*. Lancet, 2012. **380**(9858): p. 2018-27.
  25. Thompson, I.M., et al., *Adjuvant radiotherapy for pathological T3N0M0 prostate cancer significantly reduces risk of metastases and improves survival: long-term followup of a randomized clinical trial*. J Urol, 2009. **181**(3): p. 956-62.
  26. Perlmutter, M.A. and H. Lepor, *Androgen deprivation therapy in the treatment of advanced prostate cancer*. Rev Urol, 2007. **9 Suppl 1**: p. S3-8.
  27. Kenmotsu, H. and Y. Tanigawara, *Pharmacokinetics, dynamics and toxicity of docetaxel: Why the Japanese dose differs from the Western dose*. Cancer Sci, 2015. **106**(5): p. 497-504.
  28. *Zusammenfassung des Arzneimittels Taxotere*, S.G. Aventis Pharma S.A., Editor. Nov. 2017.
  29. B.V, A.P.E., *Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels Xtandi*.
  30. Gibbons, J.A., et al., *Clinical Pharmacokinetic Studies of Enzalutamide*. Clin Pharmacokinet, 2015. **54**(10): p. 1043-55.
  31. Puente, J., et al., *Docetaxel in prostate cancer: a familiar face as the new standard in a hormone-sensitive setting*. Ther Adv Med Oncol, 2017. **9**(5): p. 307-318.
  32. R. Dreicer N.J. Vogelzang J. Picus D. Shevrin M. Hussain J. Garcia R. Dipaola, C.S.Y.-H.C.G.L.M.C.D.J.M.E.Y.-N.W.L.P.-M.N.H.M.K.M.C.,

- Long term efficacy and QOL data of chemohormonal therapy (C-HT) in low and high volume hormone naïve metastatic prostate cancer (PrCa): E3805 CHAARTED trial.* Annals of Oncology 2016. **27**(suppl\_6).
33. Nicholas D. James, M.R.S., Noel W. Clarke, Malcom D. Mason, David P. Dearnaley, John Anderson, Richard J. Popert, Karen Sanders, Rachel Morgan, Jim Stansfeld, John Dwyer, John Masters, Mahesh K.B. Parmar, *Systemic therapy for advancing or metastatic prostate cancer (STAMPEDE): a multi-arm, multistage randomized controlled trial.* BJU Int, 2008. **103**(4).
  34. Anassi, E. and U.A. Ndefo, *Sipuleucel-T (provenge) injection: the first immunotherapy agent (vaccine) for hormone-refractory prostate cancer.* P t, 2011. **36**(4): p. 197-202.
  35. Della Vittoria Scarpati, G., et al., *Ipilimumab in the treatment of metastatic melanoma: management of adverse events.* Onco Targets Ther, 2014. **7**: p. 203-9.
  36. Cabel, L., et al., *Long-term complete remission with ipilimumab in metastatic castrate-resistant prostate cancer: case report of two patients.* Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 2017. **5**(1): p. 31.
  37. Beer, T.M., et al., *Randomized, Double-Blind, Phase III Trial of Ipilimumab Versus Placebo in Asymptomatic or Minimally Symptomatic Patients With Metastatic Chemotherapy-Naive Castration-Resistant Prostate Cancer.* Journal of Clinical Oncology, 2017. **35**(1): p. 40-47.
  38. Graff, J.N., et al., *Early evidence of anti-PD-1 activity in enzalutamide-resistant prostate cancer.* Oncotarget, 2016. **7**(33): p. 52810-52817.
  39. Russell, P.J. and E.A. Kingsley, *Human Prostate Cancer Cell Lines, in Prostate Cancer Methods and Protocols*, P.J. Russell, P. Jackson, and E.A. Kingsley, Editors. 2003, Springer New York: Totowa, NJ. p. 21-39.
  40. Jung, J., *Human tumor xenograft models for preclinical assessment of anticancer drug development.* Toxicol Res, 2014. **30**(1): p. 1-5.
  41. Lin, D., et al., *High Fidelity Patient-Derived Xenografts for Accelerating Prostate Cancer Discovery and Drug Development.* Cancer Research, 2014. **74**(4): p. 1272-1283.
  42. Pampaloni, F., E.G. Reynaud, and E.H.K. Stelzer, *The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue.* Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007. **8**: p. 839.
  43. Vaira, V., et al., *Preclinical model of organotypic culture for pharmacodynamic profiling of human tumors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(18): p. 8352-6.
  44. Kyle, A.H., et al., *Direct Assessment of Drug Penetration into Tissue Using a Novel Application of Three-Dimensional Cell Culture.* Cancer Research, 2004. **64**(17): p. 6304-6309.
  45. Fischbach, C., et al., *Engineering tumors with 3D scaffolds.* Nat Meth, 2007. **4**(10): p. 855-860.
  46. Weiswald, L.B., D. Bellet, and V. Dangles-Marie, *Spherical cancer models in tumor biology.* Neoplasia, 2015. **17**(1): p. 1-15.
  47. Sutherland, R., *Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model.* Science, 1988. **240**(4849): p. 177-184.

48. Singh, S.K., et al., *Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors*. *Cancer Research*, 2003. **63**(18): p. 5821-5828.
49. Kondo, J., et al., *Retaining cell-cell contact enables preparation and culture of spheroids composed of pure primary cancer cells from colorectal cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(15): p. 6235-40.
50. Strand, D.W., et al., *Isolation and analysis of discreet human prostate cellular populations*. *Differentiation*, 2016. **91**(4-5): p. 139-51.
51. Jenkins, R.W., et al., *Ex Vivo Profiling of PD-1 Blockade Using Organotypic Tumor Spheroids*. *Cancer Discov*, 2018. **8**(2): p. 196-215.
52. Wong, C., et al., *Human neuroendocrine tumor cell lines as a three-dimensional model for the study of human neuroendocrine tumor therapy*. *J Vis Exp*, 2012(66): p. e4218.
53. Melina V. Jones, P.A.C., *Agar-gelatin for embedding tissues prior to paraffin processing*. *BioTechniques*. **42**(5): p. 569-570.
54. Bratthauer, G.L., *The Avidin–Biotin Complex (ABC) Method and Other Avidin–Biotin Binding Methods*, in *Immunocytochemical Methods and Protocols*, C. Oliver and M.C. Jamur, Editors. 2010, Humana Press: Totowa, NJ. p. 257-270.
55. Möbs, C. and T. Schmidt, *Research Techniques Made Simple: Monitoring of T-Cell Subsets using the ELISPOT Assay*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2016. **136**(6): p. e55-e59.
56. Takahashi, T., et al., *The study of PSA gene expression on urogenital cell lines*. *Int J Urol*, 1999. **6**(10): p. 526-31.
57. Drost, J., et al., *Organoid culture systems for prostate epithelial and cancer tissue*. *Nat Protoc*, 2016. **11**(2): p. 347-58.
58. Gao, D., et al., *Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer*. *Cell*, 2014. **159**(1): p. 176-187.
59. Chambers, K.F., et al., *3D Cultures of prostate cancer cells cultured in a novel high-throughput culture platform are more resistant to chemotherapeutics compared to cells cultured in monolayer*. *PLoS One*, 2014. **9**(11): p. e111029.
60. Mosaad, E.O., et al., *The Microwell-mesh: A high-throughput 3D prostate cancer spheroid and drug-testing platform*. *Scientific Reports*, 2018. **8**(1): p. 253.
61. Lang, S.H., et al., *Prostate epithelial cell lines form spheroids with evidence of glandular differentiation in three-dimensional Matrigel cultures*. *Br J Cancer*, 2001. **85**(4): p. 590-9.
62. Riss, T. *Validating Cell-Based Assays for Use with 3D Cultures*. 2017.
63. Chlenski, A., et al., *Androgen receptor expression in androgen-independent prostate cancer cell lines*. *Prostate*, 2001. **47**(1): p. 66-75.
64. Alimirah, F., et al., *DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation*. *FEBS Lett*, 2006. **580**(9): p. 2294-300.
65. Stock, K., et al., *Capturing tumor complexity in vitro: Comparative analysis of 2D and 3D tumor models for drug discovery*. *Scientific Reports*, 2016. **6**: p. 28951.

66. Jeppesen, M., et al., *Short-term spheroid culture of primary colorectal cancer cells as an in vitro model for personalizing cancer medicine*. PLoS One, 2017. **12**(9): p. e0183074.
67. Martin, A.M., et al., *Paucity of PD-L1 expression in prostate cancer: innate and adaptive immune resistance*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2015. **18**(4): p. 325-32.
68. Goswami, S., A. Aparicio, and S.K. Subudhi, *Immune Checkpoint Therapies in Prostate Cancer*. Cancer J, 2016. **22**(2): p. 117-20.
69. Cordes, L.M., J.L. Gulley, and R.A. Madan, *Perspectives on the clinical development of immunotherapy in prostate cancer*. Asian J Androl, 2018. **20**(3): p. 253-259.
70. Sharma P, P.R., Narayan V, et al, *Initial results from a phase II study of nivolumab plus ipilimumab for the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer (CheckMate 650)*. Genitourinary Cancers Symposium. Abstract 142, 2019.
71. Bono, J.S.D., et al., *KEYNOTE-199: Pembrolizumab (pembro) for docetaxel-refractory metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC)*. Journal of Clinical Oncology, 2018. **36**(15\_suppl): p. 5007-5007.
72. Davidsson, S., et al., *CD4 helper T cells, CD8 cytotoxic T cells, and FOXP3+ regulatory T cells with respect to lethal prostate cancer*. Modern Pathology, 2012. **26**: p. 448.

## 9. ANHANG

### 9.1 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Hiermit erkläre ich, Regina Stahl, geb. 17.06.1995, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel:

„Etablierung eines Ex-vivo-Modellsystems aus Mikrotumoren der Prostata“

selbstständig verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt. Wörtlich und inhaltlich übernommene Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde in der urologischen Klinik der Universität Tübingen in Kooperation mit dem Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut an der Universität Tübingen (NMI) verfasst.

Die Arbeit wurde mit Betreuung durch Herrn Dr. Tilmann Todenhöfer durchgeführt. Die Konzeption der durchgeführten Experimente erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Christian Schmees, dem wissenschaftlichen Betreuer dieser Arbeit. Frau Dr. Eva Neumann stand mir zudem als Ansprechpartnerin in der Klinik zur Seite.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Mitarbeiter des NMI von mir eigenständig durchgeführt. Bei der Einarbeitung in die Histochemie stand mir Dr. Heike Niesser in der Hautklinik Tübingen unterstützend zur Seite.

Ort:

Datum:

Unterschrift:

## 9.2 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich nachstehenden Personen meinen besonderen Dank aussprechen, ohne deren Mithilfe diese Arbeit nicht in diesem Umfang zustande gekommen wäre.

Zunächst gilt mein Dank PD Dr. Tilman Todenhöfer meinem Doktorvater. Vielen Dank für die Betreuung der gesamten Arbeit. Sie haben mich ermutigt, mich diesem spannenden Thema zu widmen und waren bei Fragen stets ansprechbar. Vielen Dank für Ihre konstruktive Kritik während des Verfassens der Dissertationsschrift. Ein ebenso großer Dank gilt meinen wissenschaftlichen Betreuern Dr. Christian Schmees und Dr. Eva Erne. Danke für Ihre vielfältigen Ratschläge, Ihr kritisches Hinterfragen und die gesamte Begleitung meiner Arbeit. Sie haben mich wissenschaftlich und persönlich sehr geprägt.

Weiter möchte ich allen Kollegen im NMI Reutlingen danken, die mich ganz praktisch bei der Arbeit im Labor unterstützt haben. Ein besonderer Dank geht an Mona Bodenhöfer und Nicole Anderle für die mannigfaltige Ideengebung und Hilfe, wenn ich selbst nicht mehr weiterwusste.

Für Ihre Hilfe bei der immunhistochemischen Färbung der Mikrotumoren danke ich Dr. Heike Niesser. Für die Bereitstellung der Proben danke ich Jörg Hennenlotter.

Ein weiterer Dank gilt meinen Freunden, die immer ein offenes Ohr für mich hatten, bei Fragen zum Thema Dissertation und auch bei allen anderen Freuden und Problemen. Danke für allen Rückhalt und unsere Freundschaft.

Meinem Partner Benjamin Warth danke ich für die persönliche Ermutigung während der Zeit der Dissertation. Danke für deine Geduld. Du hast mir die Kraft gegeben diese Arbeit zu verfassen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, besonders meiner Mutter, für die mehrfache Korrektur und Durchsicht meiner Arbeit. Ihr habt mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht und mich bis heute begleitet. Deshalb widme ich euch diese Arbeit.