

Aus der

Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Klinische Immunologie,
Rheumatologie)

Etablierung und molekulare Charakterisierung von Mammakarzinom-Organoiden

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

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

**vorgelegt von
Wolf, Franziska
2022**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Klein
2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Hartkopf

Tag der Disputation: 20.01.2022

Widmung

Meiner Mama, die mir alles möglich macht.

I Inhaltsverzeichnis

II	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
III	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	5
IV	TABELLENVERZEICHNIS	8
I.	EINLEITUNG.....	9
I.1.	DIE BRUSTDRÜSE	9
I.2.	BRUSTKREBS.....	12
I.2.1.	<i>Inzidenz und Prävalenz</i>	12
I.2.2.	<i>Ätiologie des Mammakarzinoms</i>	14
I.2.3.	<i>Klassifikation des Mammakarzinoms</i>	16
I.2.4.	<i>Therapie des Mammakarzinoms</i>	19
I.2.5.	<i>Prognose des Mammakarzinoms</i>	19
I.3.	DIE EXTRAZELLULÄRMATRIX.....	21
I.3.1.	<i>Kollagene</i>	21
I.3.2.	<i>Proteoglykane</i>	21
I.3.3.	<i>Glykoproteine</i>	22
I.4.	MATRIX-METALLOPROTEASEN	25
I.4.1.	<i>Proteasen</i>	25
I.4.2.	<i>Aufbau von Matrix-Metalloproteasen (MMPs)</i>	25
I.4.3.	<i>Aufgaben von Matrix-Metalloproteasen</i>	27
I.4.4.	<i>Fehlregulation von Matrix-Metalloproteasen</i>	30
I.4.5.	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs)</i>	32
I.5.	ORGANOIDE	34
I.5.1.	<i>Allgemeines</i>	34
I.5.2.	<i>Vor- und Nachteile der Organoidkultur</i>	36
I.5.3.	<i>Neue Wege in der Krankheitsmodellierung</i>	37
I.5.4.	<i>Aus der Petrischale ans Krankenbett</i>	39
I.5.5.	<i>Organoide in der Brustkrebsforschung</i>	41
I.6.	ZIEL DER ARBEIT	41
II.	MATERIAL UND METHODEN	43
II.1.	MATERIAL.....	43
II.1.1.	<i>Patientenproben und Zelllinien</i>	43
II.1.2.	<i>Reagenzien</i>	44
II.1.3.	<i>Antikörper</i>	48
II.1.4.	<i>Primer</i>	50

II.1.5. <i>Equipment und Verbrauchsmittel</i>	52
II.2. METHODEN	53
II.2.1. <i>Zellkultur</i>	53
II.2.2. <i>Organoidkultur</i>	60
II.2.3. <i>Immunfluoreszenzfärbung (IFL)</i>	64
II.2.4. <i>Molekularbiologie</i>	73
III. ERGEBNISSE	79
III.1. WACHSTUM DER ORGANOIDE	79
III.1.1. <i>Übersicht</i>	79
III.1.2. <i>Wachstum und Anzahl</i>	85
III.1.3. <i>Passagierung</i>	90
III.2. MEDIEN	90
III.2.1. <i>Übersicht</i>	90
III.2.2. <i>Vergleich</i>	90
III.3. MOLEKULARBIOLOGISCHE EXPRESSIONSSTUDIEN	93
III.3.1. <i>RNA-Isolierung aus Organoiden</i>	93
III.3.2. <i>RT-PCR der verschiedenen Laminine</i>	93
III.3.3. <i>RT-PCR-Analyse der verschiedenen Membranständigen Matrix-Metallproteasen (MT-MMPs)</i>	96
III.3.4. <i>RT-PCR-Analyse der verschiedenen Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs)</i>	99
III.4. IMMUNFLUORESCENZ-MARKIERUNG HUMANER MAMMA-CA-ORGANOIDE	103
III.4.1. <i>Kryostatschnitte</i>	104
III.4.2. <i>Paraffinschnitte</i>	119
III.4.3. <i>Chamberslides</i>	127
III.4.4. <i>LSM880 mit Airyscan-Detektor</i>	136
IV. DISKUSSION	142
IV.1. WACHSTUM DER ORGANOIDE	143
IV.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE EXPRESSIONSSTUDIEN	145
IV.2.1. <i>RT-PCR-Analyse der verschiedenen Laminine</i>	145
IV.2.2. <i>RT-PCR-Analyse der verschiedenen MT-MMPs</i>	145
IV.2.3. <i>RT-PCR-Analyse der verschiedenen TIMPs</i>	146
IV.3. IMMUNFLUORESCENZMARKIERUNGEN HUMANER MAMMA-CA-ORGANOIDE	147
IV.3.1. <i>Vergleich von Immunfluoreszenzmethoden</i>	147
IV.3.2. <i>Aufbau von Organoiden in der IFL</i>	148

IV.4	VERGLEICH VON IFL UND RT-PCR-ANALYSE.....	149
IV.5	AUSBLICK.....	151
IV.6	ZUSAMMENFASSUNG.....	152
V	DANKSAGUNG	154
VI	LITERATURVERZEICHNIS.....	155
VII	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	163

II Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°	Grad
°C	Grad Celsius
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
ACF	Animal Component Free
AJCC	American Joint Commission on Cancer
BC	Breast Cancer
BME	Basement Membrane Extract
bp	base pairs
BRC	Breast Cancer Gene
BRCA1/2	Breast Cancer 1/2
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	complementary DNA
CK	Cytokeratin
DAPI	4'6'-Diamidino-2-Phenylindol
DEPC	Diethyl-Pyrokarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribosenucleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline

DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	Epidermal Growth Factor
ER	Estrogenrezeptor
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
for	forward
g	Gravitation/Gramm
GAG	Glycosaminoglykan
GPI	Glycophosphatidylinositol
gt	goat
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
hu	human
IFL	Immunfluoreszenzfärbung
l	Liter
L-WRN	Wnt3a, R-Spondin-3, Noggin
Lam	Laminin
LSM	Laser Scan Mikroskop
mA	Milliampère
Mamma-Ca	Mamma-Karzinom
min	Minute/minimal

MMP	Matrix-Metalloprotease
ms	mouse
MT	Membrane Type
n	Nano
NSM	Nipple Sparing Mastectomy
NST	Non special type
OWB	Organoid Washing Buffer
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PR	Progesteronrezeptor
rb	Kaninchen
rev	reverse
RNA	Ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TGFβ	Tissue Growth Factor β
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteases
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

UICC	Union for International Cancer Control
USA	United States of America
UV	Ultraviolettlicht
V	Volt
μ	Micro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar

III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Aufbau der Mamma.....	10
Abbildung 2 Histologische Darstellung der Brustdrüse (Glandula mammaria). Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	11
Abbildung 3 Prozentuale Aufstellung der häufigsten Krebserkrankungen weltweit	13
Abbildung 4 Prozentuale Aufstellung der häufigsten Todesfälle aufgrund Krebs weltweit.....	14
Abbildung 5 Mammakarzinom vom non special type (NST), früher invasiv-duktales Karzinom. Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	18
Abbildung 6 Relatives 5-Jahres-Überleben, nach Altersgruppe getrennt	20
Abbildung 7 Relatives 5-Jahres-Überleben, nach Tumorstadien getrennt.....	20
Abbildung 8 Basalmembran - Komponenten und Interaktionen, vereinfachtes Schema und elektronenmikroskopische Aufnahme	24
Abbildung 9 Schematischer Aufbau von Matrix-Metalloproteasen.....	27
Abbildung 10 Die Rolle von MMPs in der Brustkrebs-Progression	31
Abbildung 11 Organoidkulturen aus verschiedenen Organsystemen	35
Abbildung 12 Organoide für die personalisierte Medizin und Medikamentenentwicklung	40
Abbildung 13 Schematische Darstellung des Aufbaus der Objektträger mit Organoiden für Konfokal-Mikroskopie.....	71
Abbildung 14 μ -Slide Angiogenese Glas-Boden-Platte.....	73
Abbildung 15 BC13 Morphologie.....	81
Abbildung 16 BC43 Morphologie	81
Abbildung 17 BC58 Morphologie	82
Abbildung 18 BC60 Morphologie	82
Abbildung 19 BC89 Morphologie	83
Abbildung 20 BC91 Morphologie	83
Abbildung 21 BC97 Morphologie	84
Abbildung 22 K7 Morphologie	84
Abbildung 23 BC13 Beispiel für maximale Größe der Organoide.....	85
Abbildung 24 BC13 Wachstum im Verlauf.....	86
Abbildung 25 BC43 Wachstum im Verlauf.....	87
Abbildung 26 BC60 Wachstum im Verlauf.....	88
Abbildung 27 BC97 Wachstum im Verlauf.....	89
Abbildung 28 Medien-Vergleich anhand BC13.....	92
Abbildung 29 RT-PCR-Ergebnis Laminine (BC13).....	94
Abbildung 30 RT-PCR-Ergebnis Laminine (BC43).....	95

Abbildung 31 RT-PCR-Ergebnis Laminine (BC60).....	95
Abbildung 32 RT-PCR-Ergebnis Laminine (BC97).....	96
Abbildung 33 RT-PCR-Ergebnis membranständige Matrix-Metalloproteasen (BC13).....	97
Abbildung 34 RT-PCR-Ergebnis membranständige Matrix-Metalloproteasen (BC43).....	98
Abbildung 35 PCR-Ergebnis membranständige Matrix-Metalloproteasen (BC60).....	98
Abbildung 36 PCR-Ergebnis membranständige Matrix-Metalloproteasen (BC97).....	99
Abbildung 37 PCR-Ergebnis TIMPs (BC13).....	100
Abbildung 38 PCR-Ergebnis TIMPs (BC43).....	101
Abbildung 39 PCR-Ergebnis TIMPs (BC60).....	101
Abbildung 40 PCR-Ergebnis TIMPs (BC97).....	102
Abbildung 41 IFL BC117, Paraffinschnitt mit Histogel, Färbung mit DAPI und Perlecan.....	105
Abbildung 42 IFL BC13, Kryostatschnitte mit Histogel, Färbung mit DAPI und Perlecan.....	106
Abbildung 43 IFL BC13 mit DAPI, Perlecan und Cytokeratin 8.....	108
Abbildung 44 IFL BC60 mit DAPI, Perlecan und Cytokeratin 8.....	109
Abbildung 45 IFL BC13 mit DAPI, Cytokeratin 5 und Cytokeratin 8.....	110
Abbildung 46 IFL BC60 mit DAPI, Cytokeratin 5 und Cytokeratin 8.....	111
Abbildung 47 IFL BC13 mit DAPI, Perlecan und Integrin β 1.....	112
Abbildung 48 IFL BC60 mit DAPI, Perlecan und Integrin β 1.....	113
Abbildung 49 IFL BC97 DAPI, Cytokeratin 5 und Integrin α 7.....	114
Abbildung 50 IFL BC60 DAPI, Cytokeratin 8 und MMP-15.....	116
Abbildung 51 IFL BC13 DAPI, Cytokeratin 5 und TIMP-1.....	117
Abbildung 52 IFL BC13 DAPI, Cytokeratin 8 und TIMP-2.....	118
Abbildung 53 IFL K7 DAPI, Cytokeratin 5 und Cytokeratin 8.....	120
Abbildung 54 IFL BC117 DAPI, Perlecan und Cytokeratin 8.....	121
Abbildung 55 IFL BC101 DAPI, Perlecan und Laminin α 5.....	122
Abbildung 56 IFL BC173 DAPI, Laminin β 1 und Laminin α 4.....	124
Abbildung 57 IFL K7 DAPI, CK5 und TIMP-2.....	125
Abbildung 58 IFL K7 DAPI, Perlecan und MMP-15.....	126
Abbildung 59 IFL BC13 DAPI, Cytokeratin 5 und Cytokeratin 8.....	128
Abbildung 60 IFL BC13 DAPI, Perlecan und Integrin β 1.....	129
Abbildung 61 IFL BC13 DAPI, Perlecan und Laminin α 5.....	130
Abbildung 62 IFL BC13 DAPI, Perlecan und MMP-15.....	132
Abbildung 63 IFL BC13 DAPI, MMP-16 und Integrin β 1.....	133
Abbildung 64 IFL BC13 DAPI, MMP-17 und MMP-15.....	134
Abbildung 65 IFL BC13 DAPI, MMP-24 und Integrin β 1.....	135
Abbildung 66 Aufnahme CK5/CK8 LSM880 mit Airyscan einer einzelnen Ebene von BC13..	137
Abbildung 67 Aufnahme (Z-Stack) CK5/CK8 LSM880 mit Airyscan-Detektor von BC13.....	138

Abbildung 68 Aufnahme (Z-Stack) CK5/CK8 LSM880 mit Airyscan-Detektor von BC60..... 139
Abbildung 69 Aufnahme (Z-Stack) CK5/CK8 LSM880 mit Airyscan-Detektor von BC97..... 140
Abbildung 70 Aufnahme Perlecan/MMP-15 LSM880 von BC13..... 141

IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 TNM-Klassifikation für Mammakarzinom	16
Tabelle 2 UICC/AJCC-Stadieneinteilung für Mammakarzinom.....	17
Tabelle 3 Klassifikation und Übersicht von Matrix-Metalloproteasen	29
Tabelle 4 Eigenschaften humaner TIMPs	33
Tabelle 5 Auflistung der verwendeten Patientenproben und Zelllinien	43
Tabelle 6 Auflistung der verwendeten Reagenzien	44
Tabelle 7 Auflistung der verwendeten Antikörper	48
Tabelle 8 Auflistung der verwendeten Primer	50
Tabelle 9 Auflistung des verwendeten Equipments und der Verbrauchsmittel.....	52
Tabelle 10 L-WRN „cell selection medium“ Zusammensetzung.....	54
Tabelle 11 Komponenten des Zellkulturmediums („cell conditioning medium“) für L-WRN-Zellen zur Herstellung von konditioniertem Medium.....	55
Tabelle 12 Komponenten des „Breast Cancer“ (BC) Mediums mit R-Spondin-1-„conditioned medium“ für die Organoidkultur	57
Tabelle 13 Komponenten des Breast Cancer (BC) Mediums mit L-WRN-„conditioned medium“ für die Organoidkultur	58
Tabelle 14 „Freeze Medium“ Zusammensetzung.....	60
Tabelle 15 Ablauf der reversen Transkription.....	76
Tabelle 16 Ablauf der PCR-Zyklen	77
Tabelle 17 Organoidlinien - Übersicht.....	80
Tabelle 18 Reinheiten und Konzentrationen der RNA der Organoidlinien	93
Tabelle 19 Übersicht der Expressionsmuster der BC-Organoidlinien für Laminine	94
Tabelle 20 Übersicht der Expressionsmuster der BC-Organoidlinien für MT-MMPs.....	97
Tabelle 21 Übersicht der Expressionsmuster der BC-Organoidlinien für TIMPs	100
Tabelle 22 Übersicht der durchgeführten Immunfluoreszenzmethoden für verschiedene Organoidlinien	104

I. Einleitung

I.1. Die Brustdrüse

Die weibliche Brustdrüse ist ein zentraler Baustein der Reproduktionsfähigkeit der menschlichen Art. Neben dem sozialen Stellenwert, den die Brust einnimmt, sorgt sie auch für die Ernährung und Entwicklung von Säuglingen und für deren Gesunderhaltung. Die Muttermilch enthält eine Reihe wichtiger Inhaltsstoffe wie IgG-Antikörper, Vitamine, Fette, Proteine und Zucker. Eine der Hauptaufgaben der Muttermilch ist es, mit ihren enthaltenen Antikörpern für den nötigen „Nestschutz“ des Säuglings zu sorgen und kann in dieser Funktion kaum ersetzt werden (Diedrich, 2007).

Grundsätzlich besteht die Brustdrüse aus 15 - 20 Drüsenläppchen, die von Fettgewebe umgeben und über Bindegewebe mit der Brustwand verankert sind. Die Drüsenläppchen, auch Lobi genannt (Abbildung 1), bestehen aus mehreren Drüsenendstückchen (Lobuli), die in die Drüsengänge münden und im Ductus lactifer, dem großen Milchgang, in der Mamille (Papilla mammaria) münden. In der ruhenden, nicht-laktierenden Mamma findet sich ein ein- bis zweischichtiges zylindrisches Epithel mit apokrinem Sekretionsmechanismus in den Drüsenendstückchen sowie Milchgängen (Abbildung 2). Histologisch lassen sich hierbei basale von luminalen Zellen in den Milchgängen und Alveoli unterscheiden. Eine Unterscheidung dieser Zelltypen ist u. a. möglich aufgrund der Cytokeratinausstattung des Zytoskeletts, das den Zellen Form und Stabilität gibt. Basale Zellen exprimieren v. a. den Cytokeratin Typ 5 (CK5), während Cytokeratin 8 (CK8) ein Marker für luminalen Zellen darstellt. Eine geringe Teilmenge an luminalen Zellen der terminalen Ducti sind dabei aber auch für CK5 positiv (Gusterson and Stein, 2012, Petersen and Polyak, 2010).

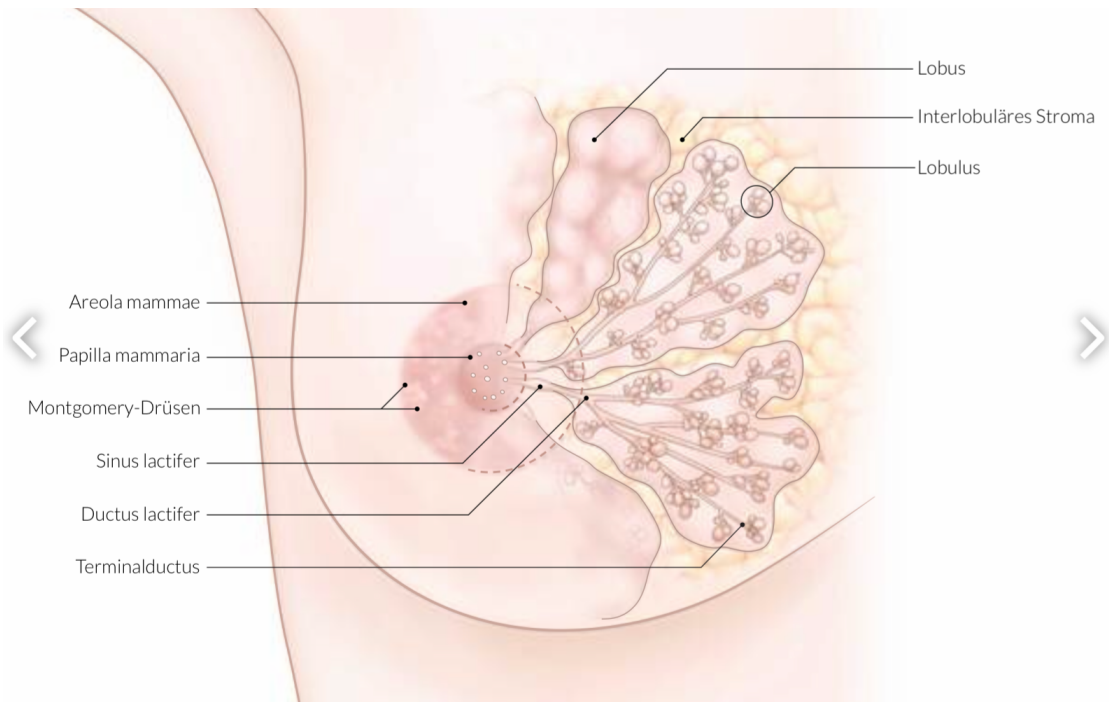


Abbildung 1 Aufbau der Mamma

Schematische Darstellung der Mamma von ventral. Die Brustdrüse gliedert sich in 10 bis 20 Drüsenlappen (Lobus) mit mehreren funktionellen Alveoli, die wiederum in Läppchen (Lobulus) angeordnet sind. Die Hauptausführungsgänge der Läppchen münden konvergierend in die Mamille. (entnommen aus: <https://next.amboss.com/de/article/L60wlS#Z11eb2f75d37269ffdf701a3d6b11e9>, zuletzt 04.05.2020)

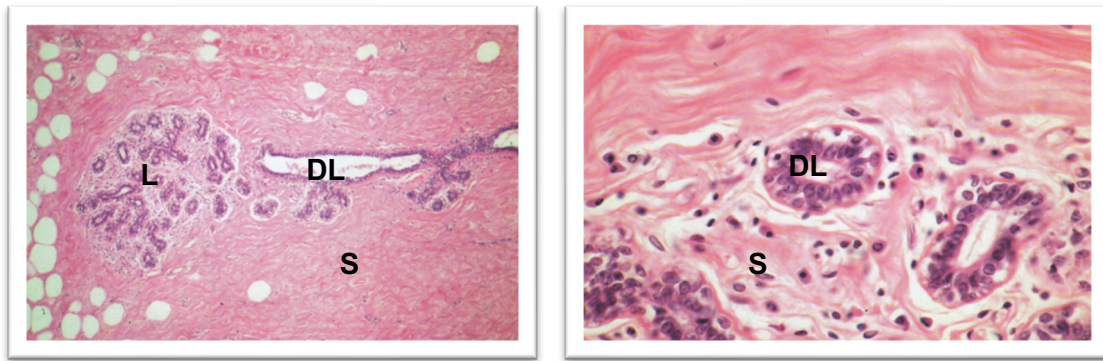


Abbildung 2 Histologische Darstellung der Brustdrüse (Glandula mammaria). Hämatoxylin-Eosin-Färbung

links - mehrere Anschnitte von Läppchen (Lobuli, L) der nicht-laktierendem Mamma. Der Abfluss erfolgt über die Milchgänge (Ductus lactiferi, DL). Die Lobuli sind in Fett- und Bindegewebe (Stroma, S) eingebettet, 2.5x Vergrößerung

rechts - einzelne Lobuli in 63x Vergrößerung

(entnommen aus: [https://next.amboss.com/de/ar-](https://next.amboss.com/de/article/L60wlS#Z11eb2f75d37269ffdf701a3d6b11e9)

[ticle/L60wlS#Z11eb2f75d37269ffdf701a3d6b11e9](https://next.amboss.com/de/article/L60wlS#Z11eb2f75d37269ffdf701a3d6b11e9), zuletzt 04.05.2020)

Im Laufe der Entwicklung eines weiblichen Individuums durchläuft die weibliche Brust mehrere Veränderungen bzw. Anpassungen. Während das Brustgewebe bis zur Pubertät kaum ausgebildet ist, sorgen hormonelle Veränderungen um das 13. Lebensjahr für eine Proliferation und somit eine Ausbildung der Brustdrüse (Thelarche). Hierbei spielt vor allem Östrogen eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung des Milchgangsystems (Schmidt-Matthiesen, 2005, Macias and Hinck, 2012). Grundsätzlich ist die Brustdrüse des Mannes ähnlich aufgebaut; da in der Pubertät aber der Einfluss von Östrogen fehlt bei gleichzeitiger androgener Hemmung, bleibt hier die Brustdrüsenreifung aus (Gusterson and Stein, 2012).

Abhängig von lebenslangen hormonellen Schwankungen der Frau kommt es weiterhin zu einem ständigen Um-, Auf- und Abbau. Während die Entwicklung der Brustdrüse in der Pubertät die erste große Veränderung der Brust ist, passt sich das Brustdrüsengewebe danach parallel zum Menstruationszyklus monatlich den neuen Gegebenheiten an. Hier weiten sich die Milchgänge auf, um sich auf eine mögliche Milchproduktion vorzubereiten. Kommt es zu einer Schwangerschaft, so entwickelt sich aus der ruhenden, nicht-laktierenden Mamma die laktierende Mamma. Es findet ein Umbau des Drüsenge-

webes in die laktierende Mamma statt, durch den sich die Drüsenendstückchen prominenter darstellen und es zunächst unter dem Einfluss von Östrogen, später von Progesteron und Prolaktin zu einer deutlichen Zellproliferation des Milchganggewebes kommt (Diedrich, 2007, Lüllmann-Rauch, 2015, Macias and Hinck, 2012), und es wird etwa ab dem 8. Schwangerschaftsmonat Muttermilch gebildet. Postnatal sorgen die Hormone Prolaktin und Oxytocin durch eine neurohormonale Kopplung beim Saugreiz des Säuglings an der Mamille für eine anhaltende Laktation während der Stillperiode (Diedrich, 2007).

So wie Hormone physiologisch eine wichtige Rolle im weiblichen „Brustzyklus“ spielen, sind sie auch bei vielen Erkrankungen beteiligt - unter anderem beim häufig auftretenden Mammakarzinom.

I.2. Brustkrebs

I.2.1. Inzidenz und Prävalenz

Brustkrebs (Mamma-Karzinom / Mamma-Ca) hat für Frauen eine signifikante Relevanz. Mit einer Prävalenz von 170 auf 100 000 Frauen erkrankt statistisch gesehen jede 8. Frau im Laufe ihres Lebens (Lebenszeitrisiko 12 %), ungefähr jede vierte Erkrankte stirbt daran. Es ist über alle Geschlechter weltweit das zweithäufigste Karzinom, unter Frauen sogar das häufigste (11.6 % aller Krebserkrankungen, unter Frauen 31 % aller Krebserkrankungen) (World Health Organization (WHO), March 2019) (Abbildung 3). An keinem Tumor sterben weltweit so viele Frauen wie am Mamma-Ca (Torre et al., 2015). Auch Männer können betroffen sein, stellen aber mit einem Prozentsatz von nur etwa 1 % der Betroffenen eine eher untergeordnete Patientengruppe dar (Geschlechterverteilung 100:1) (Barnes et al., 2016).

In Deutschland erkranken etwa 70 000 Frauen und ca. 700 Männer pro Jahr an Brustkrebs (Stand 2018). Die Tendenz ist steigend, was zum Teil auch auf verbesserte Früherkennungsmaßnahmen zurückzuführen ist. Das Robert-Koch-Institut geht von einem Anstieg der Inzidenzen um etwa 1.3 % pro Jahr aus und rechnet mit etwa 78 000 Neuerkrankungen im Jahr 2020. Während die Inzidenz steigt, sinkt die Mortalität der Brustkrebserkrankten um etwa den selben Prozentsatz (Barnes et al., 2016) (Abbildung 3 und 4).

Number of new cases in 2018, both sexes, all ages

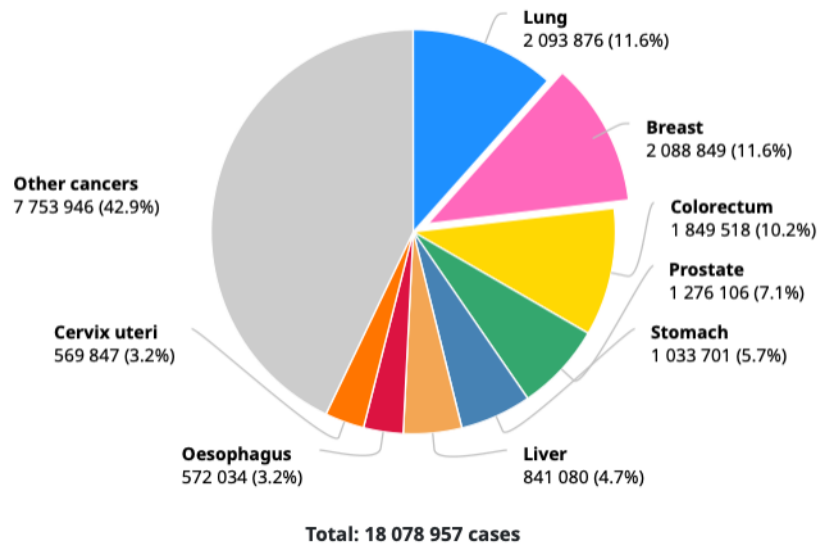


Abbildung 3 Prozentuale Aufstellung der häufigsten Krebserkrankungen weltweit

Brustkrebs ist nach Lungenkrebs die häufigste Krebserkrankung über alle Geschlechter. (entnommen aus: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Global Cancer Observatory, 2019, <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancer/20-Breast-fact-sheet.pdf>, zuletzt 04.05.2020)

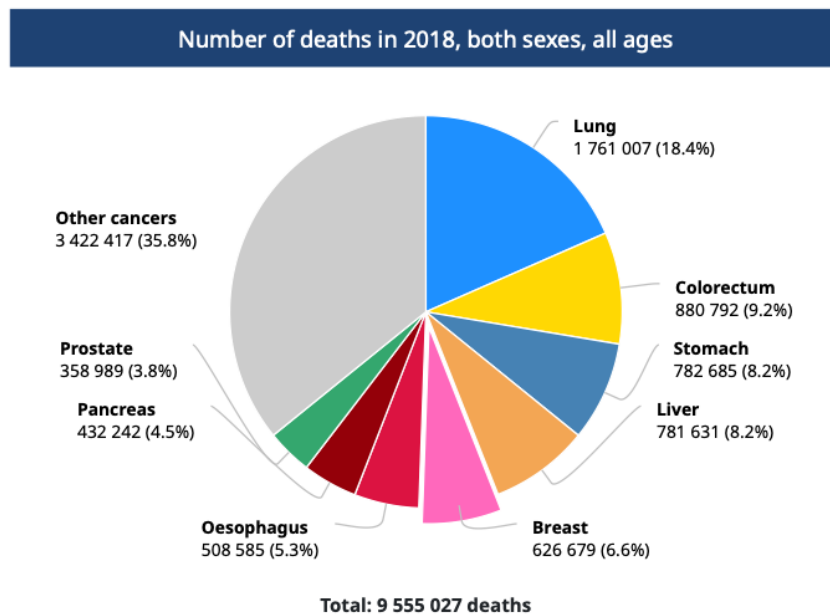


Abbildung 4 Prozentuale Aufstellung der häufigsten Todesfälle aufgrund Krebs weltweit

Während Lungenkrebs auch die häufigsten Todesfälle zu verzeichnen hat, liegt die Mortalität von Brustkrebs trotz der hohen Inzidenzen nur bei 6.6 % der Krebserkrankungen.

(entnommen aus: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Global Cancer Observatory, 2019, <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancer/20-Breast-fact-sheet.pdf>, zuletzt 04.05.2020)

Alle Altersgruppen können betroffen sein - ein Erkrankungsgipfel findet sich in Deutschland aber zwischen dem 55. und 70. Lebensjahr, statistisch besteht mit 64 Jahren das größte Risiko, an einem Mamma-Ca zu erkranken (International Agency for Research on Cancer, 2014).

I.2.2. Ätiologie des Mammakarzinoms

Die Ätiologie des Mammakarzinoms bleibt bis heute ungeklärt. Jedoch wurden einige Risikofaktoren identifiziert, die vor allem auf der Einwirkung von Hormonen beruhen. Dazu gehört eine frühe erste Regelblutung (Menarche) und eine späte letzte Regelblutung (Menopause). Auch lebensstilbedingte Risikofaktoren spielen eine Rolle, wie Bewegungsmangel, Adipositas, Alkohol- und Tabakkonsum (Arthur et al., 2020). Für die Langzeiteinnahme von Hormonersatzpräparaten konnte ein Zusammenhang mit einem

erhöhten Risiko nachgewiesen werden, der aber nicht abschließend bestätigt ist (Ji et al., 2019). Auf der anderen Seite stellen sich mehrfache Schwangerschaften und Stillzeiten als protektive Faktoren für eine Brustkrebserkrankung dar (Barnes et al., 2016, Fischer, 2014).

In den allermeisten Fällen tritt eine Brustkrebserkrankung sporadisch auf (ca. 90 % der Fälle) (Diedrich, 2007). Es sind heute aber einige Keimbahnmutationen bekannt, die mit einem deutlich erhöhten Risiko für eine Tumorentstehung einhergehen (Pharoah et al., 1997). Das wohl bekannteste Beispiel dürfte das Tumorsuppressor-Gen BRCA1 bzw. BRCA2 sein, das zu seiner Popularität außerhalb der Fachwelt durch betroffene Prominente wie Angelina Jolie (amerikanische Schauspielerin) gekommen sein dürfte. Hereditäre Karzinome zeichnen sich durch früheres Erkrankungsalter, höhere Prävalenzen bilateraler Karzinome sowie Häufung assoziierter Tumorerkrankungen (Ovar, Magen-Darm, Lunge, Pankreas, Niere, Blase, Leukämie) in der betroffenen Familie aus. Bei etwa der Hälfte der hereditären Mamma-Ca liegt eine Mutation in einem der BRCA-Gene vor (Antoniou et al., 2003).

Für Frauen mit einer positiven Familienanamnese für BRCA1 oder -2 assoziierter Tumorerkrankungen besteht ein lebenslang deutlich erhöhtes Risiko, an Brust- oder Ovarialkarzinomen zu erkranken. Für Frauen mit einer BRCA1-Mutation liegt das Risiko, vor dem 70. Lebensjahr zu erkranken, bei 65 %, bei einer BRCA2-Mutation bei 45 % (Antoniou et al., 2003). Bisher besteht die einzig effektive Prävention in der radikalen Mastektomie (Krebsgesellschaft, 2020). Insgesamt liegt der Anteil genetisch bedingter Mammakarzinome aber nur bei 5 - 10 % (Wallwiener, 2007).

Das Mamma-Ca stellt keine einheitliche Erkrankung dar. Bisher sind über 20 verschiedene Subtypen von Mammakarzinomen bekannt (Sinn and Kreipe, 2013), die sich genetisch, klinisch und pathologisch unterscheiden (Sachs et al., 2018). Es gibt 1600 Treibermutationen in 93 bekannten Brustkrebsgenen, die in Sequenzierungsstudien identifiziert wurden (Nik-Zainal et al., 2016).

Treibermutationen sind genetische Veränderungen in Tumorzellen, z. B. Translokationen oder Punktmutationen, die zu einer Veränderung der Proteinausstattung führen und so das Zellwachstum antreiben. „Brustkrebsgene“ sind bestimmte Gene, auf denen Mutationen bereits in der Keimbahn stattfinden und meist schon in jungen Jahren zu einer Entstehung von Brustkrebs führen. Trägerinnen dieser Mutationen haben ein lebenslang erhöhtes Risiko, an Brustkrebs zu erkranken.

I.2.3. Klassifikation des Mammakarzinoms

Die gängige Einteilung des Mammakarzinoms erfolgt anhand der internationalen TNM-Klassifikation (Brierley, 2017) (Tabelle 1).

Tabelle 1 TNM-Klassifikation für Mammakarzinom

Zusammengefasste Ausführung.

T - Tumorgröße

N - Nodalstatus (Infiltration von Lymphknoten)

M - Metastasen

p - pathologisch gesichert

(entnommen aus: Brierley J. D. et al. *TNM classification of malignant tumours*, 8. Auflage. Wiley-Blackwell 2016, ISBN 978-3-131-30832-0)

TNM Tumorausbreitung

Tis	Carcinoma in situ (Cis)
T1	Tumorgröße < 2 cm
T2	Tumorgröße > 2 cm und < 5 cm
T3	Tumorgröße > 5 cm
T4	Tumor jeder Größe mit Infiltration der Haut oder Brustwand
N1	Befall beweglicher axillärer Lymphknoten des Levels I-II
pN1	pN1mi: Mikrometastasen pN1a: 1 - 3 axilläre Lymphknoten pN1b: Lymphknoten entlang A. mammaria interna (mikroskopisch, aber klinisch nicht erkennbar) pN1c: pN1a + pN1b
N2	Befall fixierter axillärer Lymphknoten des Levels I-II oder klinisch diagnostizierter isolierter Befall ipsilateraler Lymphknoten der A. mammaria interna
N3	Befall supra- oder infraklavikulärer Lymphknoten (Level III), gleichzeitiger Befall von axillären und Mammaria-interna-Lymphknoten
M	M0: keine Fernmetastasen M1: Fernmetastasen

Diese TNM-Klassifikationen werden von der *Union for International Cancer Control* (UICC) und der *American Joint Commission on Cancer* (AJCC) weiter zusammengefasst und dienen der Therapieempfehlung nach Diagnose eines Mamma-Ca.

Tabelle 2 UICC/AJCC-Stadieneinteilung für Mammakarzinom

(entnommen aus: <https://www.uicc.org/resources/tnm>, zuletzt: 14.03.2020)

UICC/AJCC-Stadium

0		Tis, N0, M0
I	IA	T1, N0, M0
	IB	T0 - T1, N1mic, M0
II	IIA	T0 - T1, N1, M0 T2, N0, M0
	IIB	T2, N1, M0 T3, N0, M0
III	IIIA	T0 - T2, N2, M0 T3, N1 - N2, M0
	IIIB	T4, N0 - N2, M0
	IIIC	Jedes T, N3, M0
IV		Jedes T, jedes N, M1

Zusätzlich zur klinischen Einteilung in die UICC/AJCC-Stadien wird eine pathologische Beurteilung anhand der Histologie durchgeführt.

Die meisten Mammakarzinome haben ihren Ausgang im Drüsengewebe der Milchgänge (duktal) oder der Drüsenläppchen (lobulär) (Milchgänge > Drüsenläppchen), da aber oftmals keine definitive Zuteilung zum Ursprungsgewebe mehr möglich ist, wird in invasive Karzinome ohne (*invasive carcinoma of no special type*, NST, Abbildung 5) und mit speziellem Typ unterschieden. 75 % der Karzinome sind NST; zum invasiven Karzinom mit speziellem Typ gehört z. B. das invasiv-lobuläre Karzinom, das etwa 15 % aller Mammakarzinome ausmacht (Sinn and Kreipe, 2013).

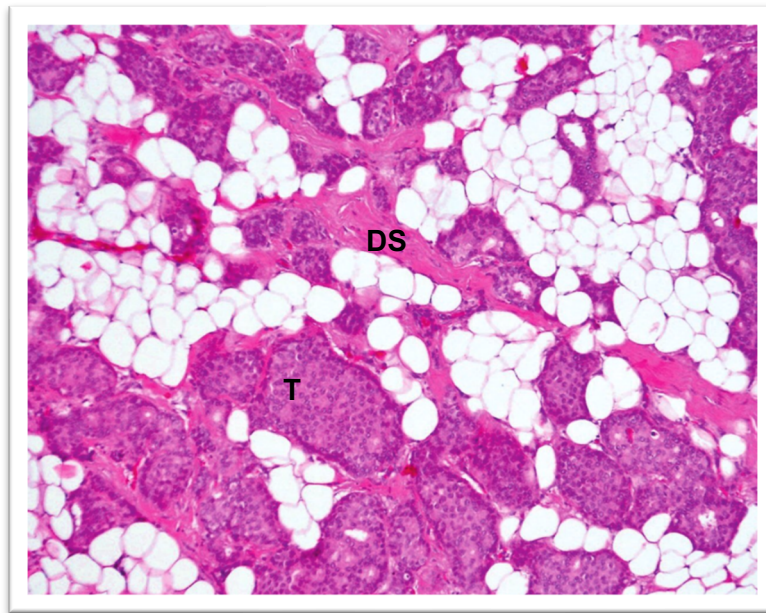


Abbildung 5 Mammakarzinom vom non special type (NST), früher invasiv-duktales Karzinom. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Drüsenacini sind erweitert und von die Basalmembran überschreitenden, kohäsiv wachsenden Tumorzellen (T) ausgefüllt, ein Drüsenlumen ist kaum mehr erkennbar. Es zeigt sich eine desmoplastische Stromareaktion (DS; Bildung von kollagenreichem Bindegewebe durch den Tumor) zwischen den Tumorinseln.

2.5x Vergrößerung

(entnommen aus: https://next.amboss.com/de/article/_k05qT#tVbXws, zuletzt 04.05.2020)

Des Weiteren klinisch entscheidend ist die Hormonrezeptorausstattung (Östrogen- sowie Progesteron-Rezeptoren, kurz ER und PR), sowie das Vorhandensein einer Mutation im *Human Epidermal Growth Receptor 2* (HER2). Ein positiver Hormonrezeptorstatus beeinflusst das Tumorstadium durch Hormoneinwirkung und sorgt für eine gesteigerte Proliferation. Eine Mutation im Gen für den Wachstumsrezeptor HER2 führt zu einer erhöhten Wachstumsrate in den Tumorzellen (Keyhani et al., 2012). Es wird unterschieden in ER/PR- bzw. HER2-positiv Tumore. Brusttumore können sowohl ER/PR-positiv als auch HER2-positiv sein, können aber auch nur eine von beiden oder keine der Mutationen aufweisen (triple-negative Tumore, häufig basaler Typ). Außerdem können noch Tumore vom Typ basal, luminal A und luminal B unterschieden werden. Diese Unterscheidung trägt zu einer Einschätzung der Therapiewirksamkeit bei, so sind z. B. Karzinomtypen vom Typ luminal A bzw. B sensitiver auf Hormontherapien. Basale Tumore sind schwierig zu therapieren, wachsen häufig aggressiv und haben eine schlechte

Prognose. Sie gehen i. d. R. mit einem triple-negativen Status einher (Holliday and Speirs, 2011).

Die Differenzierung in hormonrezeptorsensitive, HER2-positive bzw. triple-negative Tumore entscheidet über die Therapiewahl.

I.2.4. Therapie des Mammakarzinoms

Allgemein wird das Mammakarzinom wie andere Tumorentitäten auch mit Operation, Chemo- und Strahlentherapie therapiert. Für die Wahl der Therapie spielen u. a. die Tumorausdehnung, der Lymphknotenbefall, die Metastasierung und der Allgemeinzustand der Patientin/des Patienten eine Rolle.

Abhängig vom Hormonrezeptorstatus bzw. dem HER2-Status sprechen Mammakarzinome unterschiedlich gut auf bestimmte Therapien an.

Während hormonrezeptorsensitive Tumore gut auf eine Therapie mit dem kompetitiven Östrogenrezeptorinhibitor Tamoxifen ansprechen, der die Wirkung von Östrogen auf das Brustdrüsengewebe mindert und somit den Wachstumsreiz für den Tumor hemmt, sprechen HER2-positive Tumore v. a. gut auf Antikörpertherapien, z. B. mit dem Antikörper Trastuzumab, der sich gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor HER2/neu richtet, an (Fischer, 2014).

Triple-negative Tumore, die weder einen positiven Hormonrezeptorstatus noch einen positiven HER2-Status aufweisen, stellen sich in der Therapie als schwieriger dar und können bisher ausschließlich mit den allgemeinen Tumorthérapien behandelt werden.

I.2.5. Prognose des Mammakarzinoms

Die Prognose einer Brustkrebserkrankung ist stark vom Stadium abhängig.

In einem früh erkannten Stadium bestehen sehr gute Heilungschancen mit neoadjuvanter (vor einer Operation stattfindenden) Chemotherapie und Tumorresektion. Bereits bei Befall der regionären Lymphknoten ist mit einer höheren und früheren Rezidivrate zu rechnen, das Auftreten von Fernmetastasen geht nach wie vor mit einer sehr schlechten Prognose einher (Carey et al., 2005).

Alles in allem ist die Langzeitprognose aber sehr gut. Es besteht ein relatives 5-Jahres-Überleben von 88 % der Frauen und 77 % der Männer (Barnes et al., 2016) (Abbildung 6 und 7).

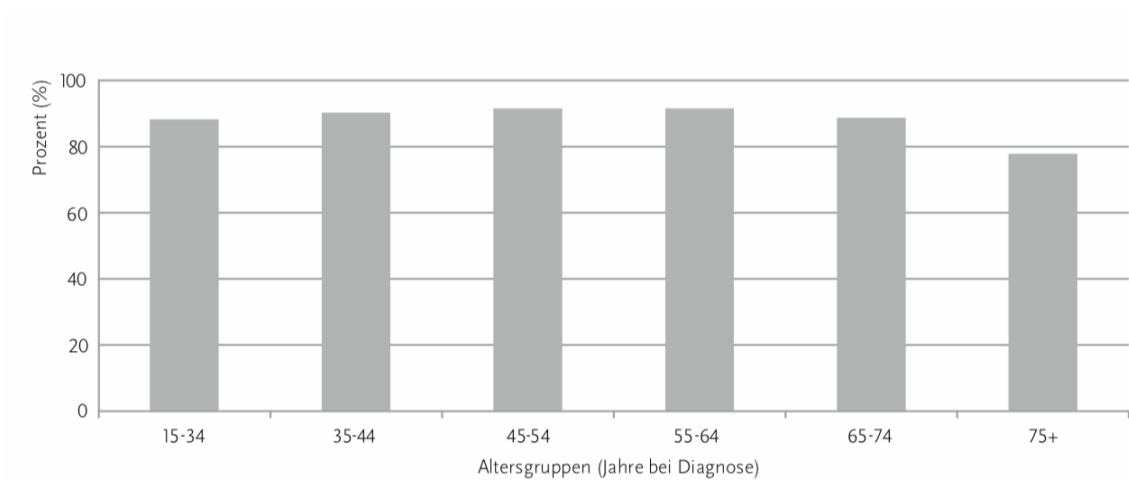


Abbildung 6 Relatives 5-Jahres-Überleben, nach Altersgruppe getrennt

Brustkrebs bei Frauen, 2011-2013, Periodenansatz, nach Altersgruppe, Quelle: Zentrum für Krebsregisterdaten

(entnommen aus: Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016, Robert-Koch-Institut, S. 36 ff.)

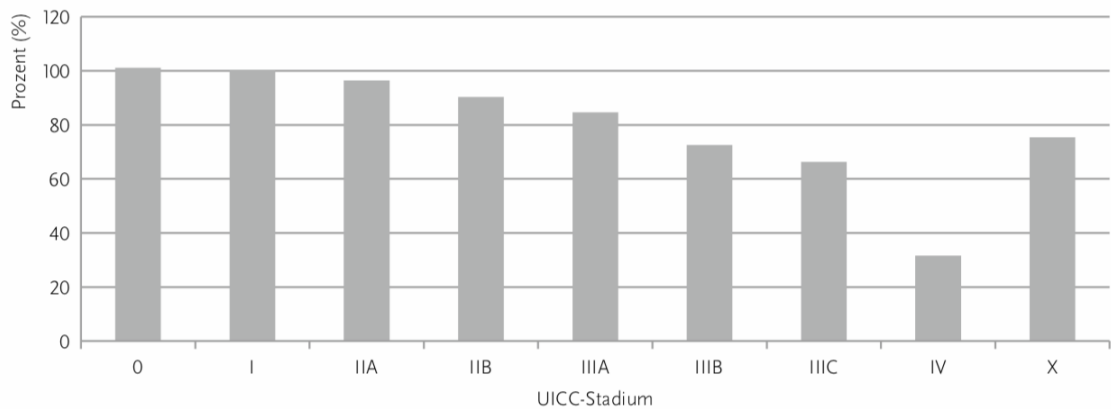


Abbildung 7 Relatives 5-Jahres-Überleben, nach Tumorstadien getrennt

Brustkrebs bei Frauen, 2004-2008, Kohortenansatz, nach UICC-Stadium

X: unbekanntes Stadium, Quelle: Zentrum für Krebsregisterdaten

(entnommen aus: Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016, Robert-Koch-Institut, S. 36 ff.)

I.3. Die Extrazellulärmatrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist das Material, das zusammen mit der interstitiellen Flüssigkeit die Räume zwischen den Zellen füllt bzw. als Basalmembran das Epithel vom umgebenden Stroma trennt (Bonnans et al., 2014). Sie umfasst die Gesamtheit aller von den Zellen eines Gewebes sezernierten und anschließend deponierten Proteine und azellulären Bestandteile und kommt in allen Geweben vor. Die einzelnen Komponenten der Extrazellulärmatrix bilden ein komplex organisiertes, miteinander interagierendes Netzwerk, das zahlreiche Funktionen innerhalb eines Gewebes erfüllt und sich aus zell-/gewebespezifischen Makromolekülen zusammensetzt (Theocharis et al., 2016, Frantz et al., 2010). Sie liefert Struktur, trennt Gewebe voneinander und reguliert die interzelluläre Kommunikation. Des Weiteren enthält sie eine Reihe von gebundenen Wachstumsfaktoren und Cytokinen (Roy and Walsh, 2014).

Die Komponenten der ECM lassen sich in die drei großen Gruppen der Kollagene, Proteoglykane und Glykoproteine einteilen (Bonnans et al., 2014, Hynes and Naba, 2012).

I.3.1. Kollagene

Kollagene sind eine heterogene Gruppe von triple-helikalen Strukturproteinen, die im menschlichen Körper ungefähr 30 % des Gesamtproteins ausmachen. Sie sind der Hauptbestandteil von Knochen, Sehnen, Zähnen, Knorpel, Haut und Blutgefäßen und sind hauptverantwortlich für die Eigenschaften dieser Gewebe - also Stabilität (z. B. Kollagen Typ I) oder Elastizität (Lüllmann-Rauch, 2015).

Es gibt über 28 verschiedene Kollagentypen, die in fibrilläre Kollagene (z. B. Typ I-III), Netzwerk-bildende Kollagene (z. B. Typ IV, das in der Basalmembran vorkommt), faserassoziierte Kollagene (z. B. Typ IX, XII) und andere (z. B. Typ VI) eingeteilt werden können (Bonnans et al., 2014). Je nach ihrer Zuordnung erfüllen sie unterschiedliche Aufgaben (Hynes and Naba, 2012).

I.3.2. Proteoglykane

Proteoglykane sind Proteinfäden, an die mindestens eine, in der Regel aber mehrere Glykosaminoglykane (GAGs) kovalent gebunden sind. Je nach Aufbau der GAG-Seitenketten können Proteoglykane in weitere Untergruppen unterteilt werden: Heparansulfat, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat und Keratansulfat, die alle sulfatiert sind. Sie sind

nicht nur in der interstitiellen ECM (Aggrecan, Decorin) vorhanden, sondern kommen auch als Teil der Basalmembran (Perlecan) und auf Zelloberflächen (Syndecan) vor und erfüllen dementsprechend ein weites Aufgabenspektrum (Hynes and Naba, 2012, Iozzo, 1998). Aufgrund ihrer stark negativ geladenen Seitenketten können sie Wasser und Kationen binden und sind demnach z. B. für die Elastizität von Knorpelgewebe essentiell. Als Zelloberflächenrezeptoren oder Bestandteile der Basalmembran können sie mit Wachstumsfaktoren (Bonnans et al., 2014) und ihren Rezeptoren interagieren und wirken an der Regulation allgemeiner biologischer Prozesse wie der Kollagen-Fibrillogenese sowie an spezielleren Prozessen wie Neuritenwachstum mit (Iozzo, 1998).

I.3.3. Glykoproteine

Glykoproteine sind ebenfalls eine heterogene Gruppe von Proteinen, die kovalent mit verschiedenen Kohlenhydratgruppen (Mono-/Oligosaccharide) verbunden sind. Sie sind häufig Bestandteil der Zellmembran (Glykokalix), können aber auch als Teil der ECM bzw. Basalmembran (z. B. Nidogen, Fibronectin) vorkommen, wo sie als Liganden für Oberflächenrezeptoren der Zelle (v. a. Integrine) fungieren (Bonnans et al., 2014). Zu den am besten untersuchten Vertretern der Glykoproteine in der ECM gehören Fibronectine, Tenascine und Laminine (Hynes and Naba, 2012). Laminine seien im Folgenden als Vertreter von Basalmembranbestandteilen genauer erläutert.

I.3.3.1. Laminine

Laminine sind heterotrimere Basalmembranproteine, die aus einer α -, einer β - und einer γ -Kette aufgebaut sind. Es gibt fünfzehn verschiedene Laminine, die aus fünf verschiedenen α - (α 1-5), sowie je drei verschiedenen β - (β 1-3) und γ - (γ 1-3) Ketten, die unterschiedlich miteinander kombiniert vorliegen können, aufgebaut sind (Durbeej, 2010). Laminine werden entsprechend ihres Aufbaus aus den Ketten bezeichnet. So wäre ein Laminin, das aus der vierten α -, der zweiten β - und der ersten γ -Kette aufgebaut ist, das Laminin-421 (Aumailley et al., 2005). Als Mitglieder der Glykoproteine sind die Ketten der Laminine glykosyliert.

Laminine sind in der Lage, sich selbst mithilfe zellulärer Rezeptoren zu organisieren und Netzwerke auszubilden. Laminine werden von verschiedensten Zelltypen sekretiert, was sie zu essenziellen Bestandteilen der ECM macht. In der Basallamina sind sie v. a. Teil der Lamina densa, wo sie zusammen mit Kollagen IV, Nidogen und Perlecan zu den

Hauptbestandteilen zählen (Lüllmann-Rauch, 2015) (Abbildung 8). Laminine interagieren über Zelloberflächenrezeptoren (v. a. verschiedene Integrine) mit den Zellen eines Gewebes und erfüllen eine ganze Reihe verschiedener Funktionen, die von der Embryosowie Organogenese bis zu organspezifischen Abläufen reichen (Durbeej, 2010). So spielen sie eine wichtige Rolle in der Koordination von Interaktionen in der Basalmembran. Des Weiteren verankern sie als adhäsive Substrate die Zelle über Rezeptoren der Basallamina (als spezialisierte Form der ECM) mit anderen Strukturen der ECM (Durbeej, 2010).

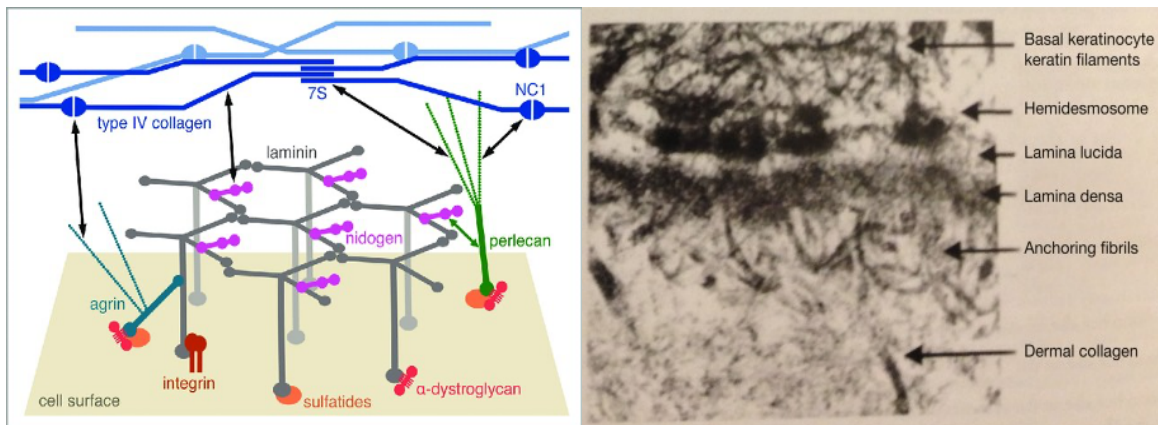


Abbildung 8 Basalmembran - Komponenten und Interaktionen, vereinfachtes Schema und elektronenmikroskopische Aufnahme

Links - Schematische Darstellung der molekularen Struktur der Basalmembran. Die Laminine sind ein zentraler Organisationsbestandteil der Basalmembran. Über sie und verschiedene Rezeptoren (Integrine, α -Dystroglycan, sulfatierte Glykolipide/Sulfatide) ist die Zelle mit der Lamina densa der Basallamina verankert, wo sie u. a. an Nidogen und Kollagene binden. Das Heparansulfatproteoglykan Perlecan (so auch Agrin) verbindet sowohl Mikrofibrillen in der ECM als auch Integrine mit der Basallamina. Parallel bildet Kollagen IV ein unabhängiges Netzwerk in der Basalmembran, über das Interaktionen zu verschiedenen anderen Bestandteilen stattfindet (über N-terminale 7S- und C-terminales NC1-Domäne).

Rechts - elektronenmikroskopische Aufnahme der Basalmembran (hier exemplarisch der Haut). Elektronenmikroskopisch ist zu erkennen, dass die Basalmembran sich in eine Lamina densa und eine Lamina rara (lucida) aufteilt. Die Lamina rara ist dabei eine scheinbar leere Zone, während die Lamina densa dichter erscheint. Hier sind die Hauptbestandteile Kollagen Typ IV, Laminine, Nidogen und Perlecan.

(entnommen aus: (Hohenester and Yurchenco, 2013) und Figure 3-22 of Elder, D.E., Elenitsas, R., Johnson Jr., B.L., Murphy, G.F., Xu, X., 2009. Histology of the Skin. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA)

I.4. Matrix-Metalloproteasen

I.4.1. Proteasen

Proteasen sind eine Gruppe proteolytischer Enzyme, die Peptidbindungen durch Hydrolyse spalten können. Je nach Art der Protease unterscheidet man Endo- von Exopeptidasen. Während Endopeptidasen Peptidbindungen innerhalb eines Peptids oder Proteins spalten, spalten Exopeptidasen Proteine von den Enden her hydrolytisch in ihre Bestandteile auf (<https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/proteasen/54116#>, 1999, Castro et al., 2011). Man unterscheidet Proteasen anhand ihres für die Katalyse benötigten, im katalytischen Zentrum enthaltenen „Rest“. So werden Proteasen in Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteasen unterteilt (Castro et al., 2011). Die Metalloproteasen können in weitere 27 Gruppen unterteilt werden, von denen eine der größten die Metzincine sind - eine universelle Übergruppe von Zink-abhängigen Endopeptidasen, zu denen auch die Matrix-Metalloproteasen (MMP), die Dinsintegrin-Metalloproteasen (ADAM) und die ADAMs mit Thrombospondin-Domänen (ADAMTS) gehören (Sekhon, 2010, Jackson et al., 2017).

Proteasen bewirken nicht nur den Abbau von Proteinen, sondern sind auch für die Aktivierung von inaktiven Vorstufen von Proteinen durch Proteolyse verantwortlich. Sie sind an einer Reihe verschiedener biochemischer, physiologischer und pathologischer Prozesse beteiligt (Cui et al., 2017).

I.4.2. Aufbau von Matrix-Metalloproteasen (MMPs)

Metalloproteasen sind Zn^{2+} -abhängige Endopeptidasen, die wie die Bestandteile der ECM ubiquitär vorkommen. Sie werden in die sechs Gruppen Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine, membranständige Metalloproteasen und andere Metalloproteasen unterteilt (Klein et al., 2015). Im humanen Organismus gibt es 23 verschiedene Metalloproteasen, wovon sechs membranständig vorkommen - somit sind der Großteil der MMPs sezernierte extrazelluläre Proteine (Rawlings et al., 2012). Metalloproteasen unterscheiden sich von anderen Endopeptidasen durch ihre Metallionen als Kofaktoren, durch ihre Fähigkeit, extrazelluläre Matrix abzubauen und durch ihre spezifische DNA-Sequenz (Sekhon, 2010).

Die MMPs besitzen einen gemeinsamen Aufbau aus Signalpeptid, Prodomäne, katalytischer Domäne mit Zn^{2+} -Ion, „Gelenk“ (Linker 1) und einem „Stiel“ (Linker 2) (s. Abbildung

9). Die Prodomäne dient als intramolekularer Inhibitor, der die inaktive Zymogenform durch Blockierung der katalytischen Domäne stabilisiert.

Einige MMPs besitzen zusätzlich eine Hemopexin-ähnliche Domäne (Pex) (Radisky and Radisky, 2015). Die Hemopexin-ähnliche Domäne trägt einerseits zu der Bindung der *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs), andererseits zur Lokalisation von MMPs über Proteinbindungen zu Zelloberflächenrezeptoren wie Integrinen bei (Radisky and Radisky, 2015, Cui et al., 2017). Zum Teil besitzen MMPs zusätzliche Domänen, die sie z. B. zu speziellen Membranstrukturen oder Multiproteinkomplexen leiten und so eine Spezifität für bestimmte Proteinsubstrate gewährleisten (Radisky and Radisky, 2015).

Die membranständigen Metalloproteasen (MT-MMP, Abbildung 9) besitzen zusätzlich einen Glykophosphatidylinositol (GPI)-Anker mit kurzer hydrophober Sequenz (MMP-17, -25) oder eine Transmembrandomäne (TM) mit intrazellulärem Anteil (MMP-14, -15, -16, -24) (Itoh, 2015, Radisky and Radisky, 2015).

Alle MT-MMPs besitzen ein konserviertes Aminosäuremotiv am C-Terminus der Prodomäne, das zur Aktivierung durch Proproteinkonvertasen wie Furin im Golgi-Apparat erkannt und gespalten wird. Die MT-MMPs werden als aktive Enzyme an der Zelloberfläche exprimiert. Dort bestehen die MT-MMPs nur noch aus der katalytischen Domäne, den Linkern, der Hemopexin-ähnlichen Domäne und ihrem Anker (Abbildung 9) (Itoh, 2015).

Wie die MT-MMPs werden auch die extrazellulären MMPs durch Abspaltung der Prodomäne aktiviert, dies geschieht jedoch extrazellulär. Aktiviert werden sie entweder durch andere MT-MMPs oder Serinproteasen im Extrazellulärraum. Extrazellulär können MMPs sowohl als inaktive Zymogene als auch als aktive MMPs vorliegen (Radisky and Radisky, 2015).

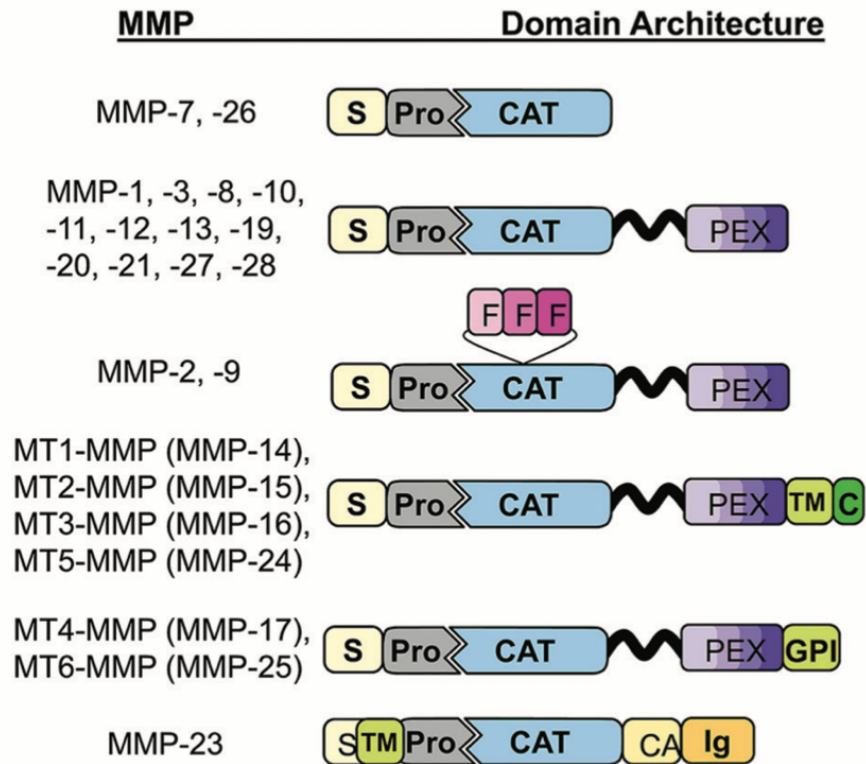


Abbildung 9 Schematischer Aufbau von Matrix-Metalloproteasen

MMPs sind aufgebaut aus einem Signalpeptid (S), einer Prodomäne (Pro), einer katalytischen Domäne (Cat) und zwei Linkern. Einige besitzen zusätzlich eine Hemopexin-ähnliche Domäne (Pex). An den Linker 2 (schwarze Linie) schließt sich bei den MT-MMPs die entsprechende Ankersequenz an.

TM - Transmembran-Domäne

GPI - Glykophosphatidylinositol-Anker

F - Fibronectin type II repeats

(entnommen aus: (Radisky and Radisky, 2015))

I.4.3. Aufgaben von Matrix-Metalloproteasen

Eine der Hauptaufgaben der MMPs liegt in der Spaltung und im Abbau von Komponenten der ECM. Fast jeder Bestandteil der ECM kann von einer oder mehreren MMPs umgesetzt werden (Page-McCaw et al., 2007, Rodríguez et al., 2010). Viele MMPs sind dabei in der Lage, Kollagene zu spalten. Sie erleichtern so die Zellinvasion durch die

Basalmembran von Epithelien, was auch bei pathologischen Prozessen wie der Entstehung und Ausbreitung von Tumorerkrankungen eine Rolle spielt (Kessenbrock et al., 2010, Radisky and Radisky, 2010).

Doch auch Nicht-Komponenten der ECM gehören zu den Angriffspunkten von MMPs. Sezernierte MMPs und MT-MMPs erfüllen ihre Funktionen auch durch die Spaltung einer Reihe verschiedener Moleküle, die wiederum in zellulären Signalkaskaden beteiligt sind oder als Chemokine fungieren, z. B. für Zellen des Immunsystems (Rodríguez et al., 2010, Itoh, 2015).

Durch ihr breites Spektrum an Substraten sind MMPs maßgeblich an der Anpassung des Mikromilieus von Organen und an einer ganzen Bandbreite wichtiger biologischer Prozesse beteiligt, die von der Implantation der Eizelle in die Uterusschleimhaut (Alexander et al., 1996) bis hin zu Apoptose und Nekrose reichen (Egeblad and Werb, 2002, Piccard et al., 2007, Curtis et al., 2012) (Übersicht Tabelle 3). So können MMPs z. B. am Gleichgewicht des Gewebeum- und -abbaus mitwirken, indem sie Substrate wie das inaktive TGF β in seine aktive Form spalten. Das aktive TGF β ist ein wichtiger Regulator des Zellzyklus, in dem es in gesunden Zellen einen Arrest bewirken kann (Annes et al., 2003).

Proteolysen durch Metalloproteasen spielen eine wichtige Rolle bei einer Reihe von morphogenetischen Prozessen wie der Ossifikation von Knochen (Holmbeck et al., 1999), der Angiogenese oder der Entwicklung der Brustdrüse (Rodríguez et al., 2010). Des Weiteren sind sie beteiligt an physiologischen Vorgängen wie Wundheilung, Menstruation und Reproduktion; umgekehrt konnte auch ein Zusammenhang zwischen einer Fehlregulation der MMPs und einiger Pathologien wie rheumatoider Arthritis, chronischen Entzündungen und Krebs gefunden werden (Rodríguez et al., 2010) – weshalb sie schon früher in den Fokus von der Entwicklung eines neuen Therapieansatzes gelangten.

Anhand der vielen verschiedenen Ansatzpunkte von Metalloproteasen lässt sich bereits ableiten, dass eine Abweichung von der Norm bei der Entstehung von Krankheiten maßgeblich mitwirken kann.

Tabelle 3 Klassifikation und Übersicht von Matrix-Metalloproteasen

(modifiziert und zusammengefasst nach: (Kapoor et al., 2016))

MMP	Klassifikation	Typ	Substrat - Auswahl
MMP-1	Kollagenase	Kollagenase-1	Kollagene (I-III, VII-VIII, X), Gelatine, Aggrecan, L-Selectin, IL-1 β , Proteoglycane, Entactin, Ovostatin, MMP-2, MMP-9
MMP-8	Kollagenase	Kollagenase-2	Kollagene (I-III, V, VII, VIII, X), Gelatine, Aggrecan, Fibronectin
MMP-13	Kollagenase	Kollagenase-3	Kollagene (I-IV, IX, X, XIV), Gelatine, Plasminogen, Aggrecan, Perlecan, Fibronectin, Osteonectin, MM
MMP-2	Gelatinase	Gelatinase A	Gelatine, Kollagene (IV-VI, X), Elastin, Fibronectin
MMP-9	Gelatinase	Gelatinase B	Kollagene (IV, V, VII, X, XIV), Gelatine, Entactin, Aggrecan, Elastin, Fibronectin, Osteonectin, Plasminogen, MBP, IL-1 β
MMP-3	Stromelysin	Stromelysin-1	Kollagene (III-V, IX), Gelatine, Aggrecan, Perlecan, Decorin, Laminin, Elastin, Casein, Osteonectin, Ovostatin, Entactin, Plasminogen, MBP, IL-1 β
MMP-10	Stromelysin	Stromelysin-2	Kollagene (III-V), Gelatine, Casein, Aggrecan, Elastin, MMP-1, MMP-8
MMP-11	Stromelysin	Stromelysin-3	Unbekannt (Casein)
MMP-7	Matrilysin	Matrilysin-1 (PUMP)	Kollagene (IV, X), Gelatine, Aggrecan, Decorin, Fibronectin, Laminin, Elastin, Casein, Transferrin, Plasminogen, MBP, β 4-Integrin, MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-9/TIMP-1
MMP-26	Matrilysin	Matrilysin-2	Kollagen IV, Fibronectin, Fibrinogen, Gelatine, α (I)-Proteinase-Inhibitor
MMP-14	MT-MMP	MT1-MMP	Kollagene (I-III), Gelatine, Casein, Fibronectin, Laminin, Vitronectin, Entactin, Proteoglycane, MMP-2, MMP-13
MMP-15	MT-MMP	MT2-MMP	Fibronectin, Entactin, Laminin, Aggrecan, Perlecan, MMP-2
MMP-16	MT-MMP	MT3-MMP	Kollagen III, Gelatine, Casein, Fibronectin, MMP-2

MMP	Klassifikation	Typ	Substrat - Auswahl
MMP-17	MT-MMP	MT4-MMP	unbekannt
MMP-24	MT-MMP	MT5-MMP	Fibronectin
MMP-25	MT-MMP	MT6-MMP	Pro-Gelatinase A
MMP-12	Andere Enzyme	Makrophagen Metalloelastase	Kollagen (I, IV), Gelatine, Elastin, Casein, Fibronectin, Laminin, Vitronectin, Fibrin, Plasminogen
MMP-19	Andere Enzyme	RASI-1	Kollagen I
MMP-20	Andere Enzyme	Enamelysin	Amelogenin, Aggrecan, COMP
MMP-22	Andere Enzyme	Identifiziertes MMP auf Chromosom 1	
MMP-23	Andere Enzyme	Auf humaner ovarieller cDNA identifiziert	
MMP-28	Andere Enzyme	unbekannt	

I.4.4.Fehlregulation von Matrix-Metalloproteasen

Schon in mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass ein Funktionsverlust oder eine Fehlregulation der Expression von MMPs zu verschiedenen Pathologien eines Organsystems führen.

MMP-14 scheint eine zentrale Rolle in der Homöostase des Knochenstoffwechsels sowie Pathologien rund um den Knochen, wie bei rheumatischen Autoimmunerkrankungen und malignen Neoplasien (multiples Melanom, Metastasierung von Brust- und Prostatakrebs), einzunehmen (Rodríguez et al., 2010). Ein Funktionsverlust von MMPs, darunter MMP-14, führt zu einem vermehrten Knochenabbau aufgrund beeinträchtigter Vaskularisation von Knorpel in Ossifikationszentren (Holmbeck et al., 1999).

In Tumorzellen, u. a. in Brustkrebs (Radisky and Radisky, 2015) oder Pankreaskarzinom (Coussens et al., 2002), konnte teilweise eine Überexpression bestimmter Metalloproteasen nachgewiesen werden. Für Brustkrebs wurden in Analysen von Patientendatensets v. a. MMP-1, -9, -11, -12, -14 und -15 als negative Marker für den Ausgang einer Brustkrebserkrankung identifiziert (McGowan and Duffy, 2008, Roy and Walsh, 2014). Dabei korrelieren MMP-14 und MMP-9 bei einer Überexpression in Brustkrebszellen mit

einem kürzeren rezidiv-freien Intervall und einer geringeren Überlebensspanne insgesamt. Diese Überexpression ließ sich nicht nur auf Tumorzellen finden, sondern auch andere Zelltypen, wie Fibroblasten und Monozyten, können MMPs verändert exprimieren und gehen mit einer schlechten Prognose für die BrustkrebspatientInnen einher (Vizoso et al., 2007). Es hat sich in Studien bereits ein Zusammenhang zwischen einer Überexpression von MMPs und Tumorprogression bzw. -metastasierung gezeigt. Dabei wurde die veränderte Expression in Stadien fortgeschrittener invasiver Tumore (Radisky and Radisky, 2015) festgestellt, aber auch in prämaligen *Carcinoma in situ* (Cis)-Veränderungen wie der duktalem Hyperplasie konnten schon veränderte MMP-Expressionen nachgewiesen werden, die sich im Verlauf als prädiktive Marker für eine Progression herausstellten (Poola et al., 2005) (Abbildung 10). Aus diesem Grund gelten Matrix-Metalloproteasen auch als Treiber der Progression und Metastasierung und sind häufig Marker für eine schlechte Prognose (Kessenbrock et al., 2010); gleichzeitig sind sie aber auch vielversprechend als Früherkennungsmarker.

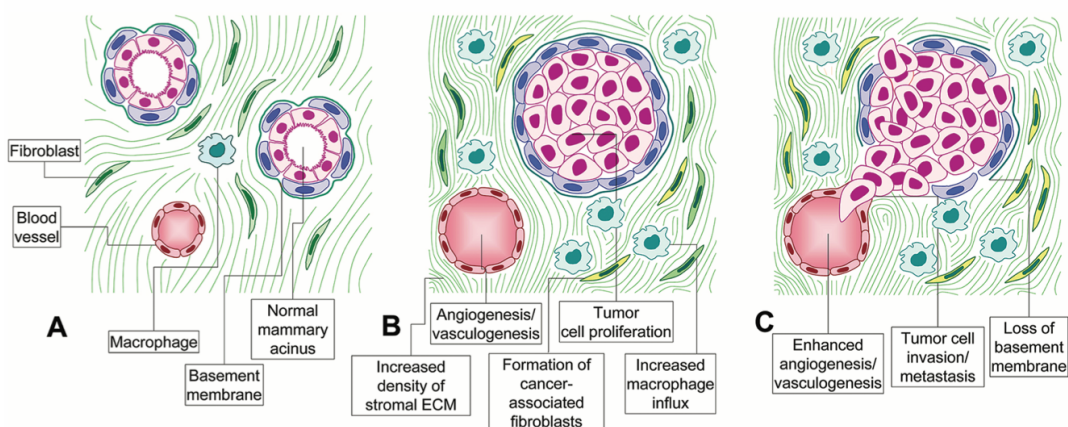


Abbildung 10 Die Rolle von MMPs in der Brustkrebs-Progression

A - Im gesunden Brustgewebe sind Drüsenazini in kollagenes Bindegewebe eingebettet.

B - Beim duktalem Carcinoma in situ (dCis) werden MMPs von aktivierten Fibroblasten produziert, es kommt zu einer Infiltration durch Makrophagen und andere Zellen des Immunsystems und die Zellen der Drüsenazini weisen einen erhöhten Proliferationsindex auf, der die Grenzen der Basalmembran noch akzeptiert.

C - Das invasive Mamma-Ca übertritt die Basalmembran der Drüsenazini und infiltriert das umliegende Bindegewebe sowie beginnend Blutgefäße durch Degradation der extrazellulären Matrixbestandteile mithilfe der MMPs.

(entnommen aus: (Radisky and Radisky, 2015))

Es ist bekannt, dass MMPs maßgeblich an Prozessen beteiligt sind, die eine Tumorentstehung bzw. -wachstum begünstigen. So stimulieren MMPs die Zellproliferation durch Freisetzung verschiedener pro-proliferativer Chemokine (Kessenbrock et al., 2010), sowie die Aussprossung von Gefäßen für ein gefäßbildendes Mimikry zur Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff (Seftor et al., 2012) und formen so das Tumormikroenvironment durch ihren Einfluss auf umliegende Zelltypen des Stromas (Radisky and Radisky, 2015).

Matrix-Metalloproteasen gelangten deshalb in der Vergangenheit schon öfter in den Fokus von Studien, die MMPs als Therapieansatz nutzen wollten. Obwohl besagte Studien als vielversprechend angesehen wurden, war die klinische Phase bisher nicht erfolgreich (Overall and Kleinfeld, 2006, Overall and López-Otín, 2002, Coussens et al., 2002a, Coussens et al., 2002b). So konnte der Breitspektrum-Inhibitor Marimastat, der die katalytische Domäne der meisten MMPs blockierte, keine signifikante Verlängerung der progressionsfreien Zeit bei metastasiertem Brustkrebs erzielen (Sparano et al., 2004). Aufgrund der signifikanten Expressionsveränderung von Metalloproteasen in Brusttumoren ist ein erneuter Blick auf einen möglichen Therapieansatz weiterhin lohnenswert.

I.4.5. Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs)

TIMPs sind eine Gruppe kleiner sekretierter, homologer Proteine, deren Funktion vor allem in der Inhibition der Aktivität von Metalloproteasen (C-Terminus) besteht, die aber auch eine Reihe anderer MMP-unabhängiger Funktionen erfüllen (N-Terminus) (Murphy, 2011, Stetler-Stevenson, 2008).

Es gibt vier verschiedene TIMPs (TIMP1 - 4), die unabhängig von ihrer regulatorischen Wirkung auf MMPs auch durch die Bindung an Oberflächenrezeptoren direkt Einfluss auf Zellsignalwege und dadurch auf Proliferation, Zellwachstum und Apoptose (Tabelle 4) nehmen. Die vier TIMPs inhibieren alle MMPs und darüber hinaus auch einige andere Mitglieder der Metzincin-Familie, wie Disintegrin-Metalloproteasen (ADAM, ADAMTS), wodurch sie von großer Bedeutung für den Gewebeumbau und die interzelluläre Kommunikation sind (Murphy, 2011).

Tabelle 4 Eigenschaften humaner TIMPs

AngIIIR - Angiotensin-II-Rezeptor

EFEMP1 - EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1

VEGFR - vascular endothelial growth factor receptor

LRP1 - low density lipoprotein receptor-related protein 1

(entnommen aus: (Murphy, 2011))

	TIMP1	TIMP2	TIMP3	TIMP4
Lokalisation	löslich/Zelloberfläche	löslich/Zelloberfläche	extrazelluläre Matrix/Zelloberfläche	löslich/Zelloberfläche
Bindungspartner	CD63, LRP1/MMP9	$\alpha\beta$ 1 Integrin, LRP1	EFEMP1, AngIIIR, VEGFR	
Zellproliferation	erythroide Zellen, Tumorzellen	erythroide Zellen, Tumorzellen, Fibroblasten, glatte Muskelzellen	glatte Muskelzellen, Tumorzellen	Brustkrebszellen
Tumorangiogenese	erhöht in der Brust, erniedrigt in der Leber	erniedrigt im Melanom und der Brust	erniedrigt im Melanom	
tumorogene Effekte	inhibiert	inhibiert	inhibiert	inhibiert
metastatische Effekte	stimuliert			stimuliert

Das Expressionsmuster von TIMPs ist gewebespezifisch und lässt sich durch verschiedene Cytokine und Wachstumsfaktoren regulieren. Die unterschiedlichen Subtypen der TIMPs sind dabei in bestimmten Organsystemen gehäuft zu finden; so ist die TIMP1-Expression v. a. in Organen des Reproduktionssystems sowie in Bereichen des zentralen Nervensystems mit erhöhter neuronaler Plastizität, wie dem Hippocampus, zu finden (Rivera et al., 2010). Dadurch ergibt sich auch bei den TIMP-Subtypen ein diverses Aufgabenspektrum, das jedoch nicht abschließend untersucht ist. TIMP1 spielt eine Rolle in der Zellproliferation und zeigt einen anti-apoptotischen Effekt auf einige Zelltypen. TIMP2 ist ebenfalls in Mechanismen der Zellproliferation zu finden und TIMP3 kann je nach Zelltyp apoptotische Effekte haben (dies zeigte sich auch in Tumorzellen). Das

Fehlen von TIMP3 in Tumoren erwies sich in Studien als schlechte Prognose für die Patienten (Jackson et al., 2017).

Entgegen der Erwartung waren TIMP1-Konzentrationen bei Brust- und Colon-Karzinompatienten häufig erhöht und gingen hier mit einer schlechten Prognose für den Krankheitsverlauf einher. Diese Tatsache legt ein Augenmerk auf den Gebrauch von TIMPs als Biomarker und prognostischer Faktor in verschiedenen Tumoren, darunter Brust, Colon und diverse hämatologische Neoplasien (Murphy, 2011).

Die breite Rollenverteilung von TIMPs in karzinogenen Prozessen eröffnet ein Forschungsspektrum für neue Therapieansätze der Krebstherapie.

I.5. Organoide

I.5.1. Allgemeines

Ein Organoid ist ein sehr vereinfachtes dreidimensionales (3D)-Modell eines Organs. Organoide bestehen aus selbstorganisierenden Stammzellen, die in einem speziellen Kulturmedium mit Hilfe einer komplexen ECM organspezifisch ausreifen können und eine beinahe physiologische Histologie widerspiegeln (Kretzschmar and Clevers, 2016). Für die Herstellung von Organoiden benötigt man Gewebe- bzw. Zellproben, die Stammzellen enthalten. Stammzellen besitzen im Gegensatz zu anderen Zellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, außerdem sind sie in der Lage, in verschiedene Gewebe- und Zelltypen zu differenzieren. Diese Fähigkeiten sind entscheidende Grundlagen für die Kultur von Organoiden.

Organoide konnten mittlerweile aus verschiedensten Quellen gewonnen werden - ob nun aus multipotenten adulten Stammzellen oder aus pluripotenten Stammzellen, wie z. B. embryonalen Stammzellen oder induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) (Kretzschmar and Clevers, 2016). Auch wenn embryonale Stammzellen die größte Entwicklungs- und Differenzierungskapazität innehaben, ist deren Verwendung in Deutschland aufgrund ethischer, moralischer und technischer Gründe nach wie vor stark umstritten und deren Einsatz in der Forschung sehr begrenzt. Die Gewinnung und Verwendung adulter Stammzellen (z. B. aus Biopsaten) gestaltet sich einfacher und bietet ebenfalls die Möglichkeit, Organoide aus dem Ursprungsgewebe der Stammzellen zu gewinnen. Es können Gewebe- bzw. Zellproben sowohl von gesunden als auch von kranken Spendern verwendet werden (Drost and Clevers, 2018). Bisher war es möglich, Organoide aus multiplen murinen und humanen Epithelien zu gewinnen, darunter Colon (Sato et

al., 2011), Leber (Huch et al., 2013), Pankreas (Boj et al., 2015), Prostata (Chua et al., 2014), Magen (Bartfeld et al., 2015), Eileiter (Kessler et al., 2015), Geschmacksknospen (Ren et al., 2014), Speicheldrüsen (Maimets et al., 2016), Ösophagus (DeWard et al., 2014), Lunge (Rock et al., 2009) und Brust (Sachs et al., 2018) (Abbildung 11).

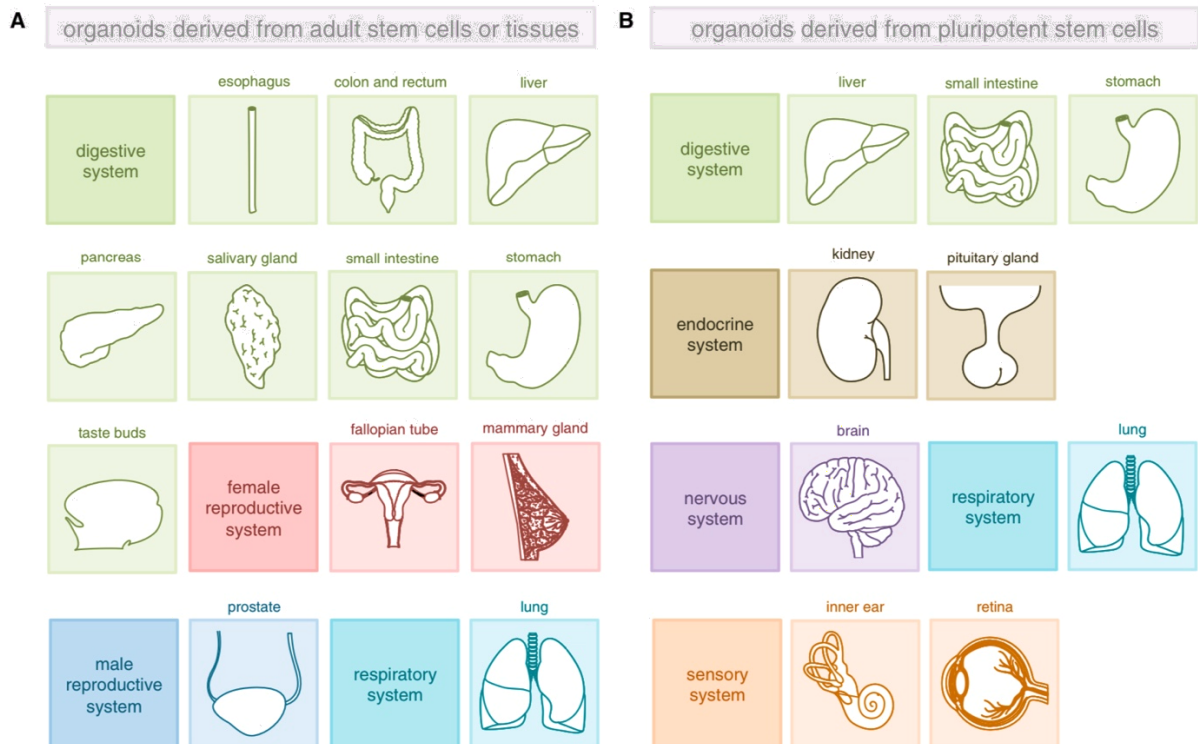


Abbildung 11 Organoidkulturen aus verschiedenen Organsystemen

Organoidkulturen konnten aus verschiedenen Organsystemen gewonnen werden

A - Organoide, die aus adulten Stammzellen oder Gewebe gewonnen wurden.

B - Organoide, die aus pluripotenten Stammzellen gewonnen wurden.

(entnommen aus: (Kretschmar and Clevers, 2016))

Bisher wurden die meisten Organoide aus epithelalem Ursprungsgewebe gewonnen (Drost and Clevers, 2018). Bestrebungen, Organoide aus nicht-epithelalem Ursprung zu generieren, schlagen sich in Studien bereits nieder (Hubert et al., 2016).

Manche dieser Organsysteme sind in Organoidkultur schon so gut etabliert, dass erste Biobanken angelegt wurden, darunter von Pankreas (Huang et al., 2015), Brust (Sachs et al., 2018) und Colon (Fujii et al., 2016). Diese Biobanken eröffnen neue Möglichkeiten, um Medikamentenscreenings mit hoher Testkapazität durchführen zu können.

Zur Kultur von Organoiden werden Stammzellen in einem bei Raumtemperatur polymerisierenden Gel (Matrigel, Basement Membrane Extract / BME) ausgesät. Dieses Gel hat

die Funktion, die extrazelluläre Matrix zu imitieren und den wachsenden Organoiden eine Expansion in alle Raumebenen zu ermöglichen. Matrigel ist laminin- und kollagenreich und wirkt so an der Aggregation und Polarisation der Stammzellen mit (Sachs and Clevers, 2014).

Das Matrigel (auch *Basement Membrane Extract* genannt) wird aus transplantierbaren Sarkomen in Mäusen gewonnen. Die undefinierte Zusammensetzung könnte jedoch etliche Versuchsergebnisse beeinflussen und Medikamententests behindern. Deshalb werden gerade auch synthetische Matrices entwickelt, um die murinen ECM-Vertreter zu ersetzen (Gjorevski et al., 2016).

Zusätzlich benötigen die Organoiden zur Ausreifung ein Medium mit einem organspezifischen Wachstumsfaktormix, sodass die physiologischen Bedingungen des Spenderorganismus der Stammzellen möglichst realistisch nachempfunden werden (Sato et al., 2011, Turco et al., 2017). Aus den Stammzellen differenzieren sich so die verschiedenen in einem Organ vorkommenden Zellen und bilden kleine dreidimensionale Modelle des Organs in der Petrischale nach.

I.5.2. Vor- und Nachteile der Organoidkultur

Organoiden können mit hoher Effizienz über einen längeren Zeitraum kultiviert, mehrfach passagiert, kryokonserviert und wieder aufgetaut werden und bleiben phänotypisch stabil (Drost and Clevers, 2018). Die Anzahl der DNA-Variationen sowie die Sequenz der DNA sind und bleiben in Organoiden zu ihrem Primärgewebe identisch, typische Mutationsmuster gleichen sich ebenfalls (Sachs et al., 2018). Es wurden bereits Organoiden erfolgreich über 20 Passagen lang kultiviert (Sachs et al., 2018), die dabei genetisch stabil blieben (Behjati et al., 2014).

Organoiden bieten eine Möglichkeit, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen sowie Stoffwechselwege unabhängig vom zellulären Mikroenvironment zu studieren. Genomische Analysen können durchgeführt werden, bei denen Immun- und Stromazellen normalerweise einen Störfaktor darstellen würden.

Aber die Kultur und der Einsatz von Organoiden weist auch Nachteile auf. Ihre Kultivierung ist deutlich zeitaufwändiger und ressourcenverbrauchender als herkömmliche zweidimensionale (2D)-Kulturen.

Eine Untersuchung von Tumor-Stroma-Interaktionen ist aufgrund des Fehlens von Stroma, Blutgefäßen und Immunzellen bislang kaum möglich (Sachs and Clevers, 2014)

und das fehlende Mikroenvironment kann Unterschiede im Expressionsmuster im Vergleich zum Originalgewebe verursachen. Aufgrund der mangelnden neuralen und venösen Versorgung besteht auch eine Wachstumslimitierung.

Für Tumor-Organoiden gilt, dass Organoiden aus weiter fortgeschrittenen Stadien schlechter wachsen, was das Risiko birgt, dass pathologische Organoiden in Mischkulturen von besser wachsenden Organoiden aus gesunden Zellen überwuchert werden. In diesem Fall müsste man selektive Kulturbedingungen schaffen oder im Voraus penibel auf die Qualität der Zellprobe achten (Drost and Clevers, 2018).

I.5.3. Neue Wege in der Krankheitsmodellierung

Bisher waren Zelllinien und Xenografte (Transplantate zwischen unterschiedlichen Spezies) Mittel der Wahl zur Modellierung von Krankheiten. 2D-Kulturen und Xenografte in Tiermodellen haben in den letzten Jahrzehnten viel dazu beigetragen, TumorbioLOGIEN zu verstehen (Sachs and Clevers, 2014). Nach heutigem Wissensstand sind Tumore individuell sehr verschieden, die Entstehungs- und Entwicklungsmechanismen sind komplex. Es braucht oft mehr als nur ein bis zwei Treibermutationen, um aus einer gesunden Zelle eine bösartig wuchernde Krebszelle zu machen (Markowitz and Bertagnoli, 2009). Diese herkömmlichen Modelle können deshalb den Primärtumor nur bedingt abbilden (Kamb, 2005). In 2D-Kulturen können nur wenige Zellklone zu beständigen Linien herangezogen werden, diese können dann aber durch wiederholte Passagen substantielle genetische Veränderungen durchlaufen, außerdem fehlt es an physiologischer Komplexität (Drost and Clevers, 2018). Tiermodelle können z. B. nicht die histologische und genetische Variabilität darstellen, die menschliche Tumore innehaben (Torre et al., 2015).

3D-Modelle wie die Sphäroide konnten in der Vergangenheit schon zeigen, dass sie im Vergleich zu zweidimensionalen Zelllinien Vorteile in der Imitation von Tumoren mitbrachten. Sphäroide sind als die Vorgänger von Organoiden Verbände von Tumorzellen, die sich in einem gewöhnlichen Kulturmedium in nicht-adhäsiven Kulturplatten kultivieren lassen. In diesem Umfeld bilden Tumorzellen dreidimensionale Aggregate. Bei genügend Sauerstoff- und Nährstoffvorkommen beginnen die außenliegenden Lagen der Tumorzellen zu proliferieren, während die inneren aufgrund Mangelerscheinungen und der damit zusammenhängenden Akkumulation von Metaboliten in Nekrose übergehen können. Diese Tatsache spiegelt das Wachstumsverhalten von Tumoren *in vivo* deutlich

besser wider und erlaubt tiefere Untersuchungen der Tumorbiologie, Stammzellforschung und Immunonkologie (Kloker et al., 2018).

Organoide können als 3D-Kultur eine wichtige Brücke in Krankheitsmodellen zwischen Zelllinien und Xenograften schlagen und den Bereich der 3D-Kulturen um eine weitere vielversprechende Zellkulturtechnik erweitern. Nicht nur, dass sie mit großer Effizienz aus Gewebeproben von Patienten gewonnen werden können, sie sind auch ähnlich wie Xenografte näher an der Physiologie *in vivo* und lassen auch groß angelegte Medikamententestungen zu, die in Tiermodellen ethisch nicht vertretbar wären (Sachs and Clevers, 2014).

Direkte Vergleiche von Tumor-Organoiden mit ihren Primärtumoren, um die Übertragbarkeit von Ergebnissen vom Labor in die Klinik zu testen, finden laufend statt. So ist für viele Gewebe, aus denen Organoiden gewonnen wurden, bereits bekannt, dass sich Organoid und Primärtumor genetisch wie phänotypisch weitestgehend gleichen (Sachs et al., 2018, Drost and Clevers, 2018). Die Histopathologie der Organoiden blieb dabei sogar nach der Xenotransplantation in immundefiziente Mäuse erhalten (Fujii et al., 2016). Aber im Unterschied zu Zelllinien und Xenograften können Organoiden auch effizient aus frühen Stadien von Tumoren gewonnen werden - diese wachsen zumeist sogar besser als deren weiter fortgeschrittene Korrelate (Drost and Clevers, 2018). Sie sind demnach in der Lage, (Tumor-)Erkrankungen in ihrer Heterogenität abzubilden und öffnen neue Wege in der Untersuchung von biochemischen Prozessen und ihren Pathologien. Des Weiteren können genetische Modifikationen vorgenommen werden, die eine Krankheitsmodellierung zulassen (Drost and Clevers, 2018).

Untersuchungen im Hinblick auf die Proteinausstattung von Organoiden müssen noch vorgenommen werden um sicherzustellen, dass sich das Proteom auch bei Expansion der Organoiden *in vitro* erhält (Drost and Clevers, 2018). Dies ist im Hinblick auf die Übertragbarkeit von Forschungsergebnissen auf eine *in vivo*-Situation eine wichtige Voraussetzung.

Ein weiterer Vorteil ist, dass Kokulturen zwischen Organoiden verschiedener Herkunft und mit Zellen anderen Ursprungs (z. B. hämatopoetische Zellen) oder mit Pathogenen möglich sind. So können Wechselwirkungen verschiedener Interaktionspartner miteinander untersucht werden (Drost and Clevers, 2018). Einer Arbeitsgruppe um Michael Workman ist es 2017 bereits gelungen, intestinale Organoiden mit einem funktionalen Nervensystem zu generieren (Workman et al., 2017).

I.5.4. Aus der Petrischale ans Krankenbett

Eine der ersten Studien um Vlachogiannis, die die Übertragbarkeit der Wirksamkeit von Medikamenten in klinischen Studien von Organoiden auf Patienten untersuchte, stellte einen positiven prädiktiven Wert von 88 % und einen negativen prädiktiven Wert von 100 % im Hinblick auf die Wirksamkeit fest (Vlachogiannis et al., 2018). Auch in weiteren Studien wurde die gute Übereinstimmung der Sensitivität auf Medikamente zwischen Organoiden und Patienten bestätigt (Drost and Clevers, 2018).

Diese Ergebnisse wecken vielversprechende Hoffnungen auf Fortschritte im Bereich der individualisierten Medizin. Für das Krankheitsbild der Zystischen Fibrose, bei der es durch Mutationen im CFTR-Gen (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), das für einen Chlorid-Kanal verschiedener Drüsenzellen codiert, zu einer Viskositätserhöhung von Sekreten kommt, werden patientenspezifische Organoide bereits im klinischen Kontext zur Testung von Medikamenten verwendet (Dekkers et al., 2016).

Abgesehen von der Tatsache, dass Organoide aus pathologischem Gewebe für die Entwicklung neuer Medikamente und für die Überprüfung der Wirksamkeit von Medikamenten verwendet werden können, können Organoide aus gesundem Gewebe für Zytotoxizitätsassays hergenommen werden. So kann der Effekt von Substanzen auf gesunde Zellen parallel untersucht werden (Abbildung 12).

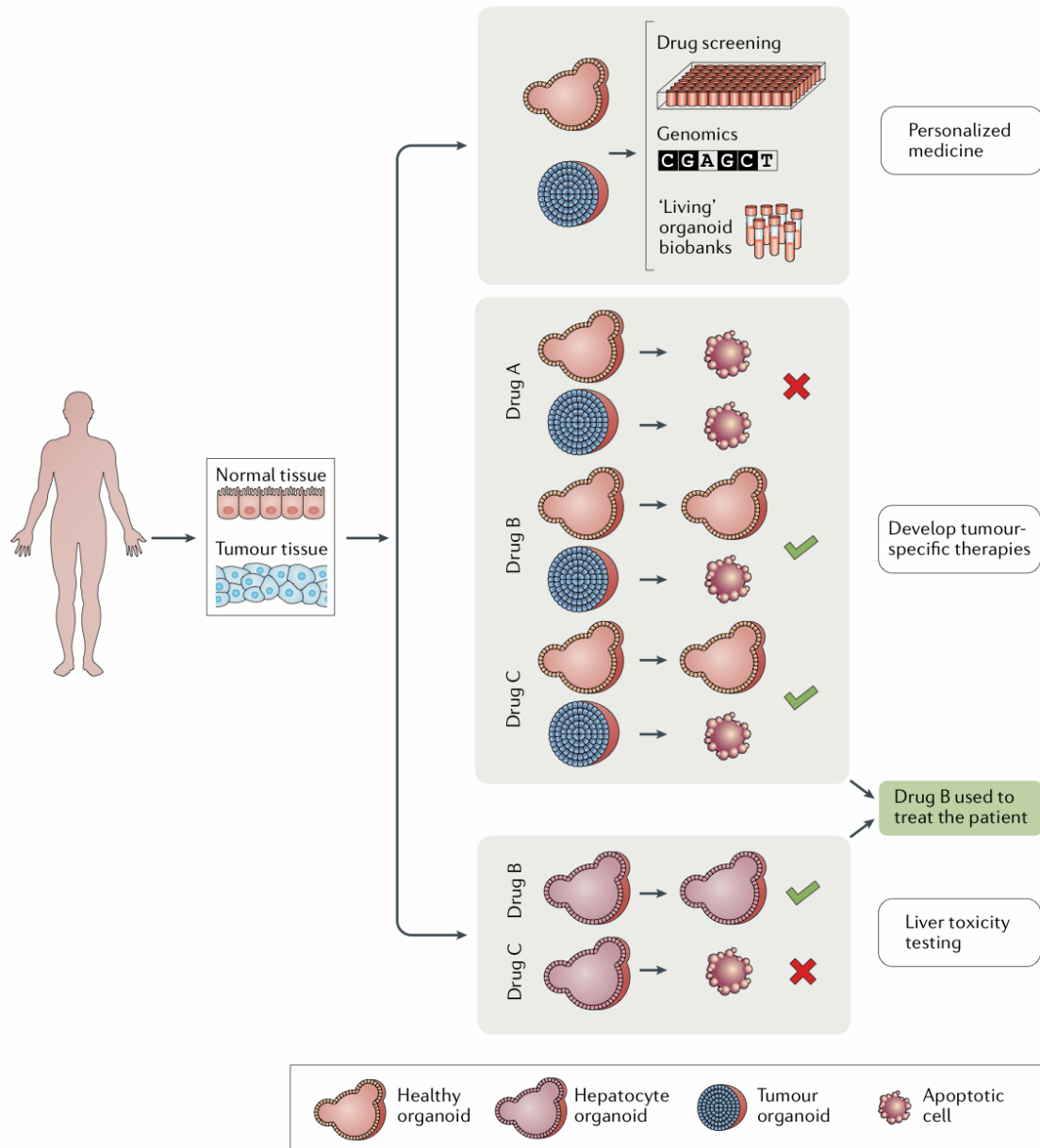


Abbildung 12 Organoide für die personalisierte Medizin und Medikamentenentwicklung

Organoide bieten ein breites Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten. Sie können sowohl aus gesundem als auch aus Tumorgewebe gewonnen werden und somit zu vergleichenden Studien hinsichtlich Medikamentenentwicklung herangezogen werden. Es können Toxizitätsassays auf gesundes Gewebe erstellt, sowie patientenspezifische Wirkung einzelner Medikamente auf erkranktes Gewebe getestet werden. Durch das Anlegen von Biobanken ist ein breit angelegtes Medikamentenscreening möglich.

(entnommen aus: (Drost and Clevers, 2018))

I.5.5. Organoide in der Brustkrebsforschung

Auch für Brustkrebs und gesundes Brustgewebe konnten bereits Organoide entwickelt werden (Sachs et al., 2018). Brustkrebs-Organoide spiegeln in ihrer Morphologie bzw. Histologie den Primärtumor wider. Es können in den Tumor-Organoiden i. d. R. dieselben histologischen Atypien gefunden werden, die im Primärtumor auch vorkommen (Fujii et al., 2016, Sachs et al., 2018), wie Kernatypien, gesteigerte Mitoseraten und Apoptose-Figuren. Es konnte auch beobachtet werden, dass Organoide aus duktalem Brusttumor i. d. R. solide wachsen, Organoide aus lobulären Brusttumoren eher diskohäsiv (Drost and Clevers, 2018). Durch ihre starke Ähnlichkeit zum Originalgewebe können Organoide ein Werkzeug zum besseren Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen lobulärer wie duktalem Histologien sein.

Neben der Morphologie und der Histopathologie stimmen auch der Hormonrezeptor- sowie der HER2-Status mit dem Originaltumor weitestgehend überein (Drost and Clevers, 2018). Der ER-/PR-Rezeptorstatus ist in Organoiden in 75 % bei positiven, in über 90 % bei negativen Tumoren erhalten; bei HER2-positiven Tumoren in 80 %, bei HER2-negativen in über 90 % der Fälle (Sachs et al., 2018).

Die Entwicklung der Organoid-Kulturen liefert nun neue Chancen für physiologische Krebsmodelle und kann somit die Aufschlüsselung von Tumorentstehung, -entwicklung und -interaktion weiter vorantreiben.

I.6. Ziel der Arbeit

Viele Frauen werden im Laufe ihres Lebens mit der Diagnose Mamma-Ca konfrontiert, und trotz bereits weit entwickelter Therapien stirbt noch eine große Anzahl dieser Frauen an ihrer Tumorerkrankung. Es bedarf deshalb weiterführender Forschung der Pathomechanismen von Brusttumoren sowie neuer Ansätze für Therapien. Organoide als „Mini-Modelle“ von Mamma-Ca können einen neuen Baustein für die Weiterentwicklung von Therapien darstellen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Mamma-Ca-Organoide im Labor als Organoidlinien zu etablieren, ihren Aufbau aufzuschlüsseln und die Expression von Matrixkomponenten, ihrer Rezeptoren und von Matrix-Proteasen zu analysieren.

Für die Bearbeitung der Aufgabenstellungen sollten Organoide aus Brustkrebsgewebe generiert werden, wobei sich die Kulturbedingungen v. a. an Protokollen der Arbeitsgruppe um Prof. Hans Clevers (Hubrecht Institute, Utrecht, Niederlande) orientieren sollten. Die zellulären Gewebeproben stammten von Patientinnen und Patienten der Universitäts-Frauenklinik Tübingen. Das erste Ziel (und Voraussetzung für die weitere Arbeit) war die erfolgreiche Etablierung von Organoidlinien (> 5 Passagen). Kryokonservierung und Fixierung der Brustkrebs-Organoide waren Teilaspekte der Arbeit, die bei den Organoidkulturen überprüft oder neu definiert werden mussten. Im nächsten Schritt wurde die Expression der für Parenchyme essenziellen Bauteile wie Laminine und Integrine, Marker für eine polare Differenzierung in basale und luminalen Zellen sowie Vertreter der Matrix-Metalloproteasen und TIMPs qualitativ mittels Immunfluoreszenzfärbungen und RT-PCR-Analyse (*reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction*) untersucht. Der biologische Aufbau der Mamma-Ca-Organoide wurde in 2D-Techniken wie in 3D-Techniken untersucht und dabei herkömmliche Auflicht-Mikroskopie sowie neuere Multiphoton-/LSM-Mikroskopie angewandt.

Die Immunfluoreszenzfärbung diente v. a. einer morphologischen Beurteilung der Organoide, an der abzulesen war, inwiefern sich der zelluläre Aufbau von Brustkrebs-Organoiden vom Originalgewebe ableiten ließ. Durch die Verwendung proteotypischer Marker für die Immunfluoreszenzfärbung konnte ein Vergleich zwischen den Organoidlinien angestellt und die Reproduzierbarkeit des Aufbaus direkt gegenübergestellt werden. Dem gegenüber sollte die RT-PCR-Analyse die Expression in einem detaillierteren Bild darstellen.

Die grundlegende Untersuchung von Mamma-Ca-Organoiden hinsichtlich ihrer Repräsentativität für die Primärtumore ist das Fundament für weitere Schritte, die zur Entwicklung neuer Therapien führen können.

II. Material und Methoden

II.1. Material

II.1.1. Patientenproben und Zelllinien

Tabelle 5 Auflistung der verwendeten Patientenproben und Zelllinien

w - weiblich

m - männlich

G - Grading

Alle Zelllinien wurden freundlicherweise von der AG Koch (Dr. André Koch) der Universitäts-Frauenklinik Tübingen zur Verfügung gestellt.

Zelllinie	Klinische Klassifikation	Geschlecht	Zustand zum Zeitpunkt der Entgegennahme
BC13	NST links, zentral, multizentrisch, G3, pT4b, pN1a, cM1, ER/PR ⁺	m	kultiviert als Organoide
BC43	invasiv-lobulär rechts, bifokal mit angrenzendem CiS, G2, pT1c, pN0, cM0, triple ⁺	w	Einzelzellsuspension, eingefroren
BC58	NST rechts, unifokal, G2, pT1c, pN0, cM0, ER/PR ⁺	w	Einzelzellsuspension, eingefroren
BC60	NST rechts, multizentrisch mit begleitendem CiS, G3, pT1c, pN1, cM0, ER/PR ⁺	w	Einzelzellsuspension, eingefroren
BC89	NST beidseits, multizentrisch rechts, unifokal links, G1 - G2 mit assoziiertem CiS, pT1c, pN1a, cM0, ER/PR ⁺	w	kultiviert als Organoide
BC91	NST rechts, bifokal, G2 mit assoziiertem CiS, pT1a, pN0, cM0, ER/PR ⁺	w	kultiviert als Organoide
BC97	invasiv-lobulär, trifokal, G2 - G3 mit assoziiertem CiS, pT1c, pN0, cM0, ER/PR ⁺	w	Einzelzellsuspension, eingefroren

Zelllinie	Klinische Klassifikation	Geschlecht	Zustand zum Zeitpunkt der Entgegennahme
BC102	NST, unifokal, G2 mit beginnender Exulzeration der Haut, assoziiertes DCIS, pT4b, pN2a, cM0, ER/PR ⁺	m	Paraffinschnitt
BC109	NST, unifokal, G3 mit assoziiertem DCIS, ausgedehnte Lymphangi- osis carcionamtosa, pT2, pN1a, cM0, triple ⁺	w	Paraffinschnitt
BC117	invasiv-lobuläres Karzinom, multi- fokal, G2, assoziiertes lobuläres CiS, pT1b, pN0, cM0, ER/PR ⁺	w	Paraffinschnitt
BC125	NST, unifokal, G3, assoziiertes DCIS, pT2, pN0, cM0, triple ⁻	w	Paraffinschnitt
BC173	NST, unifokal, G2, assoziiertes DCIS, pT2, pN1a, cM0, ER/PR ⁺	w	Paraffinschnitt
K7	gesundes Kontrollgewebe einer <i>nipple spa- ring mastectomy</i> (NSM)	w	Einzelzellsuspension, eingefroren
Zelllinie	Charakteristika	Spezies	Zustand zum Zeitpunkt der Entgegennahme
L-WRN	Genetisch modifizierte Fibroblas- ten zur Produktion von Wnt-3A, R- Spondin3 und Noggin	Maus	Einzelzellsuspension, eingefroren (Quelle: ATCC, Wesel, Deutschland)

II.1.2. Reagenzien

Tabelle 6 Auflistung der verwendeten Reagenzien

	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
A83-01	Tocris Bioscience (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)
Accutase	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Hersteller

Advanced DMEM/F12	Thermo Fisher Scientific
B27 supplement	Thermo Fisher Scientific
BME/Matrigel Type 2 (Cultrex)	R&D Systems (Minneapolis, USA)
DAPI	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
DEPC-Treated Water	Thermo Fisher Scientific
Dispase (ACF)	Stemcell Technologies (Köln, Deutschland)
DNA Ladder Marker	PEQ
dNTP Mix	Thermo Fisher Scientific
DPBS	Thermo Fisher Scientific
DTT	Thermo Fisher Scientific
E.coli RNase H	Thermo Fisher Scientific
Epidermal Growth Factor (EGF)	PeptoTech (Hamburg, Deutschland)
Ethanol	UKT Apotheke
Fetal Bovine Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific
Fibroblast Growth Factor 10 (FGF10)	PeptoTech (Hamburg, Deutschland)
Fibroblast Growth Factor 7 (FGF7)	PeptoTech (Hamburg, Deutschland)

Hersteller

Fluorescence Mounting Medium	Agilent Dako (Waldbronn, Deutschland)
GlutaMax 100X	Thermo Fisher Scientific
HEPES Sodium Salt Solution 14	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Histogel	Thermo Fisher Scientific
L-WRN Conditioned Medium	homemade
Magnesiumchlorid (MgCl₂)	Thermo Fisher Scientific
N-Acetyl-L-cystein	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Neuregulin 1	PeptoTech (Hamburg, Deutschland)
Nicotinamid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Noggin	PeptoTech (Hamburg, Deutschland)
Oligo (dT) 20	Thermo Fisher Scientific
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
PBS	homemade
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, 10 000 U/l
Primocin	InvivoGen (Toulouse, Frankreich)
R-Spondin Conditioned Medium	homemade

Hersteller

RDD Puffer (DNA Digest Buffer)	Qiagen (Hilden, Deutschland)
REDTaq ReadyMix™ PCR (Reaction Mix)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
RLT-Puffer (RNeasy Lysis Buffer)	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RNase Away™ Reagent	Thermo Fisher Scientific
RNase OUT™	Thermo Fisher Scientific
RNase-Free Water	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RPI Wash Buffer	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RPMI Medium	Thermo Fisher Scientific
RT Buffer	Thermo Fisher Scientific
RWE Wash Buffer	Qiagen (Hilden, Deutschland)
SB202190	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
SuperScript® III RT	Thermo Fisher Scientific
TBE-Puffer	homemade
Tissue Freezing Medium	Leica Biosystems (Wetzlar, Deutschland)
TrypLE Express Enzyme	Thermo Fisher Scientific
Trypan Blue Solution 0,4 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Hersteller

Water PCR Reagent	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Y-27632 Dihydrochlorid	Hölzel Diagnostika (Köln, Deutschland)

II.1.3. Antikörper

Tabelle 7 Auflistung der verwendeten Antikörper

Zielstruktur, Konjugat	Tier	Verwendete Verdünnung	Abkürzung	Hersteller/erhalten von
Kaninchen-AK, mit Alexa488 konjugiert	Ziege	1:200	gt-anti-rb 488	Jackson Immuno Research Laboratory
Maus-AK, mit Cy3 konjugiert	Ziege	1:200	gt-anti-ms Cy3	Jackson Immuno Research Laboratory
Ratten-AK, mit Alexa488 konjugiert	Ziege	1:200	gt-anti-rat 488	Jackson Immuno Research Laboratory
Maus-AK, mit Alexa594 konjugiert	Ziege	1:200	gt-anti-ms 594	Invitrogen
Cytokeratin 5	Kaninchen	1:100	rb-anti-CK5	Biologend
Cytokeratin 8	Maus	1:100	ms-anti-CK8	Thermo Fisher Scientific
Cytokeratin 8	Kaninchen	1:100	rb-anti-CK8	Thermo Fisher Scientific
E-Cadherin	Maus	1:200	ms-anti-hu ECad	Biermann
EpCAM	Maus	1:100	ms-anti-hu EpCAM	Cell Signaling
HECD-1	Maus	1:200	ms-anti-hu HECD1	Biermann
Integrin β1	Maus	1:100 - 1:800	ms-anti-hu Int β 1	R&D Systems
Integrin α3	Maus	1:200	ms-anti-hu Int α 3	Thermo Fisher Scientific
Integrin α7	Maus	1:200	ms-anti-hu Int α 7	Abcam
Integrin α7	Kaninchen	1:200	rb-anti-hu Int α 7	Biomol

Zielstruktur, Konjugat	Tier	Verwendete Verdünnung	Abkürzung	Hersteller/erhalten von
Laminin α3	Maus	1:200	ms-anti-hu Lam α 3	R&D Systems
Laminin α4	Maus	1:200 - 1:800	ms-anti-hu Lam α 4	Dr. Sulev Ingerpuu (IMCB, University of Tartu, Estland)
Laminin α5	Maus	1:200 - 1:800	ms-anti-hu Lam α 5	Dr. Sulev Ingerpuu (IMCB, University of Tartu, Estland)
MMP-14	Kaninchen	1:100	rb-anti-hu MMP14	Calbiochem
MMP-14	Maus	1:100	ms-anti-hu MMP14	Oncogene Research Products
MMP-15	Maus	1:100	ms-anti-hu MMP15	R&D Systems
MMP-16	Kaninchen	1:100	rb-anti-hu MMP16	Abcam
MMP-17	Kaninchen	1:100	rb-anti-hu MMP17	Abcam
MMP-24	Kaninchen	1:100	rb-anti-hu MMP24	Abcam
MMP-24	Ratte	1:100	rat-anti-hu MMP24	R&D Systems
MMP-25	Kaninchen	1:200	rb-anti-hu MMP25	Abcam
MMP-8	Maus	1:100	ms-anti-hu MMP8	R&D Systems
Neogenin	Kaninchen	1:100	rb-anti-hu Neogenin	Biozol
Netrin-1	Kaninchen	1:100	rb-anti-Netrin1	Biozol
panCK	Maus	1:200	ms-anti-hu panCK	Sigma
Perlecan	Kaninchen	1:400	rb-anti-perlecan	AG Klein
TIMP-1	Maus	1:100	ms-anti-hu TIMP1	Abcam
TIMP-2	Maus	1:100	ms-anti-hu TIMP2	Abcam
TIMP-3	Maus	1:100	ms-anti-hu TIMP3	R&D Systems

II.1.4. Primer

Tabelle 8 Auflistung der verwendeten Primer

Hersteller: Eurofins Genomics

Gene	Primersequenz 5' → 3'	Nucleotid- Position	Basen- paare	NCBI accession number
MMP14	For: gagaggaaggatggcaaattc	1402-1422	466	NM_004995.3
	Rev: caatgatgatcacctccgtct	1867-1847		
MMP-15	For: gacgcagcctacacctactct	2537-2558	424	NM_002428.2
	Rev: gcttgcaagcaggacac	2960-2940		
MMP-16	For: ttactctggcgggctgcctcctagtat	1428-1457	652	NM_005941.4
	Rev: acagtacagtatgtggcgggtgtccttt	2079-2050		
MMP-17	For: tggtagtacggccgatgatggagtgtgca	911-882	423	NM_016155.4
	Rev: caccaagtgaacaagaggaacct	489-512		
MMP-24	For: gggcagaactggtaaagtcc	244-264	394	NM_006690.3
	Rev: tgatctcatggtatggcacct	637-617		
MMP-25	For: tcaaagtcagcagaggttcg	422-442	465	NM_022468.4
	Rev: aagtcaggctcctcatcgt	886-866		
TIMP-1	For: ccttctgaattccgacct	293-311	203	NM_003254.2
	Rev: gttgtggacctgtggaagta	495-475		
TIMP-2	For: cacctctgacttcatcgt	674-694	228	NM_003255.4
	Rev: gagccgcacttctctgatg	901-881		
TIMP-3	For: ctgacaggtcgcgtctatga	1496-1515	240	NM_000362.4
	Rev: ggcgtagtgttgactggt	1735-1716		
TIMP-4	For: cttggtgcagaggaaagtct	934-954	253	NM_003256.3
	Rev: ctaggctgaacgatgtcaac	1186-1166		
Laminin α1	For: tgcagagccggtttactgg	3733-3751	357	NM_005559.3
	Rev: tgctgtaatcctgaccatcgc	4089-4068		

Gene	Primersequenz 5' → 3'	Nucleotid- Position	Basen- paare	NCBI accession number
Laminin α2	For: cagctactactggagcgcg	1845-1863	368	NM_000426.3
	Rev: cagagctcaacctgaagatgg	2212-2192		
Laminin α3	For: agctcactggtcagcacatg	4917-4936	253	NM_198129.2
	Rev: cctgtgtcagaggcttctc	5169-5150		
Laminin α4	For: tgcggactctctgacaacac	2009-2028	358	NM_001105206. 2
	Rev: actcaccgcatcataaattcg	2366-2346		
Laminin α5	For: gacagtgccctgtctactacc	9539-9560	562	NM_005560.4
	Rev: ccccaaactggtaggagtctc	10100-10080		
Laminin β1	For: tgcttctgctatggctatgc	1146-1165	253	NM_002291.2
	Rev: ccgtggccaggtaaacag	1398-1381		
Laminin β2	For: tggactggctcaggcttc	2079-2096	337	NM_002292.3
	Rev: tctcaggctgggcacttc	2415-2398		
Laminin β3	For: ttggtagactcccgaatgc	1939-1958	261	NM_000228.2
	Rev: aagactcctccaggctctctcg	2199-2179		
Laminin γ1	For: catctctcgagtggctcctctg	1864-1884	283	NM_002293.3
	Rev: gcttcatggagcctgaagac	2146-2127		
Laminin γ2	For: acaggctcatcactcagatgc	2473-2493	579	NM_005562.2
	Rev: cattctgtaagagctgctgtgc	3051-3030		
Laminin γ3	For: cagtgcgatgacacaggc	1277-1294	557	AF041835
	Rev: ccttccagcctcagctgtac	1833-1814		

II.1.5. Equipment und Verbrauchsmittel

Tabelle 9 Auflistung des verwendeten Equipments und der Verbrauchsmittel

24 well Platte	Cellstar 24 <i>Well Cell Culture</i> Plate (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
2D-Zellkulturflasche	Zellkulturflasche 75 mit Filter-Schraubkappe (TPP, Trasadingen, Schweiz)
48 well Platte	48 <i>Well Cell Culture</i> Cluster 3548 (Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland)
Brutschrank	HERAcell 240i CO ₂ Inkubator (Thermo Fisher Scientific)
Eppendorf-Schüttler	Eppendorf Thermoshaker comfort 1.5 ml (Eppendorf, Wessling-Benzdorf, Deutschland)
Eppendorfgefäße	1.5 ml (Eppendorf, Wessling-Benzdorf, Deutschland)
Eppendorfgefäße	2 ml (Eppendorf, Wessling-Benzdorf, Deutschland)
Falcons	15 ml (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
Falcons	50 ml (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland)
Gefrierschrank Labor	Premium NoFrost - 20°C (Liebherr, Deutschland)
Gelelektrophoresekammer	EC Midicell Primo EC330 Electrophoretic Gel System
Immunfluoreszenzmikroskop	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Immunopen (PAP-Pen)	Fujifilm Wako, Osaka, Japan
Kühlschrank Zellkultur	4 °C (Liebherr, Deutschland)
LSM 880 mit Airyscan	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Menzel Deckgläser	24 x 50 mm (neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland)
Mikroskop	Axiovert 135 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
Mikrotom	Leica
NanoPhotometer® NP80	IMPLEN (München, Deutschland)
PCR	PTC-100™ <i>Programmable Thermal Controller</i>
Pipette 0,5-10 µl	Eppendorf Research 0.5 - 10 µl (Eppendorf, Wessling-Benzdorf, Deutschland)
Pipette 10-100 µl	Eppendorf Research 10 - 100 µl (Eppendorf, Wessling-Benzdorf, Deutschland)

Pipette 100-1000 µl	Eppendorf Research 100 - 1000 µl (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Pipettierhelfer (Pipetboy)	Pipetus (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt Deutschland)
Qiashredder (lilafarbene Säule)	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RNeasy Mini Kit (rosafarbene RNeasy Säule)	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Schüttler Labor	Thermoshaker TS-MC 2.0 ml (Schuttron, Quedlingburg Quarmbeck)
Stabpipette 10 ml	non-pyrogenic, 10 ml (Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland)
Stabpipette 25 ml	non-pyrogenic, 25 ml (Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland)
Stabpipette 5 ml	non-pyrogenic, 5 ml (Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland)
Zellkulturbank 1	LaminAir Serien-Nr.: HBB2448
Zellkulturbank 2	HERAsafe (Heraeus, Hanau, Deutschland)
Zellsieb	Millex HA Filter Unit, MF Milipore MCE Membrane, 0.45 µm (Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland)
Zentrifuge Labor	Eppendorf Centifuge 5810R (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Zentrifuge Zellkultur	Eppendorf Centifuge 5810R (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
Zentrifuge Zellkultur	biofuge pico (Heraeus, Hanau, Deutschland)
µ-Slide Angiogenesis Glass Bottom 15 wells	Ibidi (Gräfelfing, Deutschland)

II.2. Methoden

II.2.1. Zellkultur

Alle verwendeten Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert, die Organoide sowohl in 24 well, als auch in 48 well Platten. Der Übersichtlichkeit halber wird im Folgenden die Organoidkultur in 48 well Platten dargestellt; falls Unterschiede in der Kultur mit 24 well Platten bestanden, sind diese in Klammern dahinter beschrieben. 2D-Kulturen wurden

in 75 cm² Zellkulturflaschen durchgeführt. Näheres zu den Zellen und ihren Medien ist in den folgenden Abschnitten dargelegt. Alle verwendeten Medien und Reagenzien wurden vor Gebrauch unter der Zellkulturbank bei Raumtemperatur erwärmt.

Für die Verwendung der humanen Brustgewebe lag ein gültiges Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen vor [AZ.: 150/2018BO2 (Kultivierung und Charakterisierung von Zellen und Organoiden aus gesundem und malignem Gewebe)].

II.2.1.1. Kultur von L-WRN-Zellen

L-WRN-Zellen sind mit einem Plasmid modifizierte Mausfibroblasten, die die Wachstumsfaktoren Wnt3a, Noggin und R-Spondin-3 produzieren können. Sie wurden verwendet, um für das *Breast Cancer* (BC) Medium konditioniertes Medium mit den benötigten Faktoren Noggin und R-Spondin herzustellen. Um nur die mit dem Plasmid versehenen Zellen zu expandieren, wurden die Zellen zunächst acht Tage in einem speziellen Zellselektionsmedium kultiviert (L-WRN *cell selection medium*, Tabelle 10).

Tabelle 10 L-WRN „*cell selection medium*“ Zusammensetzung

Komponente	
DMEM	
FBS	10 % vol/vol
Pen/Strep	1 % vol/vol
G418-BC	60 µg/ml
Hygromycin B	50 µg/ml

Die mit G418 und Hygromycin B selektierten L-WRN-Zellen wurden auf zwei 75 cm²-Kulturflaschen aufgeteilt. Um die Zellen aufzuteilen, wurde das Medium aus der 2D-Zellkulturflasche abgenommen und 1 ml Accutase zugegeben. Die Zellkulturflasche wurde vorsichtig geschwenkt, um das Enzym gleichmäßig zu verteilen. Im Brutschrank wurden die Zellen mit Accutase 3 - 5 min inkubiert, bis sie sich, sichtlich weiße Schlieren bildend, von dem Flaschenboden ablösten. Sobald dies der Fall war, wurden 6.5 ml FBS-haltiges

Medium in die Zellkulturflasche zugegeben, um die Enzymaktivität abzustoppen. Mit einer Stabpipette wurden die Zellen durch wiederholtes Auf- und Abziehen des Mediums sorgfältig vom Flaschenboden abgewaschen und schlussendlich in ein 15 ml Falcon überführt. Das Falcon wurde bei 150 x g 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet konnte in 10 ml Medium resuspendiert werden und bei einem Split von 1:2 mit je 5 ml auf zwei neue 75 cm²-Zellkulturflaschen aufgeteilt werden. Als Medium wurde erneut das L-WRN *cell selection medium* verwendet.

II.2.1.2. Herstellung von konditioniertem Medium

Zu den frisch ausgesäten Zellen wurden weitere 5 ml des L-WRN *cell selection medium* gegeben, um auf ein Gesamtvolumen in den Flaschen von 10 ml zu kommen. So wurden sie bei 37 °C im Brutschrank expandiert.

Zur Herstellung des konditionierten Mediums wurde das L-WRN *cell selection medium* durch das L-WRN *cell conditioning medium* ersetzt.

Das ursprünglich vorgesehene Medium zur Konditionierung enthält 10 % FBS. Da durch die Zugabe von FBS keine genaue Definition der einzelnen Komponenten mehr möglich ist, wurden auch Medien ohne FBS-Zusatz hergestellt und auf ihre Funktionalität hin getestet. Die Zusammensetzung der Medien ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11 Komponenten des Zellkulturmediums („cell conditioning medium“) für L-WRN-Zellen zur Herstellung von konditioniertem Medium

Komponente	ohne FBS	mit FBS
Advanced DMEM/F12	100 ml	90 ml
FBS	-	10 ml
Pen/Strep	1 ml	1 ml
GlutaMax	1 ml	1 ml
HEPES	1 ml	1 ml
gesamt	103 ml	103 ml

Das L-WRN *cell selection medium* wurde von den Zellen abgenommen und durch 10 ml L-WRN *cell conditioning medium* pro Flasche ersetzt. Von nun an wurde jeden Tag ein Medienwechsel durchgeführt, wobei das L-WRN *cell conditioning medium* von den Zellen abgenommen und in ein 15 ml Falcon überführt wurde. Auf die Zellen wurden 10 ml

frisches L-WRN *cell conditioning medium* gegeben und für weitere 24 h bei 37 °C inkubiert.

Das Falcon mit dem abgenommenen Medium wurde bei 2000 x g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in eine sterile 200 ml Zellkulturflasche überführt.

Dieser Medienwechsel wurde für 12 aufeinander folgende Tage wiederholt. Die gesammelten konditionierten Medien wurden vereint. Am zwölften Tag wurden die Zellkulturflaschen verworfen. Vor Gebrauch des L-WRN-konditionierten Mediums wurde das Medium durch einen 0.45 µm Zellfilter steril filtriert.

Bevor das BC Medium für die Anwendung mit dem neu konditionierten Medium hergestellt wurde, wurde der Erfolg der Konditionierung an einer gut wachsenden Organoid-Zelllinie (BC13) getestet. Eine Platte der Linie BC13 wurde aufgeteilt und einerseits mit herkömmlichem BC Medium kultiviert, während andererseits mit BC Medium behandelt wurde, das das neu hergestellte L-WRN konditionierte Medium enthielt.

II.2.1.3. Organoid-Zelllinien

Es wurden verschiedene Organoid-Zelllinien verwendet. Die Mamma-Ca-Zellen wurden entweder als eingefrorene Zellsuspension direkt nach der Vereinzelung der Zellen des Tumorgewebes, oder als Organoidkultur aus der Frauenklinik AG Dr. Koch übernommen (s. Tabelle 5). Alle Zellen wurden entsprechend der Technik der Organoidkultivierung in 48 *well* Platten bei 37 °C und 5 % CO₂-haltiger Atmosphäre kultiviert. Das nötige Medium wurde nach dem im folgenden Abschnitt dargestellten Rezept hergestellt; die einzelnen Komponenten sind in Tabelle 12 im folgenden Abschnitt aufgeführt. Nähere Informationen zu den einzelnen Organoid-Zelllinien sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

II.2.1.4. Herstellung des „Breast Cancer“ (BC) Mediums

Das BC Medium wurde einerseits mit konditioniertem R-Spondin-haltigem Medium hergestellt, andererseits auch mit L-WRN-konditioniertem Medium. R-Spondin lag als konditioniertes Medium in einem größeren Vorrat in der AG Klein vor.

Die Zusammensetzung des Mediums mit R-Spondin ist in Tabelle 12 bzw. mit L-WRN konditioniertem Medium in Tabelle 13 dargestellt. Die Komponenten des BC Mediums orientierten sich an Arbeiten der Gruppe um Prof. Hans Clevers (Sachs et al., 2018, Drost and Clevers, 2018).

Die einzelnen Komponenten wurden in einem 50 ml Falcon pipettiert und im Anschluss durch ein 0.45 µm Zellsieb in ein neues 50 ml Falcon steril filtriert. Das Medium wurde bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch bei Raumtemperatur erwärmt.

Tabelle 12 Komponenten des „Breast Cancer“ (BC) Mediums mit R-Spondin-1-„conditioned medium“ für die Organoidkultur

Komponente	Stammlösung	Finale Konzentration	Volumen
Advanced DMEM/F12		1x	42 ml
R-Spondin-1-conditioned medium		10 %	5 ml
Neuregulin 1	5 µM	5 nM	50 µl
FGF7	50 µg/ml	5 ng/ml	5 µl
FGF10	100 µg/ml	20 ng/ml	10 µl
EGF	500 µg/ml	5 ng/ml	0.5 µl
Noggin	100 µg/ml	100 ng/ml	50 µl
A83-01	5 mM in DMSO	500 nM	50 µl
Y-27632 dihydrochlorid	100 mM in DMSO	5 µM	2.5 µl
SB202190	30 mM in DMSO	500 nM	0.88 µl
B27 supplement	50x	1x	1 ml
N-Acetyl- L-cystein	500 mM in PBS	1.25 mM	125 µl
Nicotinamid	1 M in PBS	5 mM	250 µl
GlutaMax	100x	1x	500 µl
HEPES	1 M	10 mM	500 µl
Penicillin/Streptomycin		100 µg/ml	500 µl
Primocin	50 mg/ml	50 µg/ml	50 µl

Tabelle 13 Komponenten des Breast Cancer (BC) Mediums mit L-WRN-„conditioned medium“ für die Organoidkultur

Komponente	Stammlösung	finale Konzentration	Volumen
Advanced DMEM/F12			22 ml
L-WRN-conditioned medium (mit oder ohne FBS)		50 %	25 ml
Neuregulin 1	5 µM	5 nM	50 µl
FGF7	50 µg/ml	5 ng/ml	5 µl
FGF10	100 µg/ml	20 ng/ml	10 µl
EGF	500 µg/ml	5 ng/ml	0.5 µl
A83-01	5 mM in DMSO	500 nM	50 µl
Y-27632 dihydrochlorid	100 mM in DMSO	5 µM	2.5 µl
SB202190	30 mM in DMSO	500 nM	0.88 µl
B27 supplement	50x	1x	1 ml
N-Acetyl-L-cystein	500 mM in PBS	1.25 mM	125 µl
Nicotinamid	1 M in PBS	5 mM	500 µl
GlutaMax	100x	1x	500 µl
HEPES	1 M	10 mM	500 µl
Penicillin/Streptomycin		100 µg/ml	500 µl
Primocin	50 mg/ml	50 µg/ml	50 µl

Das BC Medium wurde wöchentlich frisch angesetzt.

Ein Medienwechsel für die Organoid fand einmal pro Woche statt, zu Beginn der Woche wurde i. d. R. 50 µl für 48 well Platten, 100 µl für 24 well Platten frisches Medium zugegeben.

II.2.1.5. Zellen auftauen und aussäen

Zum Auftauen tiefgefrorener Zellen wurde das Kryo-Röhrchen nach Entnahme aus dem Stickstofftank so lange im Wasserbad geschwenkt, bis nur noch ein Rest Eis in der Zellsuspension übrig geblieben war. Nun wurde der Inhalt des Kryo-Röhrchens in ein 15 ml Falcon überführt und dieses auf 10 ml mit dem für die Zellen entsprechenden, im Wasserbad bei 37 °C aufgewärmtem Medium aufgefüllt. Das Falcon wurde bei 150 x g 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in dem für die weitere Verarbeitung notwendigen Volumen an Medium resuspendiert.

II.2.1.6. Zellen einfrieren

Zellsuspensionen, die nicht vollständig ausplattiert bzw. verarbeitet werden konnten oder zum aktuellen Zeitpunkt für den weiteren Forschungsverlauf nicht benötigt wurden, wurden eingefroren.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen in der Neubauer-Kammer gezählt, da pro Kryo-Röhrchen ca. $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingefroren werden sollten. Zum Auszählen der Zellen wurde das Zellpellet nach dem Zentrifugieren bei 150 x g für 5 min in 1 ml Medium resuspendiert. Davon wurden in einer 96 well Platte 10 µl 1:1 mit Trypitanblau gemischt, 10 µl entnommen und in die Neubauerkammer pipettiert.

Mit der Formel:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = n \cdot 10^4 \left[\frac{\text{Zellen}}{m} \right]$$

ml = Milliliter

n = Anzahl der gezählten Zellen

m = Anzahl der gezählten Quadrate

konnte die Anzahl der Zellen pro Milliliter berechnet werden und somit auch das Volumen an Medium, das zum Einfrieren benötigt wurde. 500 - 1000 µl Zellsuspension wurden 1:1 mit *Freeze-Medium* (Tabelle 14) auf Eis in 1.0 ml Kryo-Röhrchen gefüllt und für 15 min auf Eis stehen gelassen.

Tabelle 14 „Freeze Medium“ Zusammensetzung

Komponente	
DMSO	20 %
FBS	30 %
RPMI/DMEM	50 %

Nach Ablauf der 15 min wurde das Kryo-Röhrchen in einem „Mr. Frosty“ (Kryo-Röhrchenbehälter mit Isopropanol) über Nacht bei - 80°C eingefroren. Hiermit wurde eine Abkühlungsrate von 1 °C/min erreicht. Am Folgetag, aber spätestens im Verlauf der kommenden Woche, wurden die eingefrorenen Zellen in einen Stickstofftank überführt.

II.2.2. Organoidkultur

II.2.2.1. Organoidzelllinien in Kultur nehmen

Nach dem Auftauen der Zellen werden sie in sogenannten „Matrigel *domes*“ ausgesät, die ihnen ein dreidimensionales Wachstum und Differenzierung ermöglichen. Dafür wurde das Zellpellet in BC Medium resuspendiert und 1:3 mit Matrigel auf Eis gemischt. Hierbei ist zu beachten, dass sich im Matrigel keine Luftblasen bilden und das Matrigel nach Möglichkeit immer auf Eis gehandhabt wird, da dieses schon bei Raumtemperatur polymerisiert. Für 48 *well* Platten wurden 20 µl, für 24 *well* Platten 40 µl *domes* pro *well* pipettiert. Die Zellkulturplatte wird nach dem Pipettieren der Zell-Matrigelmischung um 180° gewendet und „kopfüber“ im Brutschrank für 15 min inkubiert, bis das Matrigel polymerisiert und somit annähernd fest geworden ist. Die Platte wurde wieder gewendet und die *domes* mit 250 µl (48 *well*) oder 650 µl (24 *well*) BC Medium bedeckt.

II.2.2.2. Organoide splitten

Als Passagierung/Passage oder „Split“ wurde der enzymatische Verdau der Organoide zu Einzelzellen und deren erneutes Aussäen in Matrigel und Kulturmedium bezeichnet, sodass aus den enthaltenen Stammzellen erneut Organoide wachsen sollten.

Eine Passagierung wurde mit Organoidkulturen durchgeführt, die eine gewisse Anzahl bzw. Größe der Organoide erreicht hatten. Die Größe betreffend wurden die Organoide frühestens ab 100 µm oder wenn nach zwei Wochen Kultur keine Größenzunahme mehr

zu beobachten war, passagiert. Die *wells* der Kulturplatten wurden dabei in einem der Größe und Dichte der Organoide angepassten Verhältnis gesplittet.

Grundsätzlich wurde angestrebt, eine neue Zelllinie zunächst fünfmal zu splitten, bevor sie auch fixiert wurde. Das diente der Etablierung einer Zelllinie und selektierte die Brustkrebszellen gegenüber Fibroblasten.

Zum Splitten der Organoide wurde zunächst der *dome* aus Matrigel aufgelöst. Dafür wurde das Medium aus den *wells* abgenommen und 50 µl (100 µl) Dispase ACF in 200 - 250 µl PBS zum *well* zugegeben. Die Platte wurde bei 37 °C und 5 % CO₂ für 60 min inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt der *wells* in 1.5 ml Eppendorfgefäße überführt und pro *well* 200 µl TrypLE zugegeben. Die Eppendorfgefäße wurden für 10 - 15 min - je nach Stabilität der Organoide - bei 37 °C und 1400 rpm auf dem Schüttler geschüttelt und danach wieder in ein 15 ml Falcon überführt. Der TrypLE-Verdau wurde mit 400 µl RPMI Medium mit 10 % FBS und 1 % Penicillin/Streptomycin pro gesplittetem *well* abgestoppt. Das Falcon wurde bei 150 x g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet konnte in der für das Splitverhältnis notwendigen Menge BC Medium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:3 (BC Medium zu Matrigel) mit Matrigel gemischt werden. Matrigel wurde ständig auf Eis gehandhabt. Sobald die Zellsuspension zugefügt wurde, wurden die folgenden Schritte zügig durchgeführt, um die Zellen durch die Kälte nicht zu schädigen und das Matrigel nicht vorzeitig polymerisieren zu lassen.

In eine 48 *well* Platte wurden nun je 20 µl bzw. 40 µl für 24 *well* Platten der Matrigel-Zellsuspension pipettiert. Dabei war darauf zu achten, die Pipette möglichst mittig aufzusetzen und, um Luftblasen zu vermeiden, nur bis zum ersten Druckpunkt zu pipettieren. Sobald alle *domes* aufgesetzt waren, wurde die Platte um 180° gewendet und für 15 min bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank polymerisiert. Bei Verwendung einer 48 *well* Platte wurden 20 µl Matrigelsuspension für die *domes* verwendet und 250 µl BC Medium zugegeben; für die 24 *well* Platten 40 µl Matrigelsuspension und 650 µl BC Medium.

Zum Abschluss wurden i. d. R. Fotos gemacht. Ein erneuter Split war je nach Zelllinie nach 7 - 20 Tagen möglich.

II.2.2.3. Organoide fixieren

Nach dem Matrigelverdau durch Dispase konnten Organoide fixiert werden. Dafür wurde der Inhalt der *wells* in ein 15 ml Falcon überführt, die *wells* mit 0.1 % BSA in PBS ausgewaschen und dem Falcon zugeführt. Das Falcon sollte zuvor unbedingt auch mit 0.1 % BSA in PBS beschichtet worden sein, was dazu diente, dass die Organoide nicht am Rand des Falcons haften blieben und so der Materialverlust während des Fixierungsprozesses geringer ist.

Das Falcon wurde nun bei 150 x g 1 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Ab diesem Zeitpunkt wurde jede verwendete Pipettenspitze vor Gebrauch mit 0.1 % BSA in PBS beschichtet (einmal auf- und abpipettieren) und auch ein 1.5 ml Eppendorfgefäß, in dem das weitere Prozedere vollzogen wurde. Das Organoidpellet wurde mit 500 µl 4 % Paraformaldehyd (PFA) aufgenommen und in das beschichtete 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Organoide wurden dann bei Raumtemperatur in dem 4 %igen PFA 30 min stehen gelassen, anschließend bei 2000 x g 2 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgte ein Waschschrift mit 0.1 % BSA in PBS. Sollten sich während des Waschschriftes die Organoide wieder vom Boden des Eppendorfgefäßes gelöst haben, wurde ein Zentrifugationsschritt bei 2000 x g 2 min angehängt. Anschließend wurde eine Ethanolreihe mit 25 %, 50 % und 70 % Ethanol zur Entwässerung durchgeführt. Die unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen wurden je 10 min bei Raumtemperatur auf den Organoiden belassen. Wenn nötig, d. h. wenn die Organoide sich aus dem Pellet gelöst hatten, wurde das Eppendorfgefäß zwischen den Ethanolstufen wieder bei 2000 x g 2 min zentrifugiert.

In 70%igen Ethanol konnten die Organoide für mehrere Wochen bei 4 °C gelagert werden.

II.2.2.4. Organoide einbetten und schneiden

Ursprüngliche Methode:

Die im Ethanol konservierten Organoide wurden zum Anfertigen von Kryostatschnitten in TissueTek® mit Histogel eingebettet. Zur Vorbereitung der Einbettung wurde Histogel bei 65 °C auf dem Schüttler (ohne schütteln) erwärmt und somit verflüssigt. Auf der Arbeitsfläche wurde ein Stück Alufolie (alternativ Parafilm) ausgebreitet, das zur Platzierung der Organoidproben in Histogel dienen sollte.

Hierfür wurde zunächst das Eppendorfggefäß mit den enthaltenen, in 70%igem Alkohol fixierten, Organoiden bei 2000 x g 2 min zentrifugiert, anschließend der Alkohol abgenommen und das Pellet 2 x mit 1 - 2 ml PBS gewaschen. Zwischen den Waschschrritten konnte das Eppendorfggefäß immer wieder kurz zentrifugiert werden. Zum Schluss wurde das PBS abgenommen.

Das Organoidpellet wurde in 50 - 100 µl Histogel (je nach Größe des Pellets) resuspendiert. Das Histogel-Organoidgemisch wurde mit der Pipette aufgenommen, die Pipettenspitze senkrecht auf die bereitgelegte Alufolie aufgesetzt und vorsichtig ein Histogeltropfen darauf pipettiert. Dabei wurde nur bis zum ersten Druckpunkt pipettiert, um eine Blasenbildung zu vermeiden. Die entstandenen Histogeltropfen wurden bei - 20°C eingefroren und somit ausgehärtet.

Auf dem Ende eines dicken Filzschreibers wurde in der Zwischenzeit mit Alufolie ein Hut vorgeformt. Der Boden dieses Hutes wurde mit TissueTek® bedeckt und ebenfalls bei - 20 °C eingefroren. Der ausgehärtete Histogeltropfen wurde nun in die Mitte des gefrorenen TissueTeks® gesetzt und mit weiterem TissueTek® bedeckt. So wurde die Probe abermals bei - 20°C eingefroren. In dieser Konstellation konnten die Organoide in Histogel am Kryotom geschnitten werden.

Alternative Methode:

Die im Ethanol konservierten Organoide wurden zum Anfertigen von Kryostatschnitten in TissueTek® eingebettet. Zu diesem Zwecke wurde das Eppendorfggefäß bei 2000 x g 2 min zentrifugiert, der 70%ige Alkohol abgenommen und das Organoidpellet einmal mit 0.1 % BSA in PBS gewaschen. Auf das Pellet wurden einige Tropfen - je nach Größe des Pellets - RPMI-Medium zugegeben und darin resuspendiert. Das Phenolrot im Medium sollte die Lokalisation der Organoide im TissueTek® zum vereinfachten Erkennen beim Gefrierschneiden kennzeichnen. TissueTek® ist im gefrorenen Zustand weiß.

An einem Filzschreiber wurde eine Alufolie vorgeformt und der Boden dieser mit TissueTek® bedeckt. In das TissueTek® wurde ein Tropfen Trypanblau (ca. 3 µl) pipettiert, um den Beginn der Organoidprobe zu markieren. Das Trypanblau blieb aufgrund der geringeren Dichte an der Oberfläche des TissueTeks®. Das TissueTek® wurde bei - 20 °C bis zum Festwerden eingefroren. Sobald dieses fest war, wurde ein Holzstab mit dem Durchmesser von 0.5 cm in der Mitte des Aluhuts auf dem TissueTek®-Boden platziert. Der Holzstab diente hier als Platzhalter für die Organoidprobe, die später dort hinein pipettiert wurde. Um den Holzstab herum wurde erneut TissueTek® gefüllt und zum

Frieren bei - 20°C gelagert. Nachdem das TissueTek® fest geworden war, wurde der Holzstab entfernt und in die so entstandene Mulde im TissueTek® die Organoid-RPMI-Lösung pipettiert. Dies wurde abermals bei - 20°C eingefroren. Zuletzt wurde die Mulde vollständig mit TissueTek® gefüllt, sodass der Block komplett war und bis zur Verwendung bei - 20°C gelagert.

Der so entstandene Block konnte nun am Kryotom geschnitten werden. Angestrebt wurde eine Schnittdicke von 5 µm mit mehreren Organoidanschnitten pro Schnitt, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Je zwei Schnitte wurden auf Superfrost Objektträgern aufgenommen.

II.2.3. Immunfluoreszenzfärbung (IFL)

II.2.3.1. Färbung von Kryostatschnitten

Die angefertigten 5 µm Schnitte wurden durch Immunfluoreszenzfärbung markiert. Hierfür wurden sie über Nacht getrocknet und vor der Färbung bei - 20°C in Methanol für 5 min fixiert. Sie wurden in PBS für 5 min gewaschen und anschließend getrocknet. Die Schnitte wurden mit PAP-Pen umrundet und in eine feuchte Kammer gelegt. Alle verwendeten Antikörper wurden in 0.1 % BSA in PBS verdünnt, die Verdünnung war abhängig vom einzelnen Antikörper. DAPI (2 mg/ml) wurde stets 1:1000 verdünnt, die Zweitantikörper 1:200.

Aufgrund der Begrenzung durch den PAP-Pen können alle weiteren Schritte direkt auf dem Schnitt durchgeführt werden, d. h. alle Reagenzien werden auf den Schnitt pipettiert. Als erstes wurde der Schnitt mit 5 % BSA in PBS für 15 min geblockt und dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Der Erstantikörper wurde in 0.1 % BSA in PBS verdünnt auf den Schnitt pipettiert. In der feuchten abgedunkelten Kammer wurde der Schnitt für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Schnitt wieder dreimal 5 min mit PBS gewaschen und anschließend der Zweitantikörper mit DAPI ebenfalls in 0.1 % BSA in PBS verdünnt darauf gegeben. Auch der Zweitantikörper wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Zum Abschluss wurde der Schnitt in PBS 3 x 5 min gewaschen und mit *fluorescence mounting medium* und 24 x 50 mm Deckgläsern eingedeckelt.

II.2.3.2. Färbung von Paraffinschnitten

Es wurden Paraffinschnitte von Organoidlinien aus der Frauenklinik AG Koch übernommen (s. Tabelle 5).

Entparaffinieren

Vor der Immunfluoreszenzfärbung mussten die Schnitte entparaffiniert werden, da das Paraffin die Bindung der Antikörper an ihre Zielstrukturen stört. Hierzu wurde eine Reihe von Xylol- und Ethanol-Schritten durchgeführt:

3 x 10 min	Xylol
2 x 3 min	100 % Ethanol
2 x 3 min	96 % Ethanol
1 x 3 min	75 % Ethanol
1 x 5 min	75 % Ethanol
1 x 5 min	30 % Ethanol
1 x 5 min	H ₂ O

Anschließend sollte eine direkte Weiterverarbeitung erfolgen, da die Schnitte nach dem Entparaffinierungsprozess nicht mehr austrocknen sollten. Vor der eigentlichen Färbung mit Antikörpern wurde noch eine Demaskierung der Schnitte vorgenommen. Durch das Einbetten in Paraffin von PFA-fixierten Schnitten kann es grundsätzlich zu einer Veränderung von Epitopen kommen (durch Quervernetzung etc.), was eine Bindung von Antikörpern erschwert. Die Demaskierung dient der Lösung der Quervernetzungen und so einer Permeabilitätssteigerung für die Antikörper (Lang, 2013). Hierzu wurden die entparaffinierten Schnitte in einem Demaskierungspuffer für 10 min bei 80 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend 2 x 3 min in PBS gewaschen.

Demaskierungspuffer:

1.2 g 100 mM Tris

5 g 5 % Urea

Nach dem Einwiegen der Komponenten auf 100 ml mit Wasser auffüllen und mit einem pH-Messgerät auf pH 9.5 einstellen.

Immunfluoreszenzfärbung

Nach dem Waschen in PBS wurden die Schnitte trockengeschüttelt und in einer feuchten Kammer platziert. Pro Schnitt wurden 100 µl Antikörperlösung des Erstantikörpers auf die Schnitte pipettiert. Sowohl Erst- als auch Zweitantikörper wurden in 1 % BSA in PBS-Tween verdünnt, die Verdünnung war abhängig vom jeweiligen Antikörper.

Die Schnitte wurden mit dem Erstantikörper in der feuchten Kammer für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sie in PBS 3 x für 3 min gewaschen und wieder in der feuchten Kammer platziert. Es wurden 100 µl Zweitantikörper mit DAPI in 1 % BSA in PBS-Tween pro Schnitt aufpipettiert und bei Raumtemperatur für eine weitere Stunde inkubiert. Die Zweitantikörper und DAPI wurden i. d. R. 1:1000 verdünnt.

PBS-Tween	
1X PBS	100 ml
Tween-20	100 µl

II.2.3.3. Färbung in Chamberslides

Für die Färbung in *8-Chamberslides* konnten die Organoide im Ganzen verwendet werden. Es mussten hierfür keine Kryostatschnitte oder Paraffinschnitte angefertigt werden. Bei gut wachsenden Kulturen wurden 3 - 4 *wells* der Zellkultur pro *Chamberslide* verwendet.

Vorbereitend wurde das Medium von den *wells* mit den zu färbenden Organoiden abgenommen und 1 ml eiskaltes Splitting-Medium pro *well* hinzupipettiert. Das Splitting-Medium wurde in den *wells* mit einer 1000 µl Pipettenspitze 10 - 15 Mal auf- und abpipettiert. Anschließend wurde mit einer 100 µl Pipette (diese auf 50 - 70 µl einstellen) weitere 20 Mal auf- und abpipettiert, um die Matrigel-*Domes* mechanisch zu zerstören.

Splitting-Medium

Adv. DMEM F12	50 ml
Hepes	500 µl
GlutaMax	500 µl
Primocin	125 µl

Der Inhalt der *wells* wurde nun in ein 15 ml Falcon überführt und auf 12 ml mit kaltem Splitting-Medium aufgefüllt. Das Falcon wurde bei 150 x g 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand vorsichtig bis auf 20 - 30 µl abgenommen.

Für ein *Chamberslide* wurden 1160 µl kaltes Splitting-Medium und 40 µl Matrigel auf das Pellet gegeben und gut resuspendiert. Pro *Chamber* wurde anschließend 150 µl dieser Organoidsuspension verwendet; am Mikroskop konnte in den einzelnen *Chambers* überprüft werden, ob genügend Organoide vorhanden sind und das ursprüngliche, polymerisierte Matrigel vollständig entfernt werden konnte. Falls noch Matrigelreste vorhanden waren, wurde die Organoidsuspension erneut in eine 15 ml Falcon überführt, dieses erneut bei 150 x g 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Es wurden erneut 1160 µl Splitting-Medium und 40 µl Matrigel hinzugegeben und 150 µl dieser Suspension in die *Chamber* gegeben. Eine erneute Kontrolle am Mikroskop wurde durchgeführt.

Diese 150 µl der Organoidsuspension in den *Chamberslides* wurde dann für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden pro *Chamber* zusätzlich 250 µl steril filtriertes 4 % PFA pro *well* zugegeben und weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 250 µl von den *Chambers* vorsichtig wieder abgenommen und verworfen. Es wurde mit 250 µl PBS dreimal gewaschen, wobei das PBS jeweils vorsichtig auf die *Chambers* getropft wurde. Am Mikroskop konnte wieder überprüft werden, ob die Organoide fest auf den Boden der *Chambers* abgesunken waren.

Vor der Färbung mit Antikörpern wurden die Organoide in den *Chambers* blockiert und permeabilisiert. Hierfür wurden 100 µl 5 % BSA und 100 µl 0.2 % Triton-X-100 + 50 µl 0.1 % Tween 20 (hierfür eine abgeschnittene Pipettenspitze verwenden, da Tween sehr viskos ist) pro *Chamber* pipettiert und 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die einzelnen *Chambers* mit je 250 µl PBS gewaschen und konnten so bei 4 °C bis zur Färbung gelagert werden. Die Lösung konnte ggf. mit 0.01 % Na-Azid-Lösung versetzt werden, falls eine Weiterverarbeitung nicht direkt am nächsten Tag stattfand.

Immunfluoreszenzfärbung

Für die eigentliche Färbung wurde das PBS vorsichtig und möglichst vollständig von den *Chambers* abgenommen und pro *Chamber* 100 µl des Erstantikörpers in 0.1 % BSA in PBS zugegeben; auch hier war die Verdünnung des Erstantikörpers vom jeweiligen Antikörper abhängig (s. o.). Es folgte eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Anschließend wurden die *Chambers* dreimal mit PBS gewaschen. Je 100 µl Zweitantikörper (1:750 µl) mit DAPI (1:1000 µl) in 0.1 % BSA in PBS wurden in die *Chambers* pipettiert und erneut eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Auch danach schloss sich ein dreimaliges Waschen mit 250 µl PBS an.

II.2.3.4. Auswertung am Fluoreszenzmikroskop

Die Objekte konnten bis zur Betrachtung unter einem Fluoreszenzmikroskop einige Wochen lichtgeschützt zur Verhinderung der Ausbleichung der Fluorophore bei 4 °C aufbewahrt werden. Die Bildaufnahme und Bildbearbeitung erfolgte mit einer Digitalkamera (Axio Cam, Carl Zeiss Vision GmbH) und Axio Vision 4.0 (Carl Zeiss).

II.2.3.5. Färbung für Konfokal-Mikroskopie

Die Organoide konnten im Ganzen für eine Betrachtung an einem konfokalen Mikroskop fixiert und Immunfluoreszenz markiert werden. Dabei hatte das Multiphoton-Mikroskop gegenüber dem *Laser-Scan-Mikroskop* (LSM) den Vorteil, dass eine höhere Auflösung auch bei größeren Objekten erreicht werden konnte. Die Aufnahme am Multiphoton-Mikroskop benötigte mehr Zeit und konnte zu einem Ausbleichen der Fluorophore führen, während Aufnahmen am LSM schneller durchführbar waren und demnach die Fluorophore schonender behandelt wurden (Dekkers et al., 2019).

Die Verarbeitung der Organoide für eine 3D-Mikroskopie am Konfokal-Mikroskop erfolgte ursprünglich an drei Tagen und orientierte sich an einem Protokoll der Arbeitsgruppe um Hans Clevers (Dekkers et al., 2019).

Nach einigen Modifikationen konnte das Protokoll auf einen Tag verkürzt werden.

Ursprüngliches Protokoll:

Tag 1

Zunächst wurden die Matrigel-*domes* nach Abnahme des Mediums mit je 50 µl Dispase (1 mg/ml) in 200 µl PBS für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und aufgelöst. Der Inhalt der *wells* wurde in ein mit 0.1 % BSA in PBS beschichtetes 15 ml Falcon überführt. Die *wells* wurden mit 0.1 % BSA in PBS ausgewaschen und ebenfalls in das Falcon zugegeben, anschließend wurde das 15 ml Falcon auf 10 ml mit PBS aufgefüllt. Das Falcon wurde bei 150 x g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Organoidpellet wurde in 1 ml 4 % PFA resuspendiert und bei 4 °C 30 min inkubiert. Das Falcon wurde anschließend auf 10 ml mit kaltem PBS-Tween aufgefüllt und erneut 10 min bei 4 °C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 150 x g für 5 min, wonach der Überstand abgenommen wurde. Das Organoidpellet wurde in *Organoid washing buffer* (OWB) resuspendiert und je 200 µl der Suspension je nach Anzahl der Organoide in *wells* einer 24-*well*-Platte überführt. Als Referenz wurde in ein leeres *well* der 24-*well*-Platte 200 µl OWB gegeben.

Dabei war darauf zu achten, dass es sich bei der 24-*well*-Platte um eine *low-adherence* Platte handelte oder, falls diese nicht vorhanden, die 24-*well*-Platte zuvor mit 0.1 % BSA in PBS beschichtet wurde. In der 24-*well*-Platte wurde die Organoidsuspension bei 4 °C für 15 min inkubiert.

Nach der Inkubation sollten die Organoide vollständig abgesunken sein. Es wurde dann bis auf 200 µl der OWB von den *wells* abgenommen, wobei sich am Referenzwell orientiert werden konnte. Anschließend wurden 200 µl OWB mit Erstantikörper (Verdünnung je nach Antikörper) zugegeben und über Nacht auf einem horizontalen Schüttler bei 60 rpm und 4 °C inkubiert.

Organoid washing buffer (OWB)

1X PBS	100 ml
BSA	0.2 g
Tween-20	100 µl

Tag 2

In die *wells* wurde je 1 ml OWB zugegeben und die Organoide darin anschließend 5 min absinken gelassen. Danach wurde 1 ml OBW wieder abgenommen und erneut 1 ml OWB zugegeben. In OWB wurden die Organoide für 30 min bei 4 °C auf dem horizontalen Schüttler inkubiert. Nachdem die Organoide wieder abgesunken waren, wurde erneut 1 ml OWB zugegeben und bei 4 °C 30 min auf dem horizontalen Schüttler inkubiert. Diese Schritte wurden ein weiteres Mal wiederholt und anschließend je 200 µl Zweitantikörper in OWB 1:200 und DAPI 1:1000 verdünnt auf die *wells* pipettiert. Über Nacht oder für zwei Tage wurden die Organoide mit Zweitantikörper bei 4 °C auf dem horizontalen Schüttler inkubiert.

Tag 3

Wie am Vortag wurde 1 ml OWB pro *well* zugegeben. Bevor das OWB wieder abgenommen wurde, mussten die Organoide wieder auf den Boden abgesunken sein, dann wurde erneut 1 ml OWB pro *well* dazu pipettiert und für 30 min bei 4 °C auf einem horizontalen Schüttler gewaschen. Dies wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Organoide in 1.5 ml Eppendorfgefäße überführt und konnten hier bis zu 2 Tage vor Weiterverarbeitung bei 4 °C gelagert werden.

Zur Weiterverarbeitung wurden die Eppendorfgefäße mit den Organoiden bei 2000 x g für 2 min zentrifugiert und der Überstand möglichst vollständig abgenommen. Zur Einbettung der Organoide auf Objektträgern wurde eine Fructose-Glycerin-Lösung hergestellt. Die Fructose-Glycerin-Lösung diente einem „Clearing“ der Organoide, d. h. sie wurden für optische Betrachtungsmethoden durch Modifikation von Bestandteilen transparenter gemacht. Glycerin wurde hierfür mit H₂O gemischt. In einem Becherglas wurden 45.04 g Fructose abgewogen und mit der 60%igen Glycerinlösung auf 100 ml aufgefüllt. Diese Mischung wurde auf dem Magnetrührer gut gemischt.

Fructose-Glycerin *clearing* solution

2.5 M Fructose	45.04 g
Glycerin	60 ml
H ₂ O	40 ml

Zur Mikroskopie am Multiphoton-Mikroskop wurden Objektträger für die Proben vorbereitet. Dafür wurden auf die Objektträger mit PAP-Pen ein 2 x 2 cm großes Quadrat gemalt. An die Ränder des Fettstift-Quadrats wurden je nach Größe der Organoide 1 - 3 Lagen doppelseitiges Klebeband übereinander geklebt (Abbildung 13). Pro Lage doppelseitigen Klebebandes wurden 20 µl Fructose-Glycerin-Lösung (s. u.) auf das Organoidpellet gegeben und vorsichtig resuspendiert, um Blasenbildung zu vermeiden. Dafür eignete sich eine abgeschnittene 200 µl Pipettenspitze. Diese Fructose-Glycerin-Organoid-Suspension wurde nun in die Mitte des PAP-Pen-Quadrates pipettiert. Bevor ein 24 x 50 mm Deckglas vorsichtig auf die Klebebandstreifen platziert wurde, wurde 1 min abgewartet, bis sich die Fructose-Glycerin-Organoid-Mischung in dem Quadrat verteilt hatte. Das Deckglas wurde vorsichtig angedrückt.

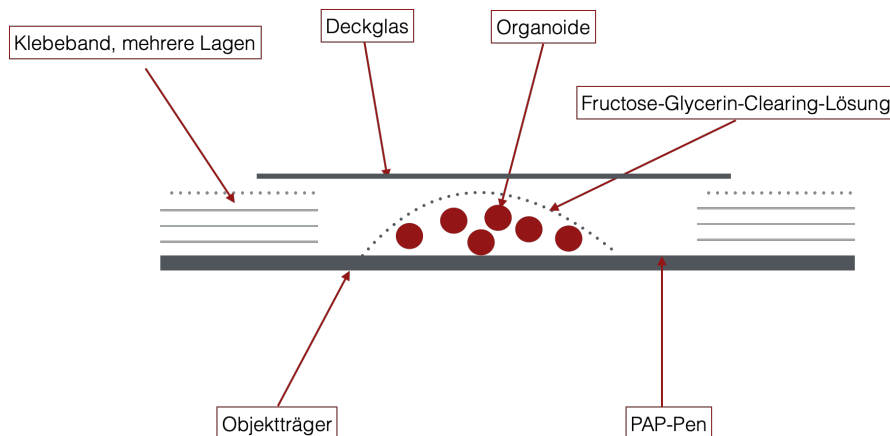


Abbildung 13 Schematische Darstellung des Aufbaus der Objektträger mit Organoiden für Konfokal-Mikroskopie

Die Organoide werden in der Fructose-Glycerin-Clearing-Lösung auf einen Objektträger pipettiert. Der Objektträger wird zuvor mit einem Quadrat mit PAP-Pen (ca. 2 x 2 cm) und links und rechts davon mehreren Lagen doppelseitigem Klebeband präpariert (je nach Probengröße). Auf die Organoidprobe wird vorsichtig das Deckglas gelegt, das auf den Seiten des doppelseitigen Klebebands aufliegen sollte.

Das Protokoll ließ sich deutlich verkürzen, wenn die Inkubation mit Antikörpern statt bei 4 °C bei 37 °C im Brutschrank stattfand. Der Ablauf sowie die Substanzen blieben dieselben.

Modifiziertes Protokoll:

Die Organoide wurden für die Immunfluoreszenzfärbung zunächst in 4 % PFA fixiert. Hierfür wurden zunächst wieder das Medium aus den *wells* abgenommen und 200 µl PBS mit 50 µl 1 mg/ml Dispase zugegeben. Die Platte wurde bei 37 °C für 1 h inkubiert, bis die Matrigel-*domes* aufgelöst waren.

Der Inhalt der *wells* wurde in ein mit zuvor mit 0.1 % BSA in PBS beschichtetes 15 ml Falcon überführt und auf 10 ml mit 0.1 % BSA/PBS aufgefüllt. Anschließend wurde das Falcon bei 150 x g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 1 ml 4 % PFA resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde das Falcon auf 10 ml mit kaltem PBS-T aufgefüllt und erneut 10 min bei 4 °C (auf Eis) stehen gelassen. Das Falcon wurde danach bei 150 x g 5 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in OWB resuspendiert.

Die Menge an OWB orientierte sich an der Anzahl der *wells* einer 24-*well*-Platte, die für die anschließende Immunfluoreszenzfärbung verwendet werden sollte; pro *well* wurden 200 µl der Organoid-OWB-Mischung berechnet.

So konnten die fixierten Organoide bei 4 °C gelagert werden.

Immunfluoreszenzfärbung

Für die Färbung wurden zunächst aus jedem *well* 150 µl OWB vorsichtig abgenommen. Dabei konnte die Platte vorsichtig gekippt werden, sodass die Organoide nach unten sanken.

Der Erstantikörper wurde in OWB i. d. R. 1:200 verdünnt und pro *well* 200 µl Antikörpersuspension zugegeben. Dies konnte bei 37 °C für 1 h inkubiert werden. Anschließend wurden zu den *wells* 300 µl OWB zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die 300 µl OWB wurden vorsichtig wieder abgenommen und erneut 300 µl OWB zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 500 µl OWB abgenommen.

Wie der Erstantikörper wurde auch der Zweitantikörper in OWB verdünnt, ebenfalls i. d. R. 1:200 - dazu kam DAPI mit einer Konzentration von 1:500. Von dieser Antikörperlösung wurden 200 µl pro *well* zugegeben und wieder für 1 h bei 37 °C inkubiert. Wie nach der Inkubation mit dem Erstantikörper wurden die *wells* danach mit OWB zweimal gewaschen. Der Inhalt der *wells* wurde dann in 1.5 ml Eppendorfgefäße überführt und bei

200 x g 1 min zentrifugiert. Das OWB sollte möglichst vollständig aus den Eppendorfgläsern abgenommen werden. Das Organoidpellet am Boden der Eppendorfgläser wurde in ca. 30 μ l pro well Fructose-Glycerin-Lösung resuspendiert. Die Organoide in der Fructose-Glycerin-Lösung wurden in die wells einer μ -Slide Angiogenese Glas-Boden-Platte (Abbildung 14) gegeben und in dieser am Mikroskop ausgewertet.



Abbildung 14 μ -Slide Angiogenese Glas-Boden-Platte

In die Vertiefungen der μ -Slide Angiogenese Glas-Boden-Platte konnten die in Fructose-Glycerin-Lösung enthaltenen Organoide zur konfokalen Mikroskopie pipettiert werden.

(Quelle: <https://ibidi.com/chambered-coverslips/41--slide-angiogenesis.html>, zuletzt: 13.04.2021)

II.2.3.6. Auswertung am LSM880 Airyscan Konfokal-Mikroskop

Die Objekte konnten bis zur Betrachtung unter einem *Laser-Scan*-Mikroskop (LSM)/Konfokal-Mikroskop oder Multiphoton-Mikroskop einige Wochen lichtgeschützt zur Verhinderung der Ausbleichung der Fluorophore bei 4 °C aufbewahrt werden. Die Bildaufnahme und -bearbeitung erfolgte mit einem Halogen 100 Laser an einem Zeiss LSM880 Mikroskop mit Airyscan-Detektor.

II.2.4. Molekularbiologie

II.2.4.1. RNA aufreinigen

Die Organoide wurden mit 1 mg/ml Dispase aus den Matrigel-*domes* gelöst. Der Inhalt der wells wurde in ein mit 0.1 % BSA in PBS beschichtetes 15 ml Falcon überführt, die

wells mit 0.1 % BSA in PBS ausgewaschen und dem Falcon ebenfalls zugeführt - entsprechend der ersten Schritte der Organoid-Fixierung.

Das Falcon wurde bei 150 x g 8 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle Reagenzien und Substanzen, die verwendet wurden, wurden auf Eis gehandhabt. Alle Zentrifugationen während der Aufreinigung wurden bei 13 000 x g durchgeführt. Es wurde stets unter dem Abzug gearbeitet und alle verwendeten Oberflächen mit *RNAse Away™ Reagent* abgewischt.

Es wurden drei zur RNA-Aufreinigung benötigte Ansätze mit dem *RNeasy Kit* vorbereitet:

1. RLT Puffer	600 µl	
β-Mercaptoethanol	6 µl	
2. 99 % Ethanol	210 µl	} 700 µl → 30 % Ethanol
H ₂ O RNAse free	490 µl	
3. RDD-Puffer	70 µl	
DNase I	10 µl	

Ansonsten wurde nach Angaben des Herstellers (Qiagen) verfahren.

Das Organoidpellet wurde nun im RLT-Puffer resuspendiert und in eine lilafarbene Qia-shredder®-Säule überführt. Die Säule wurde 2 min lang bei 13 000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit 700 µl des 30%igen Ethanols gemischt, gut resuspendiert und in einer rosafarbenen *RNeasy Mini Kit* Säule 15 s zentrifugiert - dasselbe wurde mit den restlichen 700 µl des Durchflusses wiederholt. Der Durchfluss wurde anschließend wieder verworfen und auf die Säule nun 80 µl des RDD-Puffers mit DNase I pipettiert. Die Säule wurde 15 - 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden 350 µl RWI-Waschpuffer auf die Säule gegeben und das Ganze 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen und 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben. Es wurde abermals 15 s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde noch einmal bei 2 min, dieses Mal mit offenem Deckel, zentrifugiert, um die Säule zu trocknen. Die Säule wurde dann in ein neues 1.5 ml Eppendorfgefäß gestellt und 30 µl RNAse-freies Wasser darauf gegeben. Es wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend 2 min zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen, im Durchfluss des 1.5 ml Eppendorfgefäßes befand sich die aufgereinigte RNA.

II.2.4.2. RNA-Messung

Die aufgereinigte RNA wurde nach ihrer Reinheit mit dem NanoPhotometer® NP80 gemessen. Die Konzentration der RNA wurde mit einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, die Reinheit der RNA konnte anhand des 260/280 nm Verhältnisses bestimmt werden. Ziel war eine Proteinreinheit von mindestens 1.9 (260/280).

II.2.4.3. Reverse Transkription (RT)

Zur Durchführung der reversen Transkription im Anschluss an die Aufreinigung der RNA wurde zunächst der benötigte Mastermix vorbereitet. Pro Probe wurde ein Mastermix mit der Zusammensetzung:

4 µl MgCl₂

2 µl RT-Puffer

2 µl 0.1 M DTT

pipettiert.

Für die reverse Transkription wurde ein Programm mit in der folgenden Tabelle 15 dargestellten Schritten ausgewählt:

Tabelle 15 Ablauf der reversen Transkription

(Modifiziert nach: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/rt-education/reverse-transcription-setup.html>, zuletzt: 13.04.2021)

	Dauer	Temperatur	
Schritt 1	5 min	65°C	<i>Inkubation der mRNA mit Primern</i>
Schritt 2	2 min	4°C	PAUSE Während Schritt 2 wurde pro Ansatz 8 µl Mastermix und zusätzlich je 1 µl RNase OUT und Superscript III zugefügt.
Schritt 3	50 min	50°C	<i>Transkription der mRNA</i>
Schritt 4	5 min	85°C	<i>Inaktivierung der Reversen Transkriptase</i>
Schritt 5	2 min	4°C	PAUSE Während Schritt 5 wurde pro Ansatz 1 µl RNase H zugefügt.
Schritt 6	20 min	37°C	<i>Trennung der mRNA von der synthetisierten cDNA</i>
Schritt 7	∞	4°C	

Das Produkt der reversen Transkription (cDNA) konnte bei Bedarf über Nacht bei - 20°C eingefroren werden.

II.2.4.4. RT-PCR

Pro Probe wurde jeweils ein PCR-Tube vorbereitet, in das je

1. 12.5 µl RedTags Readymix
 2. 10.5 µl H₂O für PCR
 3. 0.5 µl Primer forward
 4. 0.5 µl Primer reward
 5. 1 µl cDNA
- gesamt 25 µl

pipettiert wurden. Die Kontrolle wurde mit allen verwendeten Primern und ohne cDNA durchgeführt, das Volumen an H₂O für die PCR wurde dementsprechend angepasst. Für die PCR wurde ein Programm mit in der folgenden Tabelle 16 dargestellten Schritten ausgewählt:

Tabelle 16 Ablauf der PCR-Zyklen

	Dauer	Temperatur	
Schritt 1	2 min	94°C	Denaturierung
Schritt 2	45 s	95°C	Denaturierung
Schritt 3	40 s	62°C	Annealing
Schritt 4	1 min	72°C	Elongation
-			Schritt 2-4 werden in 35 Zyklen wiederholt
Schritt 5	10 min	72°C	Elongation
Schritt 6	∞	4°C	

II.2.4.5. Agarosegel gießen

Zum Nachweis der PCR-Produkte wurde ein 2%iges Agarosegel verwendet, das vor der PCR vorbereitet wurde. Dafür wurden 1.6 g Agarose mit 80 ml einfachem TBE-Puffer gemischt und in der Mikrowelle bei 700 W ca. 1 min lang aufgekocht, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte.

10X TBE-Puffer (Tris-Borsäure-EDTA)	
0.9 M Tris	109.03 g
0.9 M Borsäure	55.65 g
20 mM EDTA 2H ₂ O	8.32 g
Chemikalien wurden mit 800 ml dH ₂ O aufgelöst und auf einen pH von 8.0 eingestellt. Sobald dieser erreicht war, wurde auf 1000 ml aufgefüllt.	
Zur Herstellung eines 1X TBE-Puffers wurden 10 ml des 10X TBE-Puffers erneut mit 90 ml dH ₂ O verdünnt.	

Es wurden 8 µl GelRed hinzugegeben und die Lösung in eine Gelkammer gegossen, wo sie ca. 40 min lang aushärtete. Bevor der Kamm gezogen wurde, wurde das Gel mit einfachem TBE-Puffer begossen, sodass die Kammern mit Puffer gefüllt waren. Das Gel wurde in die PCR-Kammer gelegt, mit einfachem TBE-Puffer übergossen und an das PCR-Gerät angeschlossen.

II.2.4.6. Gelelektrophorese

Die erhaltenen Proben aus der PCR wurden nun in die Kammern des Agarosegels pipettiert. In der Regel wurden die Proben in folgender Reihenfolge angeordnet:

Marker	Probe 1	Probe 2	Probe [...]	Probe n	Marker	Kontrolle
--------	---------	---------	-------------	---------	--------	-----------

Es wurden 3 µl Marker und je 5 µl von den Proben verwendet.

Die Gelkammer wurde an Strom angeschlossen und 40 min bei 100 V und 400 mA laufen gelassen. Nach Durchlauf der Proben konnte das Gel aus der Kammer entnommen und bei UV-Licht am DIANA Xraytest gemessen und fotografiert werden.

III. Ergebnisse

III.1. Wachstum der Organoide

III.1.1. Übersicht

Für die vorliegende Arbeit wurden fünf Zellsuspensionen aus malignem oder gesundem Brustgewebe und drei bereits etablierte Organoidlinien verwendet. Wie in Tabelle 5 aufgeführt, wurden die Zellen für BC43, BC58, BC60, BC97 und K7 als kryokonservierte Einzelzellsuspension und die Zellen für BC13, BC89 und BC91 als bereits bestehende Organoidkultur aus der Frauenklinik AG Koch übernommen. Aus den Einzelzellsuspensionen wurde versucht, Organoidlinien zu etablieren. Alle Organoidkulturen wurden mit dem im Abschnitt „Methoden“ beschriebenen *Breast Cancer Medium* kultiviert. Aus diesen acht Ansätzen konnten in fünf Fällen Organoidlinien (> 5 Passagen) gewonnen werden (BC13, BC43, BC60, BC97 und K7), dies entspricht einer Erfolgsquote von 62.5 %. Dabei wurde BC60 *de novo* als Organoidlinie herangezogen, während die anderen parallel auch in der AG Koch als Organoidlinien kultiviert werden konnten. Die Organoidlinien erwiesen sich dabei über viele (z. T. > 20) Passagen als zuverlässig wachsend. Zur Objektivierung des Wachstums der Organoidlinien wurden regelmäßig Fotos der Kulturplatten angefertigt - sowohl in Übersicht als auch einzelner Organoide. Dabei wurde auf die Repräsentativität der Fotos geachtet, sodass die Fotos das Wachstumsverhalten der Organoide möglichst gut widerspiegeln. Die Übersichtsaufnahmen dienten u. a. auch dem Vergleich des Wachstumsverlaufs der einzelnen Organoidlinien untereinander. Die verschiedenen Organoidlinien wiesen unterschiedliche Morphologien und Wachstumsverhalten auf, erreichten unterschiedliche Größen und wuchsen unterschiedlich schnell und dicht. Ein Vergleich der Linien ist in Tabelle 17 und in den Abbildungen 15 - 22 dargestellt - hier werden auch die Eigenschaften der einzelnen Linien bzw. der Organoide genauer beschrieben.

Tabelle 17 Organoidlinien - Übersicht

* Die hier angegebene Größe in μm bezieht sich auf die durchschnittlich erreichte maximale Größe der Organoide. Im Verlauf konnte es Passagen geben, in denen die Organoide auch deutlich größer wuchsen.

** Der Zeitraum in Wochen bezieht sich auf die Zeit, die die Organoide im Schnitt benötigten, um ihre maximale Größe zu erreichen und anschließend einer Passage zugeführt wurden.

Zelllinie	Größe in μm *	Zeitraum in Wochen**	Morphologie	Linie neu generiert?
BC13	< 400	1	Überwiegend solide	Nein, bereits vorhanden
BC43	< 300	1 - 2	Überwiegend solide, z. T. cystische Anteile	ja
BC58	< 100	4	Solide, stark cystisch, diskohäsiv	Nicht gelungen
BC60	< 200	1 - 2	Überwiegend cystisch	ja
BC89	< 50	2 - 4	Diskohäsiv, cystisch	Nicht gelungen
BC91	< 150	1 - 3	Solide und cystische („blasig“) Organoide nebeneinander	Nicht gelungen
BC97	< 200	1 - 2	Überwiegend solide	ja
K7	< 100	1 - 6	Überwiegend solide	ja

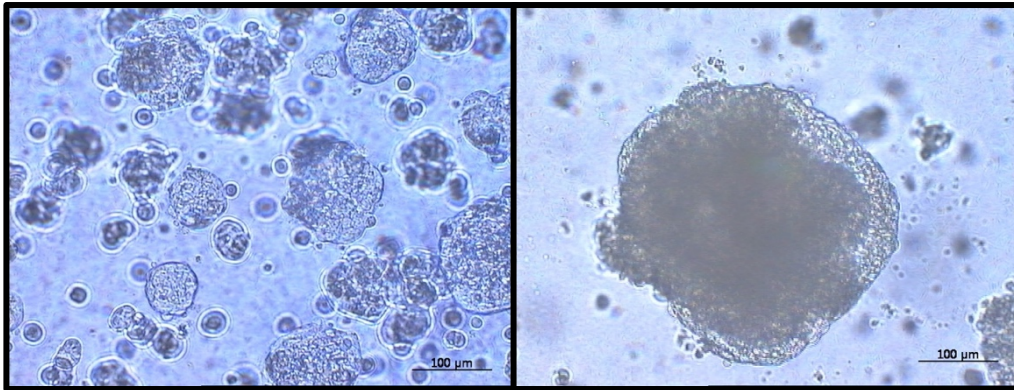


Abbildung 15 BC13 Morphologie

Die Linie BC13 wuchs überwiegend solide und verzeichnete ein deutliches Größenwachstum, das sich von den anderen Organoidlinien abhob. Sie wuchsen sowohl, wenn die Zellen sehr dicht ausgesät wurden, als auch, wenn die Zellen stark vereinzelt wurden. Ein Organoidwachstum erfolgte hier bereits nach wenigen Tagen. Meist wuchs diese Linie über Wochen weiter und erreichte Größen einzelner Organoide bis zu 500 µm.

Maßstabsbalken: 100 µm

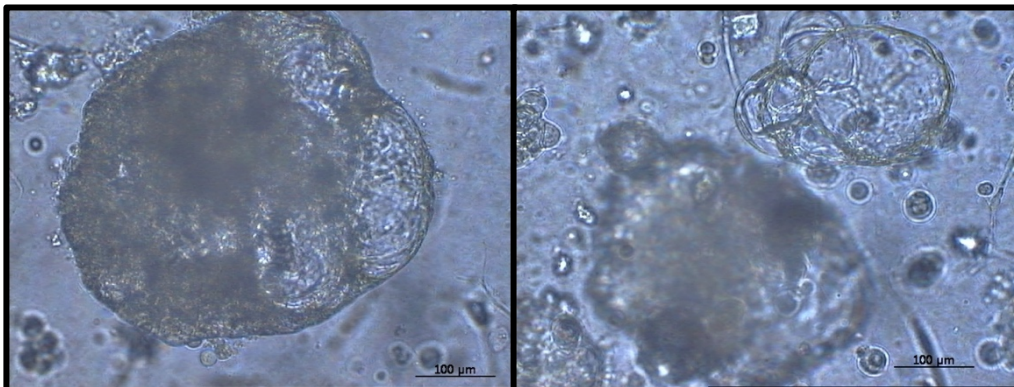


Abbildung 16 BC43 Morphologie

Die Linie BC43 beinhaltete Organoide mit soliden und cystischen Anteilen. Dabei konnten die Organoide Mischungen aus solide und cystisch sein, sie konnten jedoch auch vollständig cystisch wachsen oder sich als durchgehend solide präsentieren, die soliden Organoide kamen aber am seltensten vor. Wie BC13 zeigte sich hier ein Wachstum auch bereits nach wenigen Tagen und sie konnten über Tage bis Wochen weiterwachsen. Ab der 4. Woche stagnierte das Wachstum jedoch i. d. R, die Organoide blieben dabei in Form und Größe stabil.

Maßstabsbalken: 100 µm

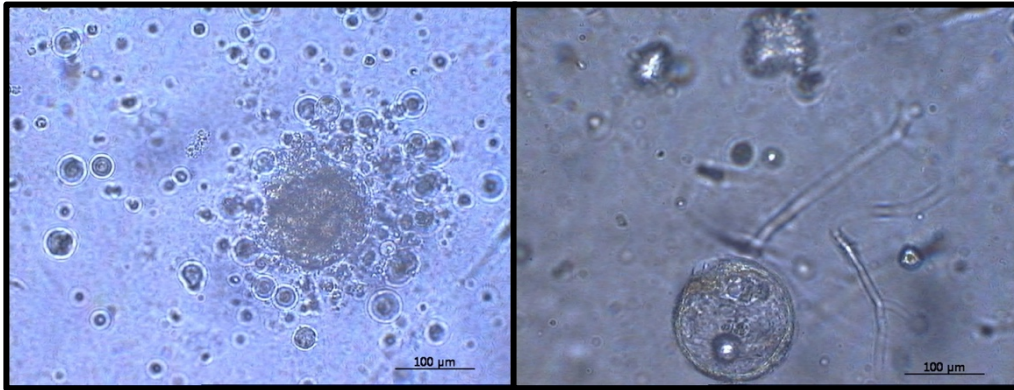


Abbildung 17 BC58 Morphologie

BC58 präsentierte sich heterogen. Es konnten sich runde, cystische Organoide bilden, sowie diskohäsiv wachsende Strukturen, die v. a. entlang von Fibroblasten zu finden waren. Auch solide Anteile waren möglich. Sie erreichten ihre maximale Größe von i. d. R. 100 µm ungefähr in der 2. Woche, behielten danach Form und Größe bei.

Maßstabsbalken: 100 µm

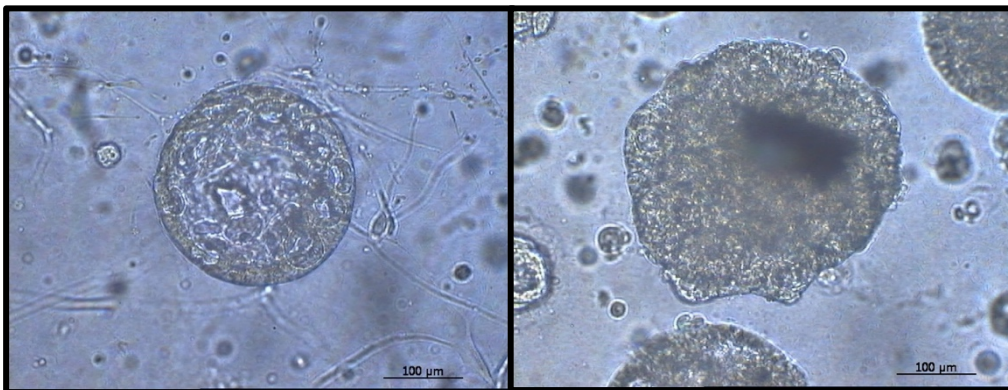


Abbildung 18 BC60 Morphologie

Die Organoidlinie BC60 wuchs sowohl mit cystischen als auch mit soliden Organoiden, wobei die schönen runden, cystischen Organoide in der Überzahl waren. Meist handelte es sich um runde Organoide mit einem zentralen cystischen Anteil; die cystischen Organoide konnten aber auch sehr denen der Linie BC43 ähneln. Daneben waren immer wieder solide Organoide zu finden. Ihre maximale Größe erreichten sie meist in der 2. oder 3. Woche, behielten danach Größe und Form bei. Sie konnten Größen von bis zu 200 µm erreichen.

Maßstabsbalken: 100 µm

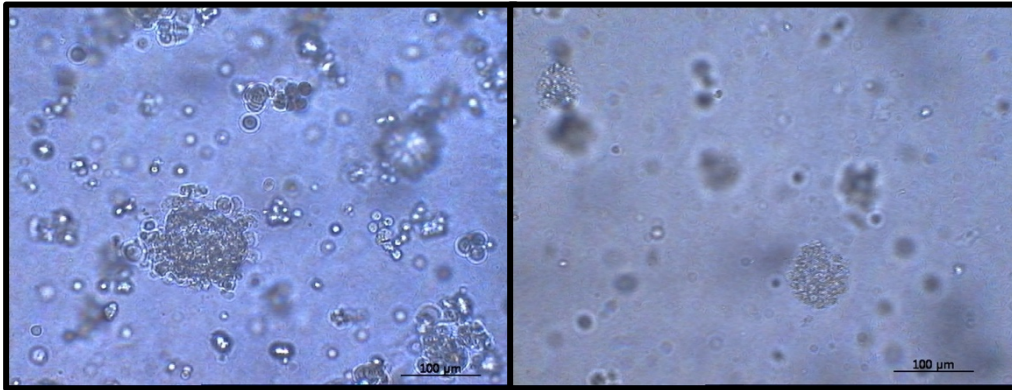


Abbildung 19 BC89 Morphologie

Aus den Zellen BC89 ließ sich keine Linie etablieren. Es ließ sich zu Beginn nach dem Auftauen und Aussäen der Zellen ein initiales Organoidwachstum vermuten (s. links), das jedoch schon nach der 1. Woche stagnierte. Eine Passage wurde durchgeführt, die jedoch nicht von Erfolg gekrönt war (s. rechts). Die Zellen organisierten sich hier maximal zu losen Verbänden und veränderten diese Konformität bereits nach dem 4. Tag nicht mehr.

Maßstabsbalken: 100 µm

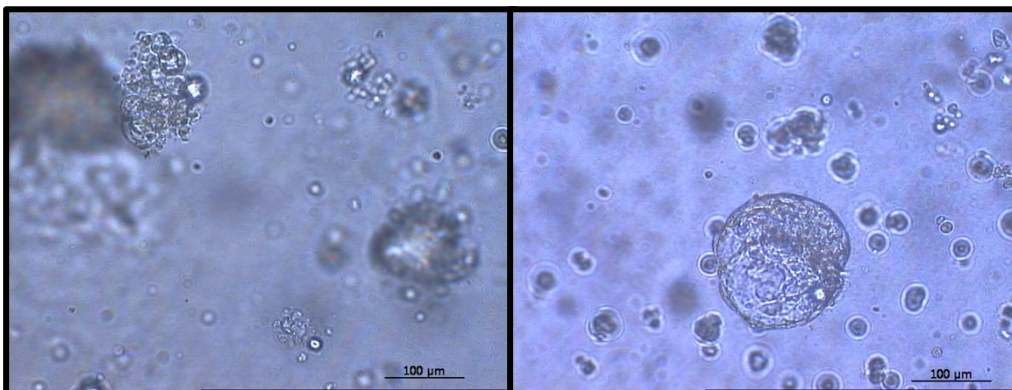


Abbildung 20 BC91 Morphologie

Auch BC91 etablierte keine Linie. Zunächst bildeten die Zellen BC91 ähnliche Zellverbände wie BC89 und konnten, im Gegensatz zur BC89, kleinere, heterogen cystisch-solide Organoiden von weniger als 100 µm ausbilden. Sie erreichten ihre maximale Größe in der ersten Woche und stagnierten danach. Größe und Form änderte sich nicht mehr. Die BC91 wurde noch ein weiteres Mal aus der Frauenklinik übernommen, jedoch wurde diese mangels ausreichenden Wachstums für eine erfolgreiche Passage verworfen.

Maßstabsbalken: 100 µm

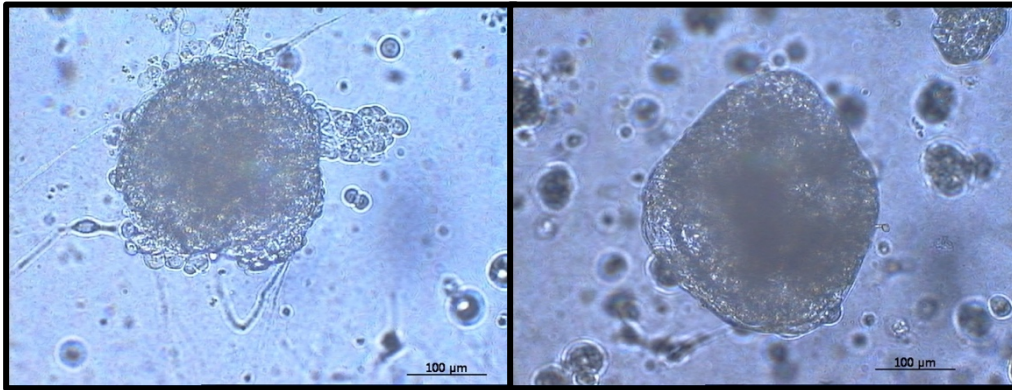


Abbildung 21 BC97 Morphologie

BC97 bildete eine gut wachsende Linie mit überwiegend soliden Organoiden mit einer Größe von maximal 200 µm. Sie erreichten ihre maximale Größe in der 2. Woche und blieben anschließend stabil. Häufig waren die Organoiden nicht glatt berandet und rund, sondern in der Form inhomogen. Viele Organoiden wirkten, als hätten sie Einzelzellen außen anhaften (vgl. linkes Bild). Maßstabsbalken: 100 µm

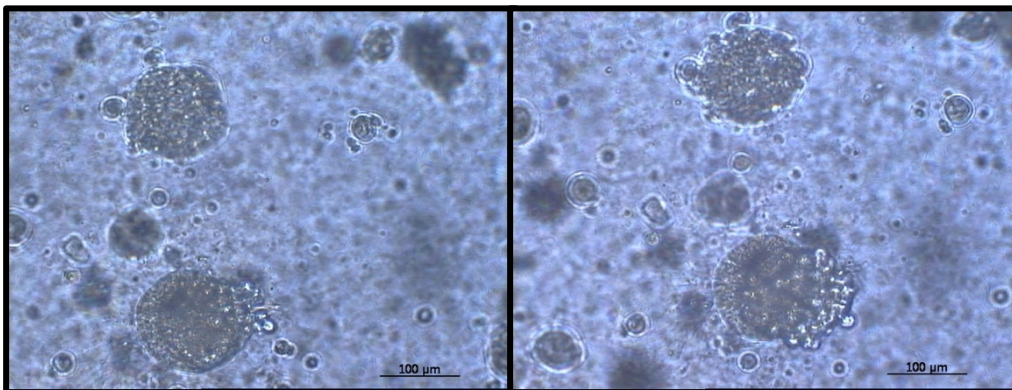


Abbildung 22 K7 Morphologie

Die Kontrolllinie K7 aus gesundem Gewebe bildete kleine, maximal 100 µm große Organoiden aus. Sie wuchs langsam und wurde nicht sehr groß. Die Organoiden bestanden überwiegend aus soliden Anteilen, wie bei der BC97 imponierte das Bild von „anhaftenden Zellen“ am Rand der Organoiden. Maßstabsbalken: 100 µm

III.1.2. Wachstum und Anzahl

Die verschiedenen Organoidlinien variierten in ihrem Wachstumsverhalten und in ihrer Größenzunahme. Es konnten bei jeder Linie nach einer Passage mehrere (> 10) Organoide pro *well* generiert werden. Diese erreichten je nach Linie in unterschiedlichen Zeiträumen durchschnittlich einen Durchmesser von ca. $150\ \mu\text{m}$. Die Linie BC13 konnte dabei sogar Organoide von einer Größe bis zu $500\ \mu\text{m}$ (Abbildung 23) ausbilden.

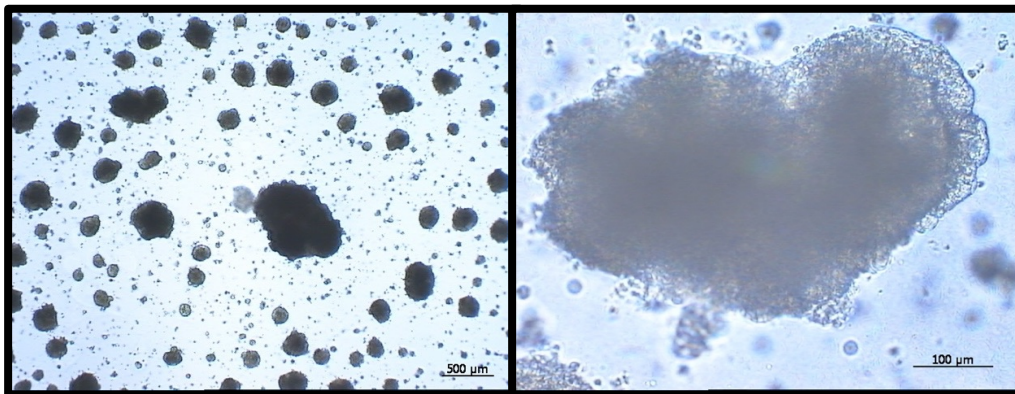


Abbildung 23 BC13 Beispiel für maximale Größe der Organoide

Maßstabsbalken: links $500\ \mu\text{m}$, rechts $100\ \mu\text{m}$

Eine Passage wurde i. d. R. bei einer Organoidgröße von min. $100\ \mu\text{m}$ durchgeführt, das Splitverhältnis war abhängig von der Größe und der Dichte der Organoide und gründete auf Erfahrungswerten. Bei den meisten Organoidlinien war ein erstes Wachstum aus Einzelzellen nach ca. 1 Woche erkennbar, die meisten Linien erreichten ihr Größenmaximum nach ca. 2 - 3 Wochen (Wachstumsverlauf Abbildung 24 - 27). Die wenigste Zeit benötigte die Linie BC13 zwischen zwei Passagen (i. d. R. eine Woche), während die Kontrolllinie K7 bis zu 6 Wochen zur nächsten Passage wachsen musste. Die Linie K7 erreichte auch nie dieselben Organoiddurchmesser wie die Linien BC13, BC60 und BC97. Zellen aus malignem Gewebe wie BC58, BC89 und BC91 bildeten zu Anfang auch nur kleine Organoide - wobei im Unterschied zu K7 aus diesen aber keine Linien gewonnen werden konnten.

Morphologisch unterschieden sich die Organoidlinien ebenfalls (Tabelle 18, sowie Abbildungen 15 - 22). Während die Linie BC13 überwiegend sehr solide Zellverbände bildete (Abbildung 15), wuchs beispielsweise die Linie BC60 mit deutlichen zystischen Anteilen

(Abbildung 18). Besonders auffallend waren Organoide der BC58, die sich morphologisch sehr divers präsentierten. Hier konnten sowohl solide, stark cystische wie auch diskohäsiv wachsende Organoide gefunden werden (Abbildung 17).

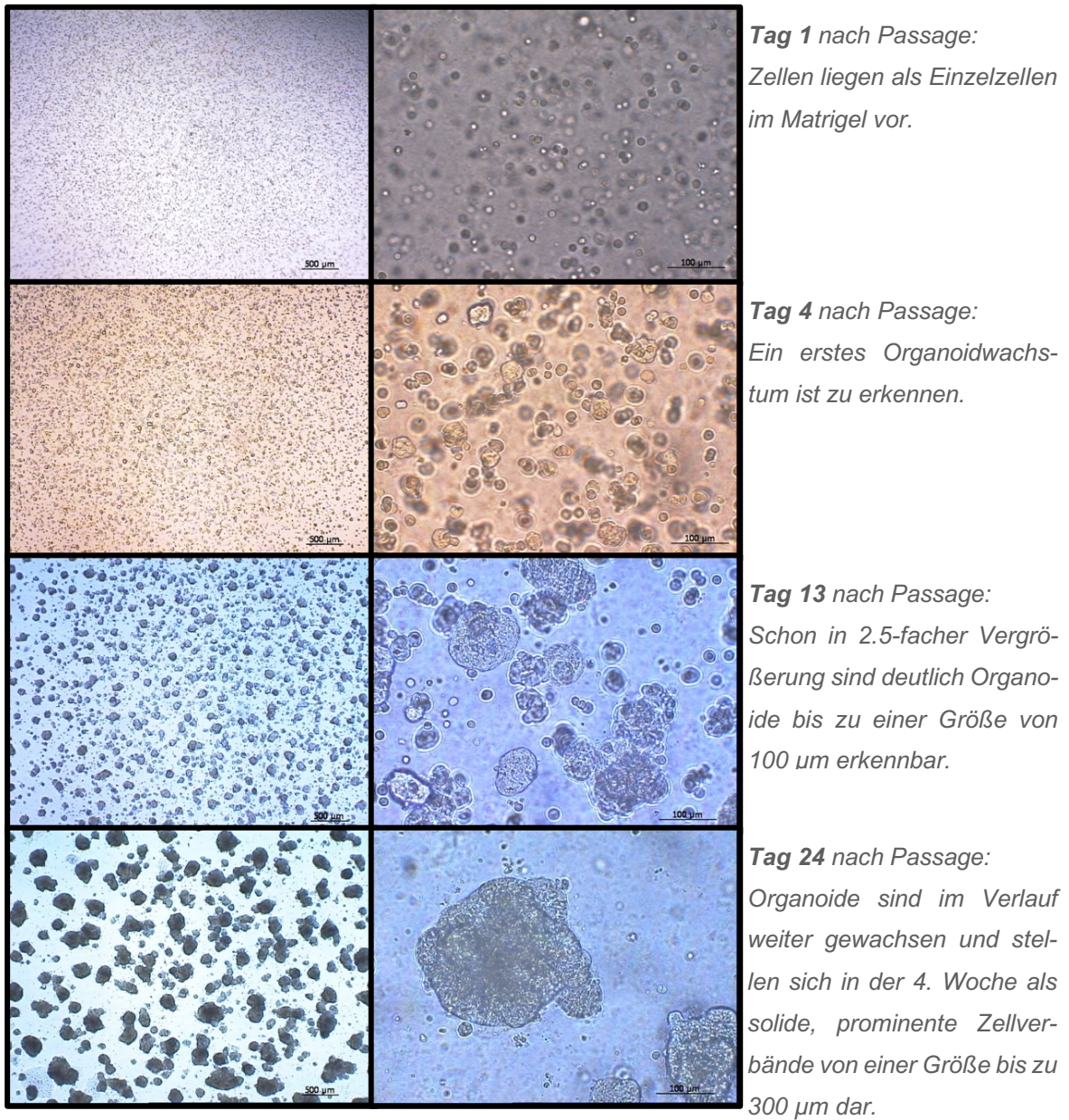
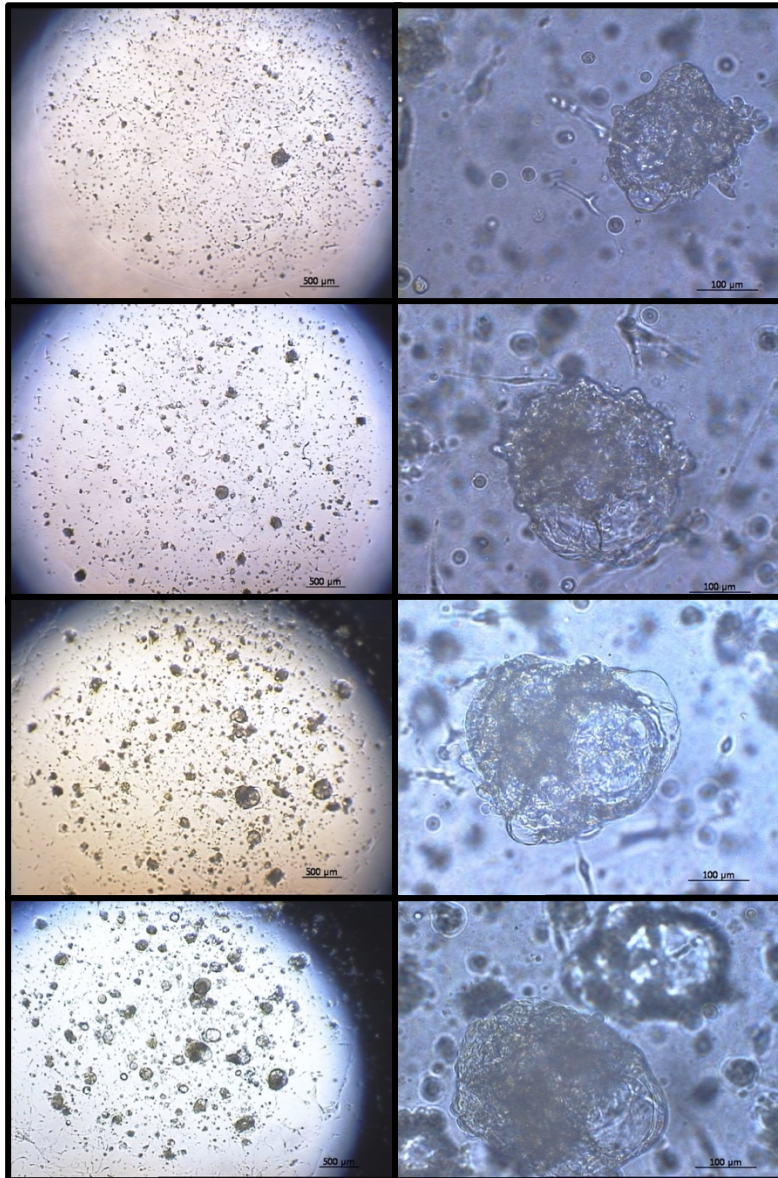


Abbildung 24 BC13 Wachstum im Verlauf

Maßstabsbalken: links 500 µm, rechts 100 µm



Tag 3 nach Passage:

Zellen liegen weitestgehend als Einzelzellen im Matrigel vor, vereinzelt lässt sich bereits ein Organoidwachstum erkennen.

Tag 11 nach Passage:

es bilden sich deutlich schon an mehreren Stellen Organoide.

Tag 22 nach Passage:

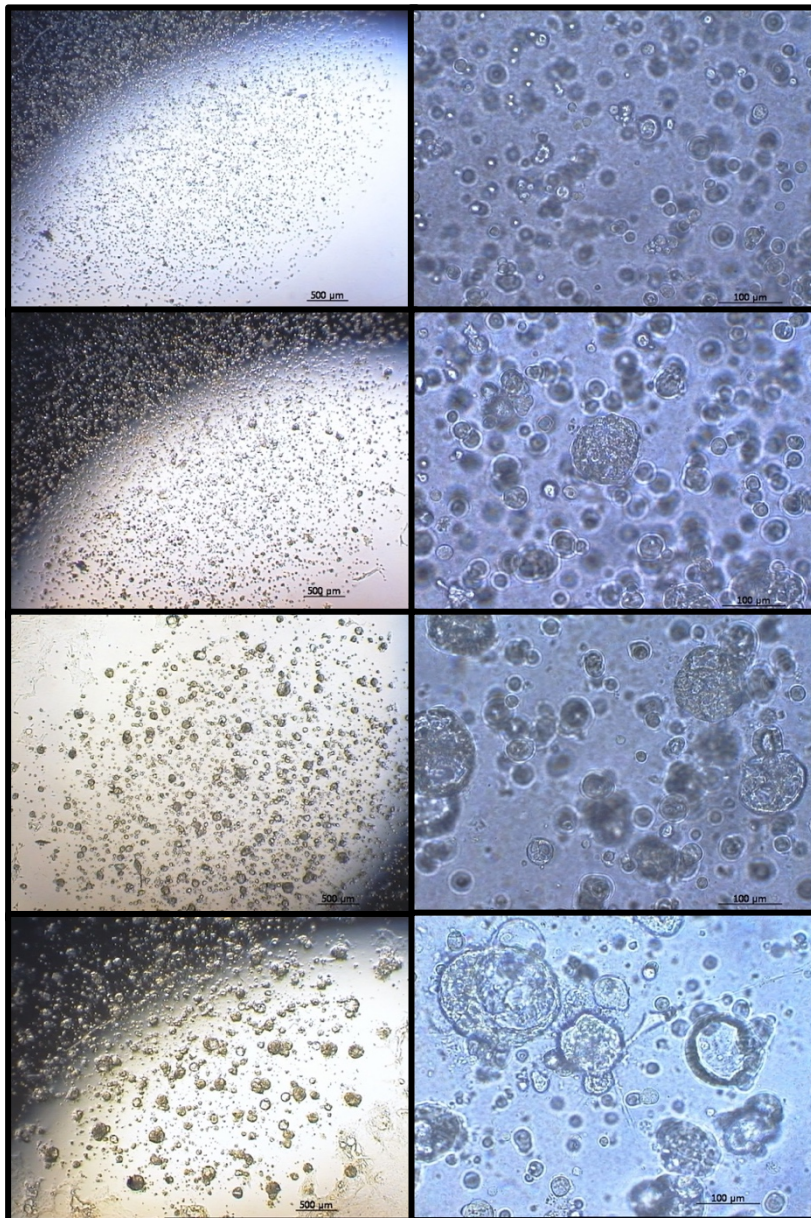
Die Organoide nehmen an Größe zu, schon in 2.5-facher Vergrößerung ist erkennbar, dass neben soliden auch cystische Anteile zu sehen sind.

Tag 35 nach Passage:

Organoide sind im Verlauf gewachsen, sowohl vollständig solide, als auch vollständig cystische Organoide, sowie Mischformen sind im Bild der 2.5-fachen Vergrößerung zu sehen.

Abbildung 25 BC43 Wachstum im Verlauf

Maßstabsbalken: links 500 µm, rechts 100 µm



Tag 1 nach Passage:

Zellen liegen weitestgehend als Einzelzellen im Matrigel vor.

Tag 5 nach Passage:

Ein erstes Organoidwachstum ist vereinzelt zu erkennen.

Tag 14 nach Passage:

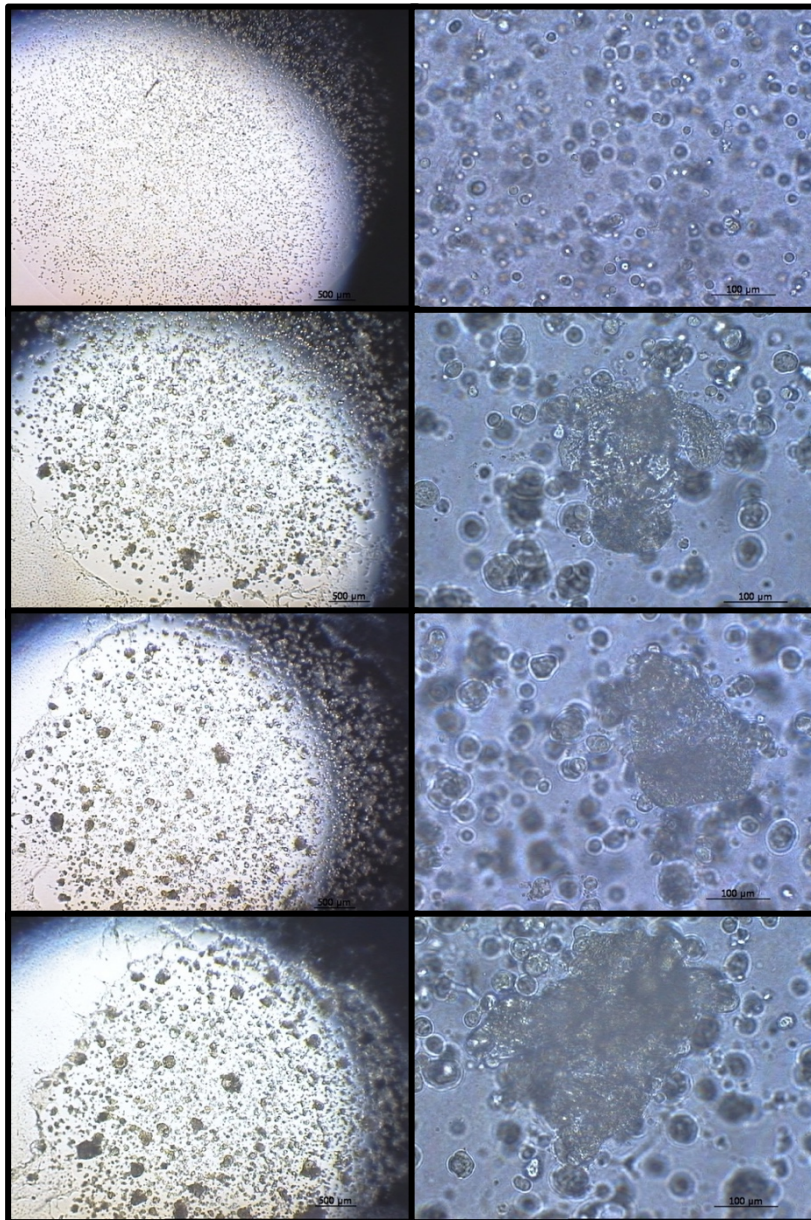
Die Organoiden sind deutlich gewachsen und besitzen schon eine Größe von bis zu 100 µm, schon hier ist ein cystisches Wachstum erkennbar.

Tag 22 nach Passage:

Organoiden sind im Verlauf weiter gewachsen und können über 100 µm groß sein. Sie sind prominent cystisch.

Abbildung 26 BC60 Wachstum im Verlauf

Maßstabsbalken: links 500 µm, rechts 100 µm



Tag 1 nach Passage:

Zellen liegen weitestgehend als Einzelzellen im Matrigel vor.

Tag 7 nach Passage:

Etwa ab der 2. Woche ist ein erstes Organoidwachstum zu erkennen.

Tag 12 nach Passage:

Vor allem in der Gesamtübersicht bei 2.5-facher Vergrößerung ist zu sehen, dass sich vermehrt Organoide bilden.

Tag 15 nach Passage:

Organoide wachsen weiter an mehreren Lokalisationen und nehmen Größen von bis zu 200 µm an.

Abbildung 27 BC97 Wachstum im Verlauf

Maßstabsbalken: links 500 µm, rechts 100 µm

Über den Zeitraum der Kultivierung wuchs die Organoidlinie K7 stets langsam und erreichte geringe Größen von < 100 µm, weshalb ein Wachstumsverlauf hier nicht abgebildet wurde.

III.1.3.Passagierung

Ein Erhalt der Organoidlinien BC13, BC43, BC60, BC97 und K7 war über mehrere Passagen möglich. Die Dauer des Wachstumszeitraums in Kultur schien dabei keinen wesentlichen Einfluss auf den Erfolg einer Passage zu haben. So konnte die Linie BC13 auch nach fünf Wochen in Kultur noch erfolgreich passagiert werden. Die Organoidlinien BC13 und BC60 sowie BC97 waren die am besten wachsenden Linien, die auch über Wochen in Kultur gehalten werden konnten. Auf die Fragestellung einer Korrelation zwischen Dauer des Kulturzeitraums zwischen zwei Passagen und der Effektivität des Organoidwachstums wurde an dieser Stelle nicht tiefer eingegangen, da die Linien BC13, BC43, BC60 und BC97 ohnehin sehr gut und zuverlässig zu kultivieren waren. Die Zellen BC58, BC89 und BC91, aus denen keine Linien gezogen werden konnten, hatten auch schon zu Beginn „Anlaufschwierigkeiten“, was sich auch mit längerer oder kürzerer Kulturdauer bis zur nächsten Passage nicht besserte.

Tendenziell konnte aber beobachtet werden, dass Organoidkulturen besser wuchsen, wenn die Einzelzellen dichter lagen - der wie in anderen Arbeiten beschriebene Richtwert von 20 000 Einzelzellen pro Matrigel-*dome* erwies sich als valide.

III.2. Medien

III.2.1.Übersicht

Es wurden für die Organoidkultur drei verschiedene Medien (BC Medium mit R-Spondin, BC Medium mit L-WRN-konditioniertem Medium mit und ohne FBS) hergestellt und verwendet. Alle drei sind im Abschnitt Methoden beschrieben.

Das R-Spondin-1 konditionierte Medium war bei - 80°C eingefroren und im Labor der AG Klein vorrätig. Es wurde von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe (cand. med. Leander Schwaibold, cand. med. Dominik Daub, MTA Christine Mayer, MTA Rita Kapoor) hergestellt. Die L-WRN-konditionierten Medien wurden selbst hergestellt.

III.2.2.Vergleich

Das Kulturmedium für die L-WRN-Zellen zur Konditionierung enthält üblicherweise FBS. FBS ist ein Bestandteil im Medium, dessen Zusammensetzung nicht genau zu definieren ist, was für die Auswertung bzw. Gestaltung von Versuchen problematisch sein kann.

Für eine spätere Verwendung humaner Organoide im menschlichen Organismus ist die Kultivierung in tierischem FBS ohnehin obsolet. Aus diesem Grund wurde neben dem üblichen FBS-haltigen Medium ein Ansatz mit FBS-freiem Medium für die L-WRN-Zellen verwendet und der Erfolg der Konditionierung an einer gut wachsenden Organoidlinie (in diesem Fall BC13) überprüft. Die BC13 wurde passagiert und nach der Passage je zwei *wells* mit dem BC Medium mit FBS-haltigem bzw. dem FBS-freiem L-WRN-konditionierten Medium und zum Vergleich R-Spondin-haltigem Medium in den Konzentrationen 10 % und 20 % kultiviert.

Das Wachstum der Organoide konnte so mit den unterschiedlichen Medien direkt verglichen werden.

Ansätze	10 % R-Spondin	20 % R-Spondin	FBS-haltiges L-WRN-Medium	FBS-freies L-WRN-Medium
----------------	-------------------	-------------------	------------------------------	----------------------------

In den *wells*, die mit R-Spondin und FBS-haltigem L-WRN-Medium kultiviert wurden, zeigte sich schon nach einigen Tagen eine Größenprogression, während im FBS-freien L-WRN-Medium kein Wachstum zu beobachten war (Abbildung 28). Der Ansatz mit und ohne FBS wurde mehrmals wiederholt, in einem der Fälle zeigte sich auch im FBS-freien Medium ein signifikantes Organoidwachstum - dies blieb aber ein Einzelfall und bestätigte sich in den anderen Versuchsansätzen nicht. Deshalb musste auf eine Kultivierung mit FBS-freiem L-WRN-Medium in weiteren Versuchen verzichtet werden.

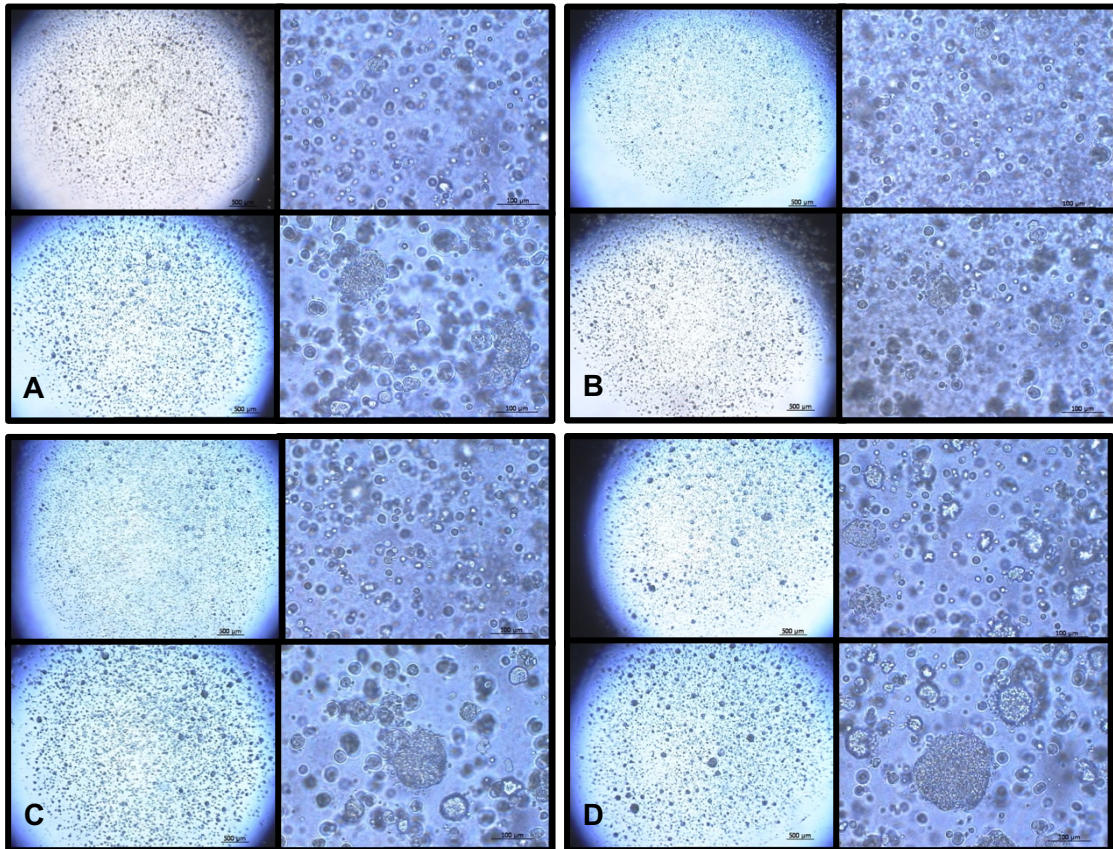


Abbildung 28 Medien-Vergleich anhand BC13

Oben je Tag 1 nach Passage, unten Tag 6 nach Passage

A 10 % R-Spondin

B 20 % R-Spondin

C L-WRN-Medium mit FBS

D L-WRN-Medium ohne FBS - Hier ist minimal ein Wachstum zu erkennen, was sich aber bei Wiederholung des Versuchs nicht reproduzieren ließ und damit als nicht repräsentativ gewertet wurde.

Maßstabsbalken: links 500 µm, rechts 100 µm

III.3. Molekularbiologische Expressionsstudien

III.3.1. RNA-Isolierung aus Organoiden

Die reverse Transkription mit anschließender PCR der Organoidlinien BC13, BC43, BC60 und BC97 wurde für die sechs membranständigen Matrix-Metalloproteasen -14, -15, -16, -17, -24 und -25 als Vertreter membranständiger Proteine, die vier TIMPs -1, -2, -3, -4 als Gegenspieler der MMPs und sämtliche Lamininketten als Vertreter der Extrazellulärmatrix durchgeführt.

Für die Reinheit der RNA wurde ein Wert von A260/280 ~ 2,0 und A260/230 < 1,8 angestrebt. Da die Organoide der Linien BC13, BC43, BC60 und BC97 i. d. R. groß und dicht wuchsen, war eine gute RNA-Konzentration bei entsprechender Reinheit durch die Aufreinigung zu erreichen (Tabelle 19). Für einen RT-PCR Durchlauf wurde 1 µg RNA benötigt.

Tabelle 18 Reinheiten und Konzentrationen der RNA der Organoidlinien

Zelllinie		BC13	BC43	BC60	BC97
RNA-Reinheit	A260/280	2.230	2.118	2.33	2.004
	A260/230	0.585	1.856	0.025	0.117
RNA-Konzentration		433 ng/µl	589.6 ng/µl	15.75 ng/µl	222.75 ng/µl

III.3.2. RT-PCR der verschiedenen Laminine

Für die verschiedenen Lamininketten (α 1 - 5, β 1 - 3, γ 1 - 3) wurde eine RT-PCR durchgeführt. In allen untersuchten Organoidlinien waren Banden für alle Laminin-Ketten außer für Laminin γ 3 zu detektieren. Bei der Linie BC13 waren die Laminine α 2 - 4 dabei nur schwach nachweisbar, bei der Linie BC97 war die Bande für Laminin α 3 weniger prominent als für die anderen Lamininketten-Typen (Übersicht Tabelle 19, Abbildungen 29 - 32).

Tabelle 19 Übersicht der Expressionsmuster der BC-Organoidlinien für Laminine

Untersucht wurden alle α -, β - und γ -Ketten der Laminine. Die untersuchten Organoidlinien zeigten ein Signal für alle Lamininketten, außer für Laminin γ 3. Laminin γ 3 war in keiner Organoidlinie nachweisbar. Das Signal der untersuchten Lamininketten war unterschiedlich stark. Die stärksten Signale zeigten sich bei Laminin α 1 sowie Laminin α 5, Laminin β 1 und -2 und Laminin γ 1 und -2. Unterschiedliche Signale zeigten sich bei der Untersuchung der Organoidlinien BC13 und BC97 für die Laminine α 2 - 4 (BC13) und Laminin α 3 (BC97).

+ Bande zu erkennen

++ deutliche Bande zu erkennen

- keine Bande zu erkennen

+/- bei mehreren Durchführungen schwankende, aber immer schwache Signale

Zell- linie	Laminin α 1	Laminin α 2	Laminin α 3	Laminin α 4	Laminin α 5	Laminin β 1	Laminin β 2	Laminin β 3	Laminin γ 1	Laminin γ 2	Laminin γ 3
BC13	++	+/-	+/-	+/-	++	++	++	+	++	++	-
BC43	++	+	++	+	++	++	++	+	++	++	-
BC60	++	+	++	+	+	++	++	+	++	++	-
BC97	++	++	+/-	++	++	++	++	+	++	++	-

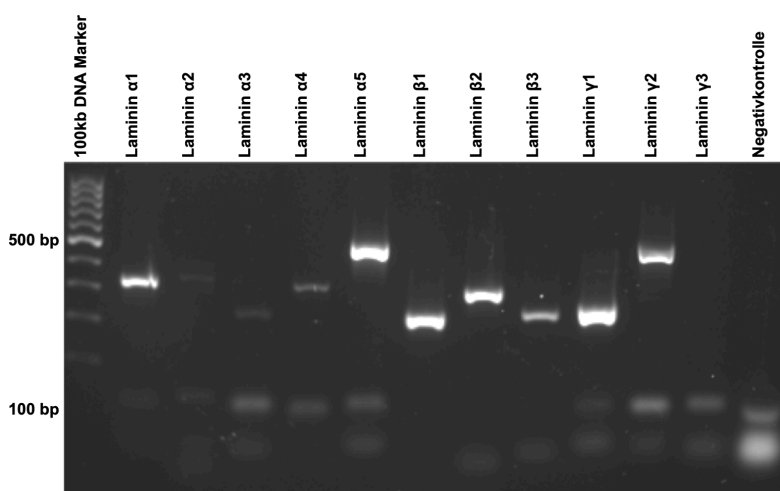


Abbildung 29 RT-PCR-Ergebnis Laminine (BC13)

Die Organoidlinie BC13 exprimierte bis auf Laminin α 2 und α 3 (sehr schwach eine Bande zu sehen) und γ 3 alle untersuchten Laminine. Für die Laminine α 1, α 5, β 1 und -2, sowie γ 1 und -2 ließen sich starke Banden darstellen, α 3 und 4, sowie β 3 waren schwächer ausgeprägt.

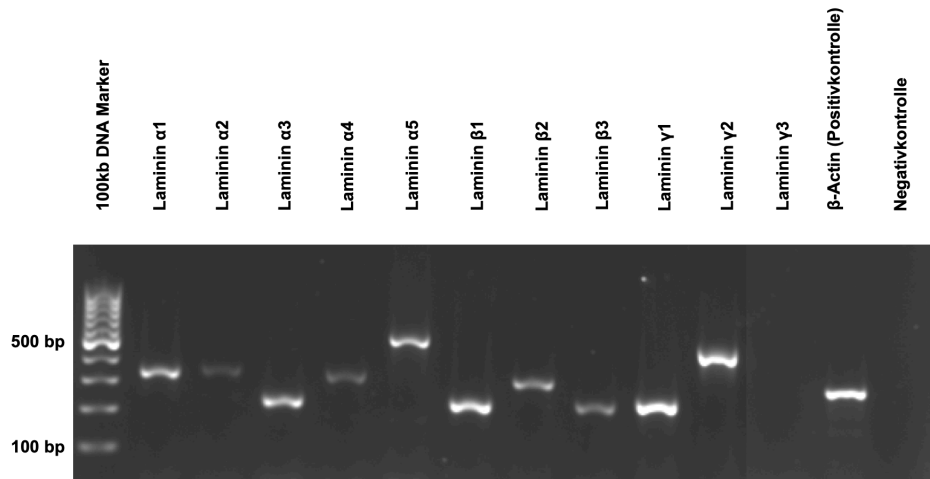


Abbildung 30 RT-PCR-Ergebnis Laminine (BC43)

Die Organoidlinie BC43 exprimiert bis auf Laminin $\gamma 3$ alle untersuchten Laminine. Bis auf Laminin $\alpha 2$ und $\alpha 4$ waren alle Banden stark ausgeprägt.

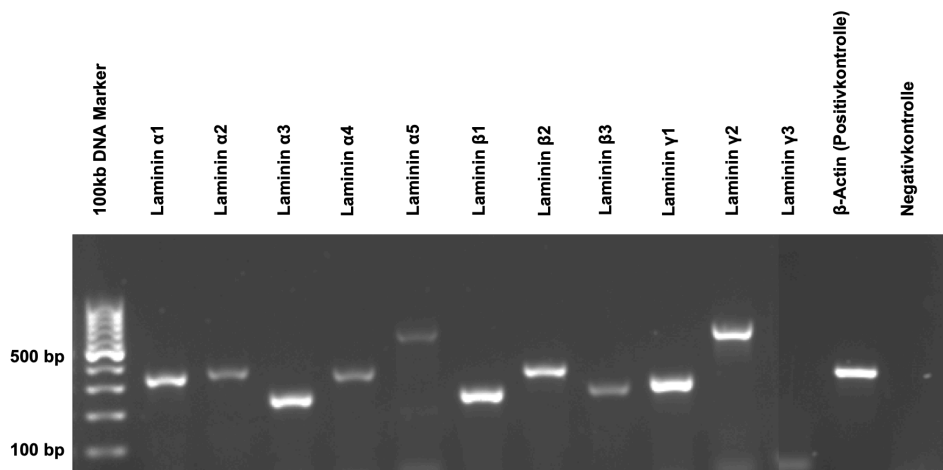


Abbildung 31 RT-PCR-Ergebnis Laminine (BC60)

Die Organoidlinie BC60 exprimiert bis auf Laminin $\gamma 3$ alle untersuchten Laminine. Laminin $\alpha 2$, $\alpha 4$ und $\alpha 5$ sowie $\beta 3$ hatten im Vergleich ein schwächeres Expressionsmuster als die anderen Laminine.

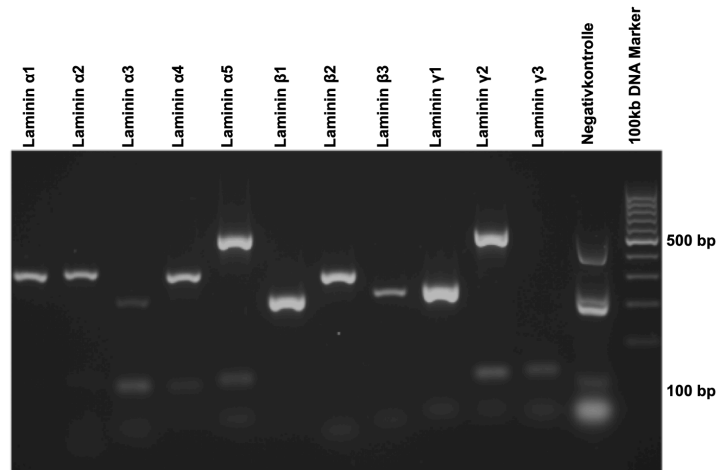


Abbildung 32 RT-PCR-Ergebnis Laminine (BC97)

Für die Organoidlinie BC97 ließen sich Banden für alle Laminine bis auf Laminin γ 3 nachweisen. Laminin α 3 wies nur eine schwache Bande auf, alle anderen Banden waren deutlich zu erkennen. Zu beachten ist jedoch, dass die Negativkontrolle auch ein Bandenmuster aufwies. Die Banden in der Negativkontrolle decken sich jedoch nicht mit den Banden der untersuchten Laminine.

III.3.3. RT-PCR-Analyse der verschiedenen Membranständigen Matrix-Metallproteasen (MT-MMPs)

Die RT-PCR-Analysen wurden auch für die membranständigen Matrix-Metalloproteasen -14, -15, -16, -17, -24 und -25 durchgeführt.

Signifikant war, dass für MMP-15 in allen untersuchten Organoidlinien ein deutliches Signal in der Gelelektrophorese nachweisbar war, MMP-16 und -25 waren in allen untersuchten Linien negativ (Übersicht Tabelle 20).

Ein deutliches Signal für MMP-17 war in den Linien BC43 und BC60 erkennbar, die Organoidlinien ohne Signal für MMP-17 waren BC13 und BC97 (Abbildung 33 und 36).

Nur eine Organoidlinie zeigte ein deutliches Signal für MMP-14 (Abbildung 35). Keine Signale waren bei den Organoidlinien BC13, BC43 und BC97 zu detektieren (Abbildung 33, 34, 36). Die Signale für MMP-24 waren durchgängig sehr schwach.

Tabelle 20 Übersicht der Expressionsmuster der BC-Organoidlinien für MT-MMPs

Die RT-PCR-Analysen wurden mehrmals durchgeführt. Alle BC-Organoidlinien waren für MMP-16 und MMP-25 negativ und für MMP-15 positiv. BC60 wies als einzige eine Bande für MMP-14 auf. BC43 und BC60 zeigten deutliche Banden für MMP-17, BC13 nur eine schwache Bande für MMP-17. MMP-24 bildete deutliche Banden bei BC13, BC60 und BC97, schwache bei BC43.

- + Bande zu erkennen
- ++ deutliche Bande zu erkennen
- keine Bande zu erkennen

Zelllinie	MMP-14	MMP-15	MMP-16	MMP-17	MMP-24	MMP-25
BC13	-	++	-	+	++	-
BC43	-	++	-	++	+	-
BC60	+	+	-	++	++	-
BC97	-	++	-	-	++	-

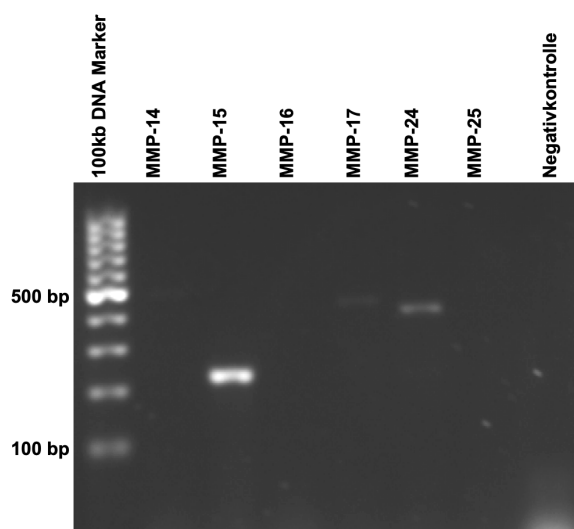


Abbildung 33 RT-PCR-Ergebnis membranständige Matrix-Metalloproteasen (BC13)

Die Organoidlinie BC13 wies Banden für die membranständigen MMPs -15 und -24 auf. Die Intensität der Banden ist für MMP15 am stärksten. Für MMP-14, -16, -17 und -25 ließ sich keine Bande darstellen.

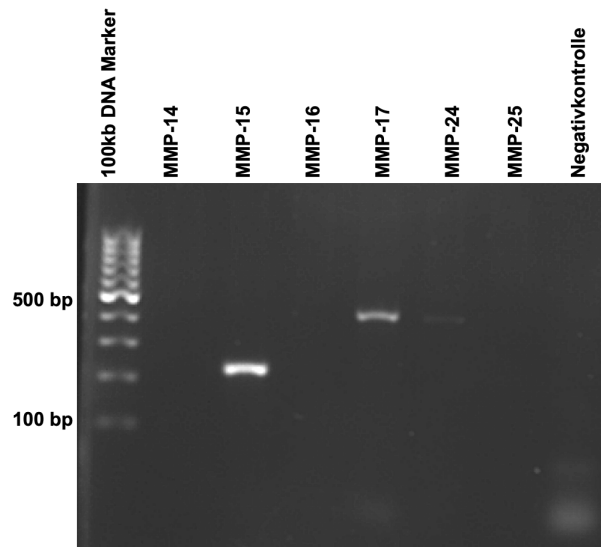


Abbildung 34 RT-PCR-Ergebnis membranständige Matrix-Metalloproteasen (BC43)

Die Organoidlinie BC43 war für die drei MMPs -15, -17 und -24 positiv. Die Bande für MMP-24 war nur sehr schwach ausgeprägt und in Farbumkehr besser zu erkennen. MMP-15 und -17 ähnelten sich in ihrer Bandenintensität.

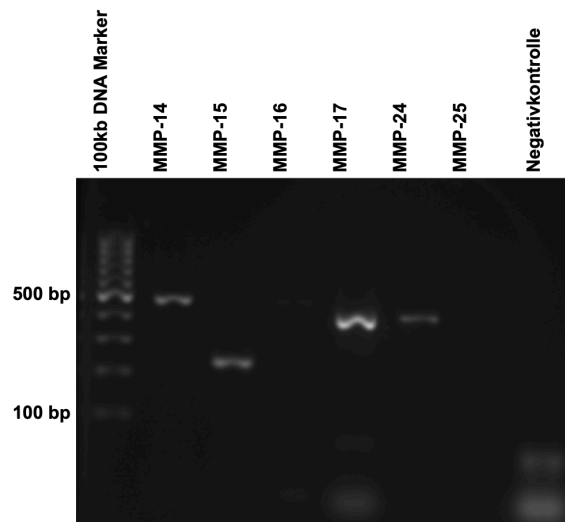


Abbildung 35 PCR-Ergebnis membranständige Matrix-Metalloproteasen (BC60)

Die Organoidlinie BC60 zeigte in der Gelelektrophorese Banden bei MMP-14, -15, -17 und -24, wobei die Bande für MMP-17 am stärksten darstellbar war. Für MMP-16 und MMP-25 zeigten sich keine Banden.

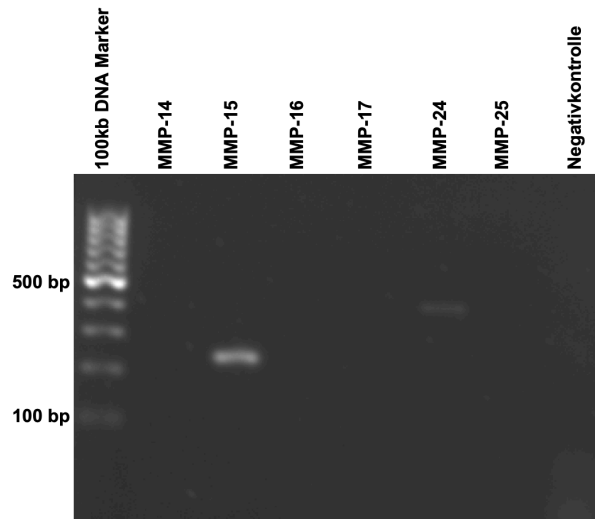


Abbildung 36 PCR-Ergebnis membranständige Matrix-Metalloproteasen (BC97)

Organoide der Linie BC97 waren positiv für MMP-15 und MMP-24, wobei auch hier das Signal für MMP-24 sehr schwach war. Die anderen membranständigen Matrix-Metalloproteasen MMP-14, -16, -17 und -25 zeigten keine Bande.

III.3.4. RT-PCR-Analyse der verschiedenen Tissue Inhibitors of Metalloproteinasen (TIMPs)

Auch für die Inhibitoren der Metalloproteinasen, die TIMPs, wurde eine RT-PCR-Analyse durchgeführt und mehrmals wiederholt. TIMP-2 und TIMP-3 waren bei allen Organoidlinien positiv, für TIMP-1 und TIMP-4 waren die Ergebnisse unterschiedlich (Übersicht s. Tabelle 21). TIMP-4 zeigte bei allen Organoidlinien schwache Banden außer bei BC97, wo sich keine Bande für TIMP-4 nachweisen ließ (Abbildung 40). TIMP-1 war ebenfalls bei allen Linien positiv, die Banden bei BC43 und BC60 (Abbildung 38 + 39) waren aber nur schwach darstellbar. BC13 und BC43 waren für alle TIMPs positiv (Abbildung 37).

Tabelle 21 Übersicht der Expressionsmuster der BC-Organoidlinien für TIMPs

Alle BC-Organoidlinien exprimierten TIMP-2 und TIMP-3. Für TIMP-1 waren bei BC13 und BC97 deutlich Banden zu erkennen, BC43 und BC60 wiesen nur schwache Banden auf. BC13, BC43 und BC60 zeigten ebenfalls schwache Banden für TIMP-4, BC97 war für TIMP-4 negativ.

+ Bande zu erkennen

++ deutliche Bande zu erkennen

- keine Bande zu erkennen

+/- bei mehreren Durchführungen schwankende, aber immer schwache Signale

Zelllinie **TIMP-1** **TIMP-2** **TIMP-3** **TIMP-4**

BC13	++	++	++	+
BC43	+	++	++	+
BC60	+/-	++	++	+/-
BC97	+	++	++	-

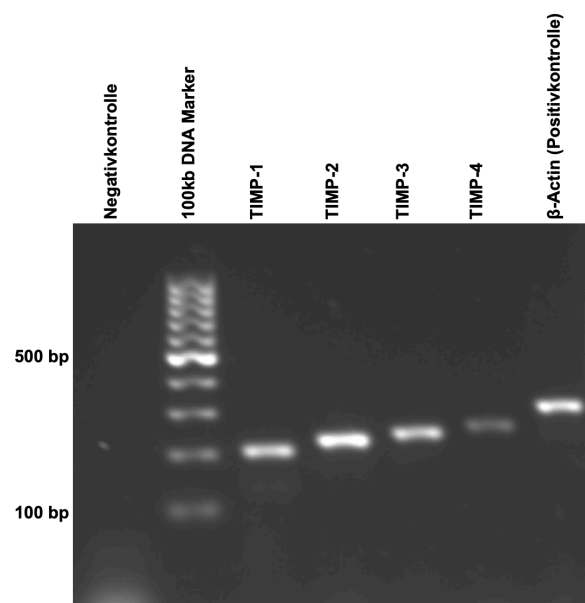


Abbildung 37 PCR-Ergebnis TIMPs (BC13)

Organoide der Linie BC13 zeigten ein positives Bandenmuster für alle TIMPs (1-4).

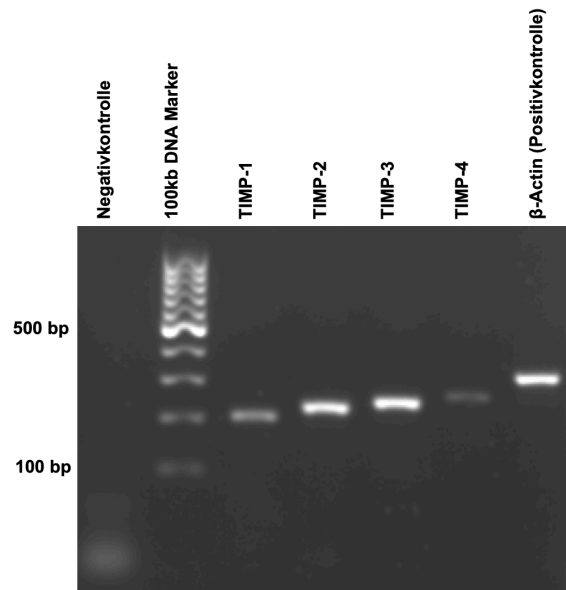


Abbildung 38 PCR-Ergebnis TIMPs (BC43)

Die Organoidlinie BC43 wies ein deutliches Signal für TIMP-1, -2 und -3 auf, für TIMP-4 war das Signal nur schwach ausgeprägt.

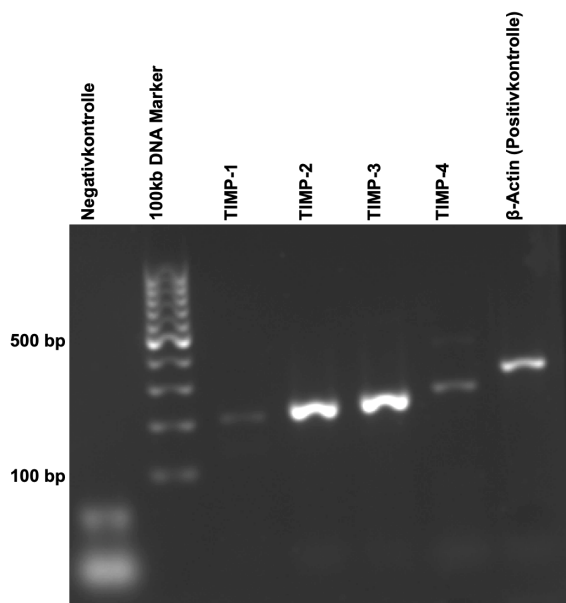


Abbildung 39 PCR-Ergebnis TIMPs (BC60)

Organotide der Linie BC60 waren wie die der BC43 für TIMP-2 und -3 deutlich positiv. TIMP-1 und -4 zeigten dabei wieder sehr schwache, TIMP-2 und -3 starke Banden.

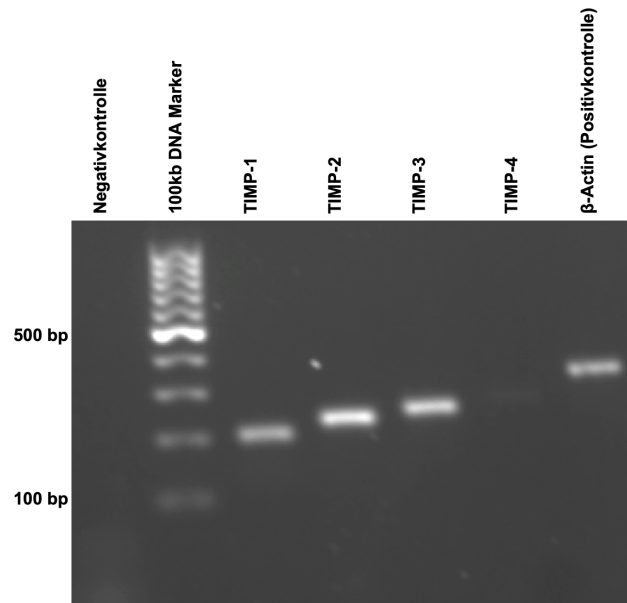


Abbildung 40 PCR-Ergebnis TIMPs (BC97)

Organoide der Linie BC97 wiesen in der Gelelektrophorese Banden für TIMP-1, -2 und -3 auf, nicht aber bei TIMP-4.

III.4. Immunfluoreszenz-Markierung humaner Mamma-Ca-Organoide

Vergleichend und weiterführend zur zuvor beschriebenen RT-PCR-Analyse der Organoidlinien wurden zur Aufschlüsselung des Aufbaus der Mamma-Ca-Organoide sowie der Expression bestimmter Proteine der Extrazellulärmatrix, des Zytoskeletts und der membranständigen Matrix-Metalloproteasen Immunfluoreszenzfärbungen mithilfe verschiedener Methoden angefertigt. Die Methoden unterschieden sich in ihrer Dimensionalität und Praktikabilität, aber auch in ihrer Aussagekraft.

Gefärbt wurden sowohl die Organoidlinien, die in den vorausgegangenen Abschnitten erläutert wurden, als auch in Paraffin eingebettete Schnitte von Organoidlinien, die freundlicherweise aus der Frauenklinik AG Koch übernommen werden konnten (Übersicht Tabelle 22).

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden Antikörper gegen Cytokeratin 5 und 8 als Marker für basale und lumenale Zellen, Antikörper gegen Laminine und Perlecan als Vertreter der ECM, sowie Antikörper gegen membranständige Proteine (Integrine und MT-MMPs) verwendet als auch gegen TIMPs als Gegenspieler zu den MMPs. Zur Markierung des Zellkerns wurde stets DAPI eingesetzt.

Tabelle 22 Übersicht der durchgeführten Immunfluoreszenzmethoden für verschiedene Organoidlinien

Die mit einem „+“ gekennzeichneten Organoide wurden in der entsprechenden Methode angefärbt, die mit „/“ gekennzeichneten Organoide wurden in der Methode nicht verwendet. Die Linien BC101, 109, 117, 125 und 173 lagen als Paraffinschnitte vor und wurden aus der Frauenklinik übernommen. Die Färbungen der Linien BC13, 43, 60, 97 und K7 entstammen den zuvor kultivierten Proben.

+ Färbung durchgeführt

/ keine Färbung durchgeführt

Zelllinie	2D-Färbungen		3D-Färbungen	
	Kryostat-schnitte	Paraffin-schnitte	Chamber-slides	Laser-Scan-Mikroskop
BC13	+	/	+	+
BC43	+	/	+	/
BC60	+	/	+	+
BC97	+	/	/	+
K7	/	+	/	/
BC101	/	+	/	/
BC109	/	+	/	/
BC117	/	+	/	/
BC125	/	+	/	/
BC173	/	+	/	/

III.4.1. Kryostatschnitte

III.4.1.1. Verwendung von Histogel

Die Methodik der Immunfluoreszenzmarkierung von Kryostatschnitten von Mamma-Ca-Organoiden folgte einem ursprünglich vorhandenen Protokoll in der AG Klein unter Verwendung von Histogel und ist im Abschnitt Methoden ausführlich beschrieben. Es zeigte sich in der Durchführung die Problematik, dass sich auch in den Negativkontrollen immer ein unspezifisches Signal erkennen ließ (Abbildung 42).

Nach längerer Ursachensuche in Zusammenarbeit mit der AG Koch stellte sich heraus, dass die Einbettung der Organoide in Histogel mit TissueTek® wohl die Markierung mit

Zweitantikörpern negativ beeinflusste, sodass diese unspezifisch an Strukturen banden und sich keine zufriedenstellende spezifische Markierung erreichen ließ. Im direkten Vergleich zwischen Paraffinschnitten mit Histogel und Kryostatschnitten mit Histogel zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Qualität der Färbung (Abbildung 41 + 42). Danach wurde eine Methode für Kryostatschnitte ohne Histogel optimiert. Es zeigte sich, dass ohne Histogel eine gute Immunfluoreszenzmarkierung möglich war, sofern sich die Antikörper für die Fluoreszenzmethodik eigneten.

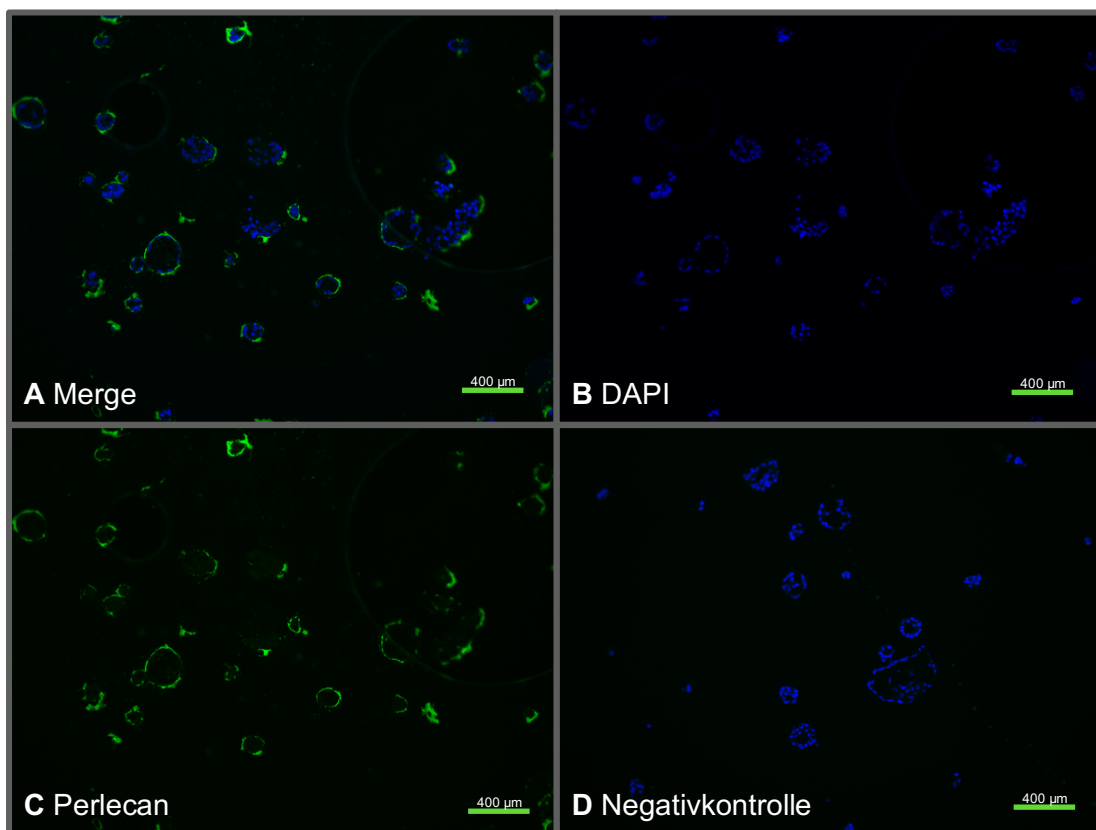


Abbildung 41 IFL BC117, Paraffinschnitt mit Histogel, Färbung mit DAPI und Perlecan

- A Merge - Man erkennt die blau angefärbten Zellkerne und eine die Organoide rundum umgebende Basalmembran, die durch die Basalmembrankomponente Perlecan repräsentiert wird.
- B DAPI-Färbung der Zellkerne
- C Perlecan (Alexa488) - Anfärbung der Basalmembran durch Antikörper gegen den Basalmembranbestandteil Perlecan
- D Negativkontrolle ohne Erstantikörper, nur mit DAPI zur besseren Lokalisation der Organoide

Maßstabsbalken: 400 µm

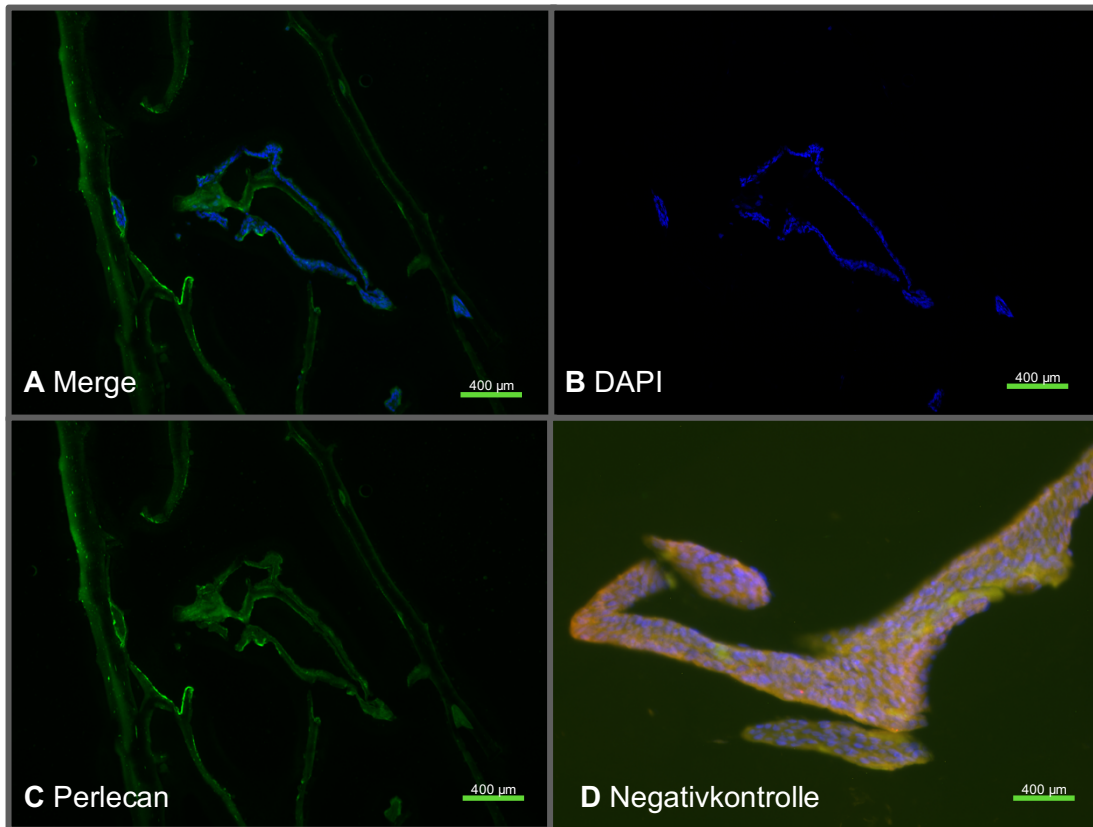


Abbildung 42 IFL BC13, Kryostatschnitte mit Histogel, Färbung mit DAPI und Perlecan

- A Merge - Schon hier ist eine deutliche unspezifische Färbung von Strukturen außerhalb des Organoids in Alexa488 (grün) erkennbar.
- B DAPI-Färbung der Zellkerne
- C Perlecan (Alexa488) - Einzeldarstellung der spezifischen und unspezifischen Färbung in Alexa488
- D Negativkontrolle - deutliches Signal von Fluorochrom-gekoppelten Zweitantikörpern, die unspezifisch binden und DAPI

Maßstabsbalken: 400 µm

III.4.1.2. 2D-Markierungen von Organoid-Strukturen

Die Organoidlinien BC13, 43, 60 und 97 wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten und in unterschiedlichen Stadien für Kryostatschnitte konserviert, am Mikrotom geschnitten und auf Objektträger fixiert. Es wurde versucht, eine gute Organoiddichte auf den Objektträgern zu erreichen, indem in Kultur ausreichend expandiert und zur Fixierung

gepoolt wurde. Dementsprechend befanden sich auf jedem Objektträger mehrere Organoide zum Vergleich. Je nach Linie waren diese unterschiedlich groß.

Gefärbt wurden sie mit Antikörpern gegen CK5, CK8, Perlecan, Laminin α 4 und -5, Integrin β 1, Integrin α 3, Integrin α 7, MMP-14, -15, -16, -17, -25, TIMP-1, -2, -3. Im Folgenden sind repräsentative Bilder der Färbungen abgebildet.

Die meisten Färbungen zielten auf eine Aufschlüsselung des biologischen Aufbaus der Organoide ab. Proteine wie Perlecan, Cytokeratine, Integrine und Laminine, die in Epithelien spezifische Funktionen als Bestandteile der Basalmembran, des Zytoskeletts oder zur Zell-Zell-Adhäsion erfüllen, können durch ihre Lokalisation ein gutes Bild über den Aufbau von Organoiden darbieten.

Die Färbung mit Perlecan-Antikörpern machte deutlich, dass die Organoide unabhängig von ihrer Größe mit einer Basalmembran umgeben sind. Perlecan als obligatorischer Bestandteil der Basalmembran ist hierfür ein guter Marker und war zuverlässig für die Färbungen anwendbar (Abbildung 43 + 44; Beispiele für BC13 und BC60).

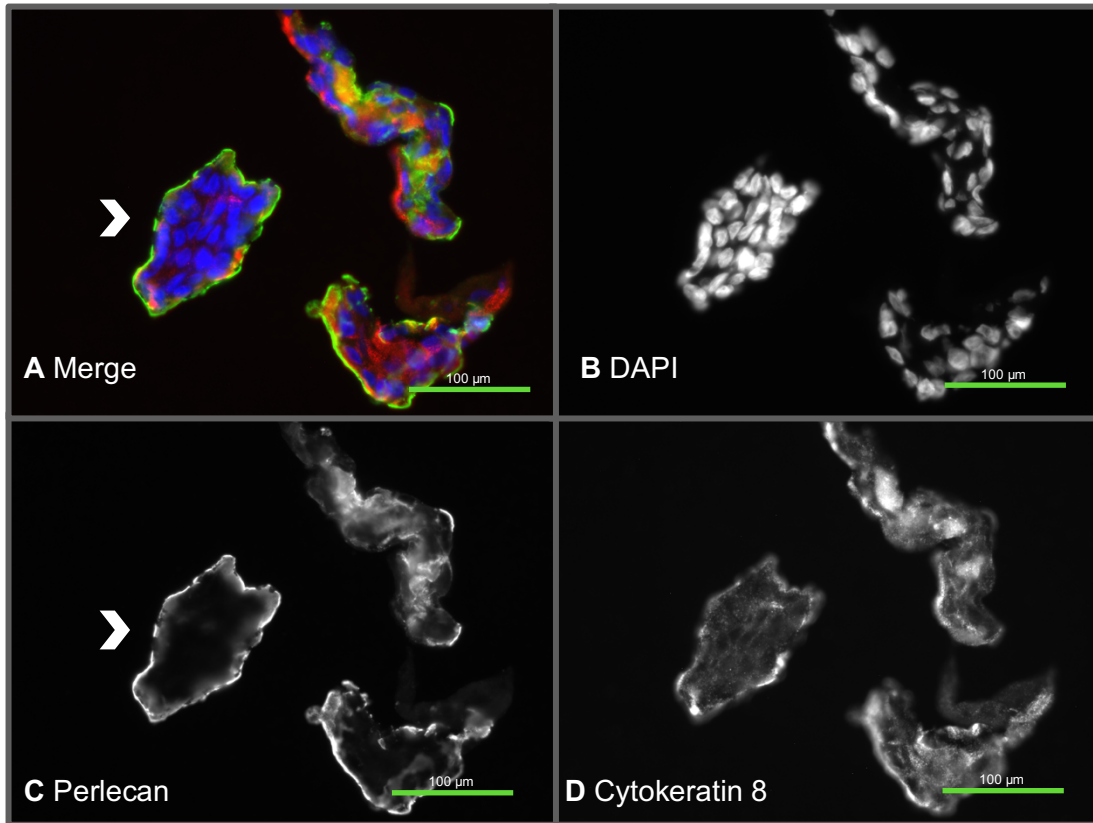


Abbildung 43 IFL BC13 mit DAPI, Perlecan und Cytokeratin 8

- A Merge von Perlecan, CK8, DAPI – Die Perlecan-Färbung (grün) umgibt das mit einem Pfeil markierte Organoid rundum im Sinne einer Basalmembran. Cytokeratin 8 (rot) ist in diesem Organoid v. a. randbetont anfärbbar. DAPI (blau) markiert die Zellkerne.
- B DAPI-Färbung der Zellkerne
- C Perlecan (Alexa488) – Die Einzeldarstellung zeigt, dass Perlecan sich tatsächlich um das Organoid anfärben lässt und im Inneren kaum darstellbar ist.
- D Cytokeratin 8 (Cy3) als Marker luminaler Zellen
- Maßstabsbalken: 100 µm

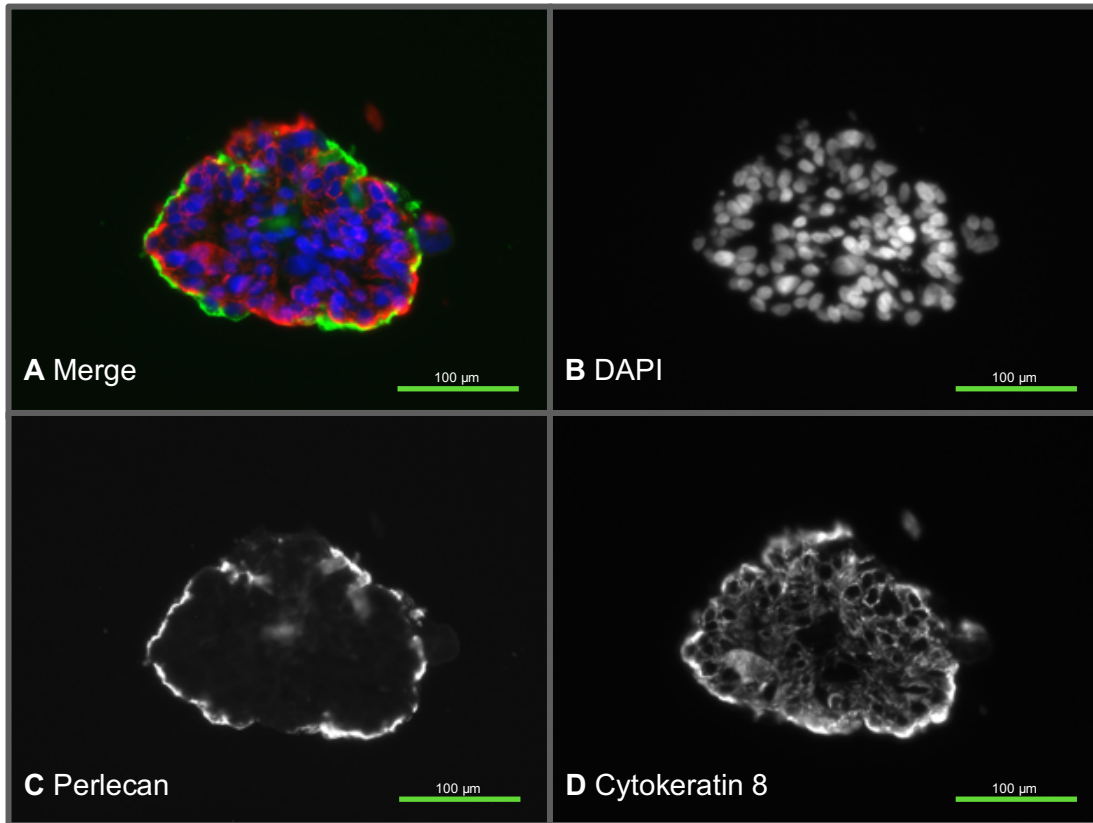


Abbildung 44 IFL BC60 mit DAPI, Perlecan und Cytokeratin 8

- A Merges von Perlecan, CK8, DAPI - Wie in Abbildung 43 (BC13) umgibt auch hier die Färbung für Perlecan (grün) das Organoid rundum. Dieses Organoid ist für CK8 (rot) bis auf einen zentral ausgesparten Anteil vollständig positiv. DAPI (blau) markiert die Zellkerne.
- B DAPI-Färbung der Zellkerne
- C Perlecan (Alexa488) - Auch hier sieht man die fast durchgängige Umrandung des Organoids mit der Färbung für Perlecan. Diese Färbung ist im Inneren des Organoids kaum zu finden.
- D Cytokeratin 8 (Cy3) - CK8 verteilt sich hier über das gesamte Organoid. Nur zentral ist eine Aussparung zu vermuten. Da in der DAPI-Färbung Zellkerne zentral zu sehen sind, handelt es sich hier nicht um einen cystischen Hohlraum, sondern um CK8-negative Zellen.

Maßstabsbalken: 100 µm

Schon in diesen Abbildungen, in denen auch mit Antikörpern gegen Cytokeratin 8 gefärbt wurde, war zu sehen, dass CK8 nicht homogen über das gesamte Organoid anfärbbar war. In Doppelfärbungen mit den Cytokeratinen CK5 und CK8 ließ sich eindrücklich darstellen, dass in Organoiden eine klare Trennung zwischen luminalen (CK8) und basalen (CK5) Zellen zu bestehen scheint. Die Signale für beide Cytokeratine waren räumlich

deutlich getrennt, was sich in verschiedenen Organoidlinien reproduzieren ließ (Abbildung 45 + 46). Cytokeratin 5 ist als Marker für basale Zellen von Parenchym wie dem Brustgewebe verwendbar, während Cytokeratin 8 v. a. in luminalen Zellen nachweisbar ist.

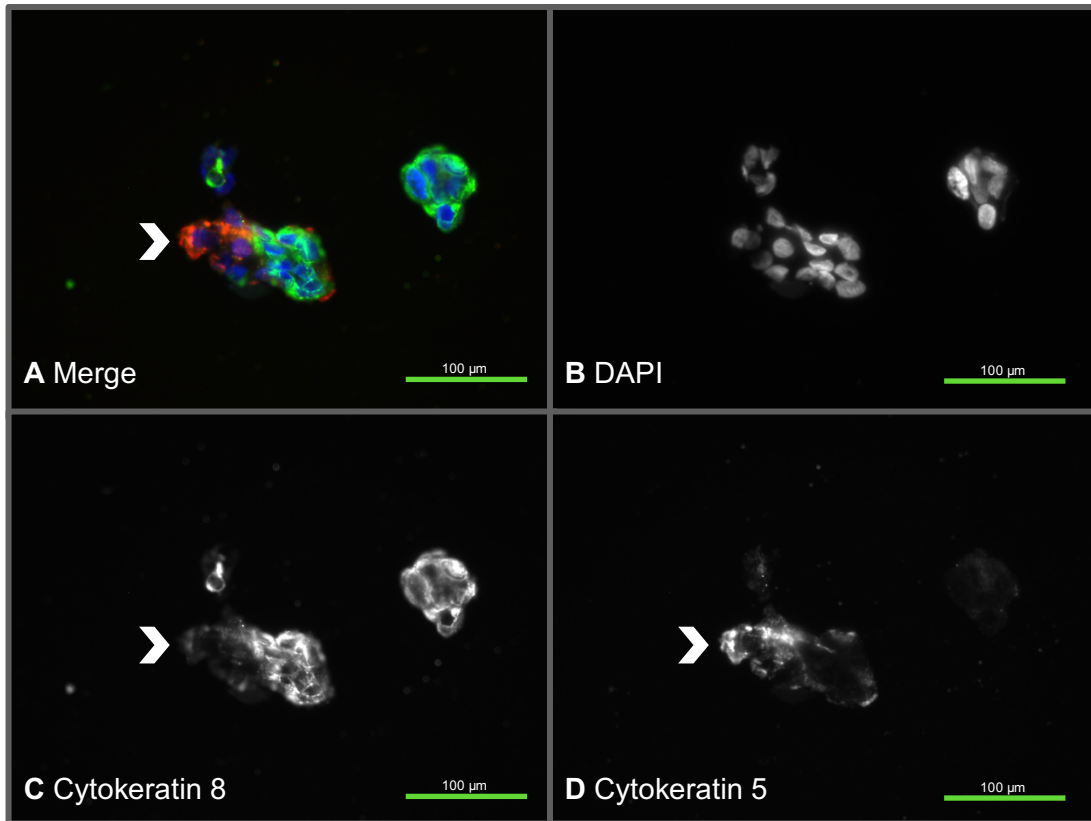


Abbildung 45 IFL BC13 mit DAPI, Cytokeratin 5 und Cytokeratin 8

- A Merge von CK5, CK8, DAPI - Zu sehen ist eine deutliche Aufteilung des Organoids (mit Pfeil markiert) in CK5-positive (rot) und CK8-positive (grün) Zellen. DAPI (blau) markiert die Zellkerne.
- B DAPI-Färbung der Zellkerne
- C Cytokeratin 8 (Alexa488) - Auch in der Einzeldarstellung ist die selektive Expression von Cytokeratinen zu sehen.
- D Cytokeratin 5 (Cy3) als Marker basaler Zellen
- Maßstabsbalken: 100 µm

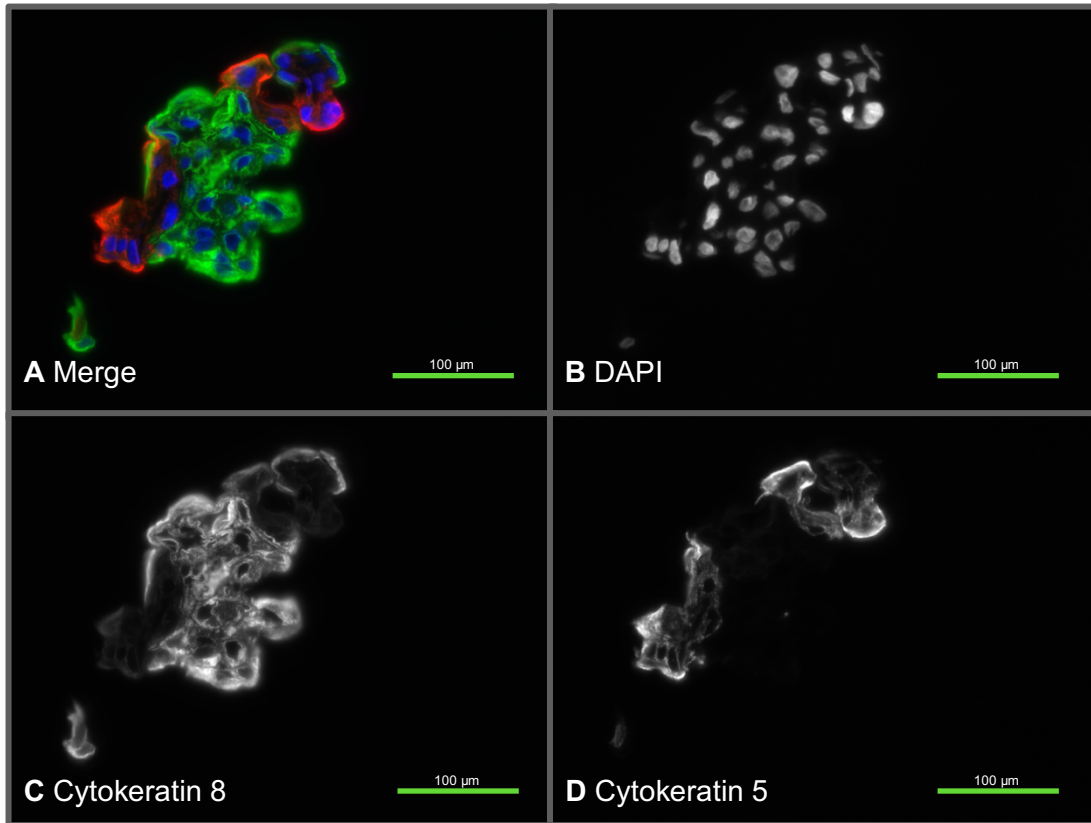


Abbildung 46 IFL BC60 mit DAPI, Cytokeratin 5 und Cytokeratin 8

- A Merg von CK5, CK8, DAPI - Zu sehen ist eine deutliche Aufteilung des Organoids in CK5-positive (rot) und CK8-positive (grün) Zellen. DAPI (blau) markiert die Zellkerne.
- B DAPI-Färbung von Zellkernen
- C Cytokeratin 8 (Alexa488) - Auch in der Einzeldarstellung ist die selektive Expression von Cytokeratinen zu sehen.
- D Cytokeratin 5 (Cy3) als Marker für basale Zellen
- Maßstabsbalken: 100 µm

Zum Teil fanden sich in den Cytokeratinfärbungen auch Organoide, die vollständig positiv für eines der beiden Cytokeratine war - was aber auch an der angeschnittenen Ebene des Organoids liegen konnte und damit keine Aussagekraft für das gesamte Organoid hat (Abbildung 45).

Ein weiterer obligatorischer Bestandteil auf Zellmembranen sind die Integrine. Integrine kommen als Adhäsionsmoleküle sowohl zwischen Zellen und Proteinen der Extrazellulärmatrix, als auch zwischen zwei Zellen vor (Takada et al., 2007). Eine Anfärbung von Integrin $\beta 1$ in Kombination mit Perlecan, wieder als Marker für die Basalmembran, zeigte

eine gleichmäßige Verteilung von Integrin $\beta 1$ über das gesamte Organoid, sowohl interzellulär zwischen einzelnen Zellen als auch überlappend mit der dargestellten Basalmembran (Abbildung 47 + 48).

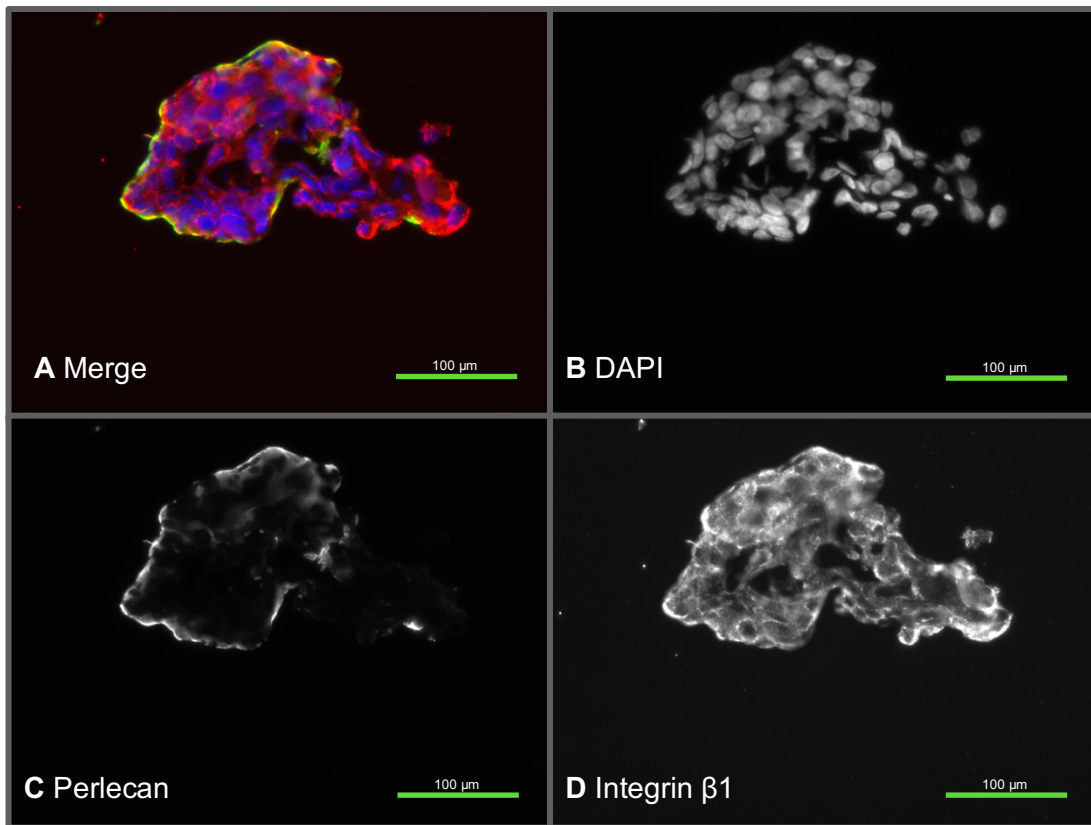


Abbildung 47 IFL BC13 mit DAPI, Perlecan und Integrin $\beta 1$

- A Merge von Perlecan, Integrin $\beta 1$, DAPI – Perlecan (grün) umgibt wieder das Organoid am Rande, wobei sich hier im rechten Bereich des Organoids eine Unterbrechung der Färbung zeigt. Integrin $\beta 1$ (rot) ist in allen zellhaltigen Bereichen des Organoids zu finden. DAPI (blau) markiert die Zellkerne.
- B DAPI-Färbung von Zellkernen
- C Perlecan (Alexa488) – Die Anfärbung erfolgte randbetont entsprechend einer das Organoid umgebenden Basalmembran mit Unterbrechung im rechten Bereich des Organoids.
- D Integrin $\beta 1$ (Cy3) – Es zeigt sich eine gleichmäßige Darstellung der Färbung über das gesamte Organoid. Erkennbar ist eine Färbung an Zellgrenzen und überlappend mit der Basalmembran.

Maßstabsbalken: 100 μm

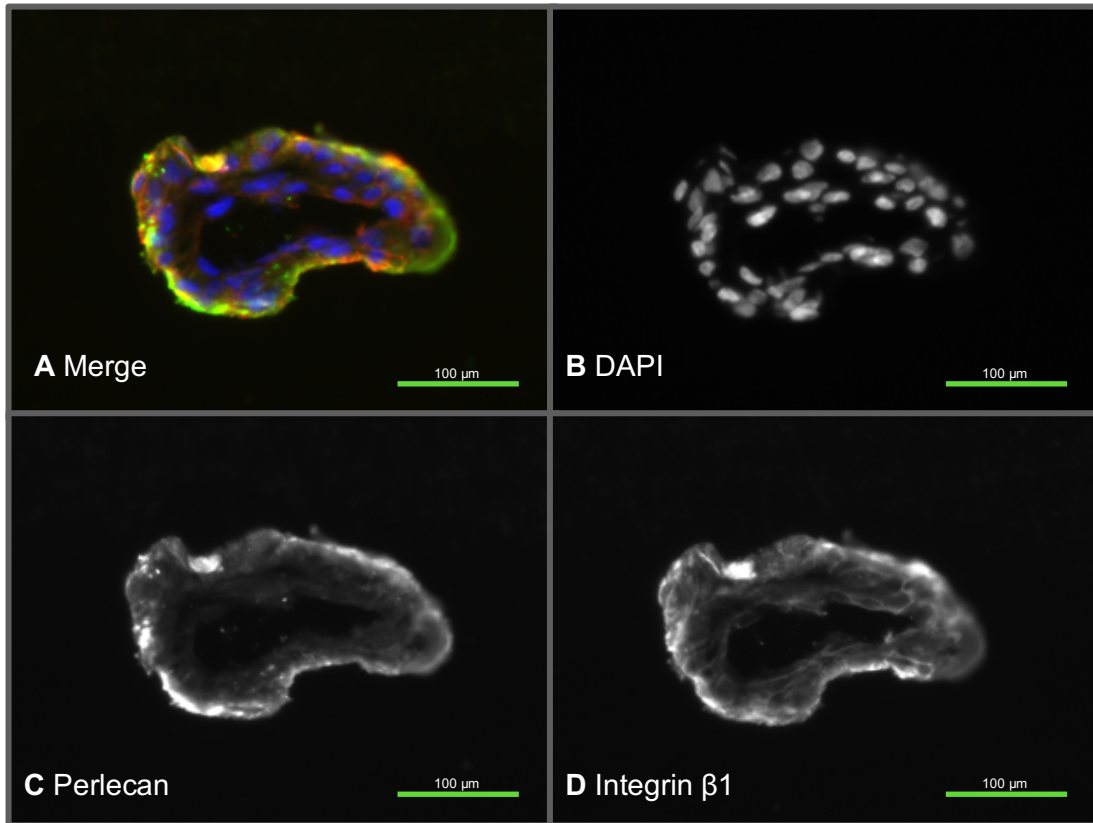


Abbildung 48 IFL BC60 mit DAPI, Perlecan und Integrin $\beta 1$

- A Merge von Perlecan, Integrin $\beta 1$, DAPI - Zu sehen ist ein Organoid mit einem cystischen Hohlraum zentral gelegen, Perlecan (grün) umgibt das Organoid rundum. Integrin $\beta 1$ (rot) ist wie in Abbildung 47 (BC13) im gesamten Organoid anfärbbar. DAPI (blau) markiert die Zellkerne.
- B DAPI-Färbung von Zellkernen
- C Perlecan (Alexa488) als Marker für die Basalmembran
- D Integrin $\beta 1$ (Cy3) - Integrin $\beta 1$ ist auch hier im gesamten Organoid anfärbbar. Dieses Organoid zeigt v. a. im Bereich der Basalmembran eine starke Färbung für Integrin $\beta 1$.
- Maßstabsbalken: 100 μm

Zur Vergleichbarkeit wurden auch Färbungen für andere Integrine angewendet. Neben Integrin $\beta 1$ kam auch Integrin $\alpha 7$ zur Anwendung; beide Integrin-Ketten zusammen nutzen Laminine als Bindungspartner.

Integrin $\alpha 7$ wurde zusammen mit Cytokeratin 5 (Abbildung 49) gefärbt. Die Färbung für Integrin $\alpha 7$ ähnelte der für Integrin $\beta 1$ in Abbildung 47 + 48. Eine Anfärbung von Integrin $\alpha 7$ war gleichmäßig über die Organoide möglich, in der Einzeldarstellung von Cy3 (Integrin $\alpha 7$) war dies noch deutlicher zu sehen. Während sich aber für Integrin $\beta 1$ in den

Aufnahmen auch eine Konzentration auf die Ebene der Basalmembran vermuten ließ, war dies bei Integrin $\alpha 7$ weniger zu sehen.

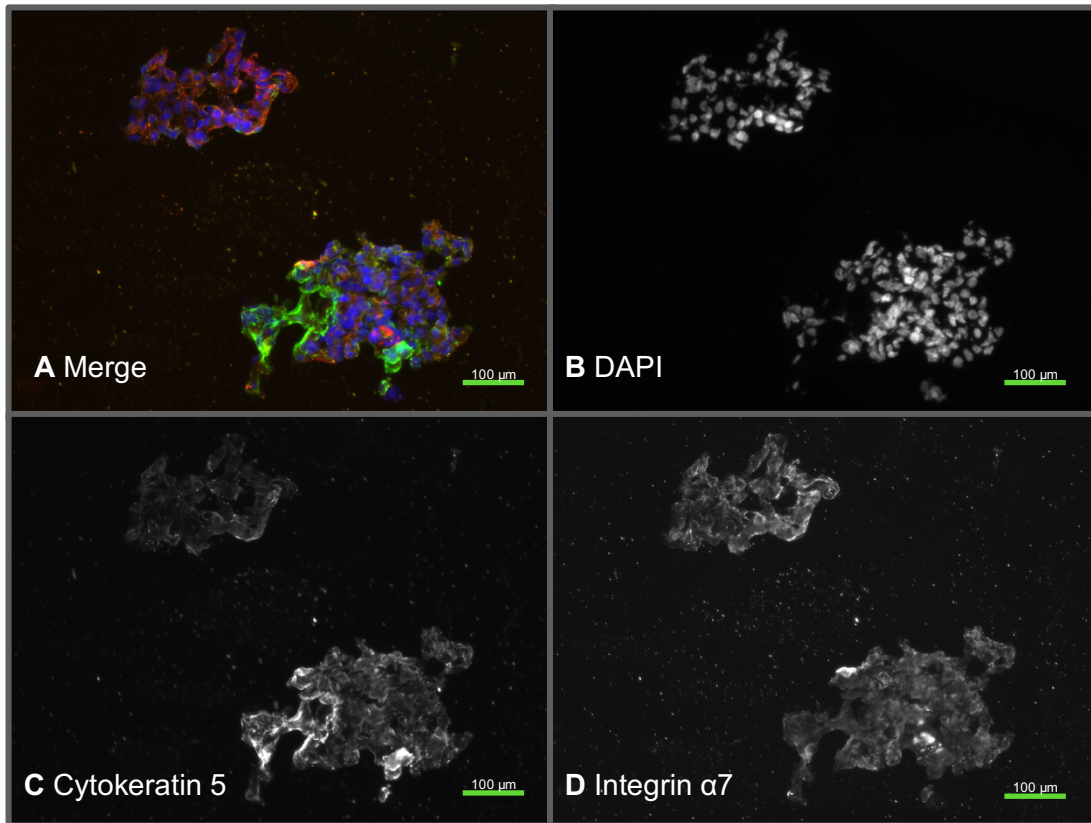


Abbildung 49 IFL BC97 DAPI, Cytokeratin 5 und Integrin $\alpha 7$

- A Merges von CK5, Integrin $\alpha 7$, DAPI - Wie in Abbildung 44 - 46 sieht man eine Aufteilung des Organoids in CK5-positive (grün) und CK5-negative Zellen - eine Färbung mit CK5 ist nicht in allen Zellen des Organoids erfolgt. Integrin $\alpha 7$ verteilt sich aber wie Integrin $\beta 1$ (rot) gleichmäßig über die Organoiden. DAPI (blau) markiert die Zellkerne.
- B DAPI-Färbung von Zellkernen
- C Cytokeratin 5 (Alexa488) - Das obere Organoid weist keine spezifische Färbung für CK5 auf, das untere Organoid nur in Bereichen des linken und des unteren Organoidanteils
- D Integrin $\alpha 7$ (Cy3) - Integrin $\alpha 7$ verteilt sich gleichmäßig über beide Organoiden, zu erkennen ist eine Konzentration auf interzelluläre Anteile.

Maßstabsbalken: 100 μm

Diese Färbungen mit Perlecan, Cytokeratinen und Integrinen geben einen Überblick über den Aufbau der Organoiden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Mamma-Ca-Organoid aus unterschiedlichen Zellen zu bestehen scheint, die sich in luminale und

basale Zellen entsprechend ihrer Cytokeratin-Expression einteilen lassen. Außerdem handelt es sich um solide Zellverbände, die durch Integrine verbunden und von einer Basalmembran umgeben sind. Dieser Aufbau war durchgehend in jeder untersuchten Zelllinie zu detektieren.

Neben der Klärung der Fragestellung nach dem grundsätzlichen Aufbau der Organoide wurden auch speziellere Färbungen angefertigt. So wurden die Kryostatschnitte auch auf membranständige Matrix-Metalloproteasen als Vertreter von Membranbestandteilen und ihre Inhibitoren, den TIMPs, gefärbt.

Für viele Färbungen der Kryostatschnitte, die auf Matrix-Metalloproteasen angefertigt wurden, konnte kein klares Bild erstellt werden; es zeigte sich ein zu großer Hintergrund oder keine spezifische Anfärbung mit Antikörpern gegen Matrix-Metalloproteasen. Zum Teil war eine sehr lange Belichtungszeit notwendig, um überhaupt ein Signal zu erreichen.

Beispielhaft wird die Organoidlinie BC60 nach Markierung mit Cytokeratin 8 und MMP-15 gezeigt (Abbildung 50). Da die Ergebnisse der RT-PCR eindeutig zeigten, dass alle untersuchten Organoidlinien für MMP-15 positiv waren, wurde entsprechend auch eine Anfärbung mittels Immunfluoreszenzmarkierung erwartet. Für die Färbung mit MMP-15 ist jedoch kein Signal zu erkennen, während Cytokeratin 8, wie in anderen Abbildungen zuvor gezeigt, eine gute Färbung aufweist, was sich in der Einzeldarstellung noch detaillierter zeigt (Abbildung 43 - 46).

In den Kryostatschnitten ließen sich auch für andere MT-MMPs ähnlich wie bei MMP-15 keine aussagekräftigen Ergebnisse erreichen. Die Ergebnisse der Färbungen waren hier nicht mit den Ergebnissen der RT-PCR übereinstimmend.

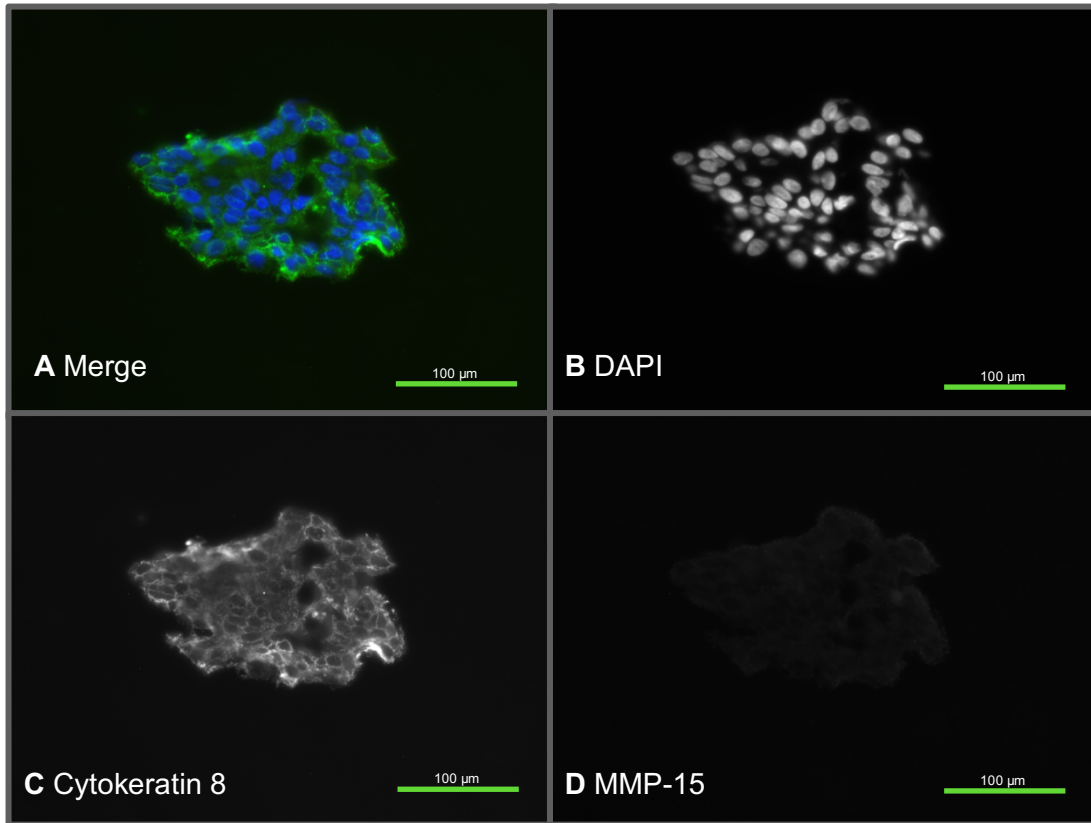


Abbildung 50 IFL BC60 DAPI, Cytokeratin 8 und MMP-15

- A Merge von CK8, MMP-15, DAPI - Das dargestellte Organoid ist CK8-positiv (grün) und besitzt drei kleine cystische Anteile im rechten Bereich, wo in DAPI (blau) keine Zellkerne nachweisbar sind. Ein Signal in Cy3 (MMP-15, rot) ist in der Merge-Aufnahme nicht zu sehen.
- B DAPI-Färbung der Zellkerne
- C Cytokeratin 8 (Alexa488) - Das ganze Organoid imponiert hier als CK8-positiv.
- D MMP-15 (Cy3) - Auch in der Einzeldarstellung ist kein Signal für MMP-15 zu sehen.
- Maßstabsbalken: 100 µm

Als Gegenspieler zu den Matrix-Metalloproteasen wurden auch die TIMPs gefärbt. Um die Verteilung der TIMPs im Organoid zu untersuchen, wurden diese ebenfalls mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht. TIMP-1 war mit einem guten Signal zu sehen, das inhomogen stark ausgeprägt über die Organoiden war (Abbildung 51). Teile von Organoiden wiesen dabei stärkere Signale für TIMP-1 auf, während in anderen TIMP-1 vollständig zu fehlen schien. Eine klare Zuordnung zu einer ausschließlich inter- oder intrazellulären Verteilung kann nicht getroffen werden. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen decken sich hier jedoch mit denen der RT-PCR, in der alle untersuchten Organoidlinien für TIMP-1 durchgehend positiv waren.

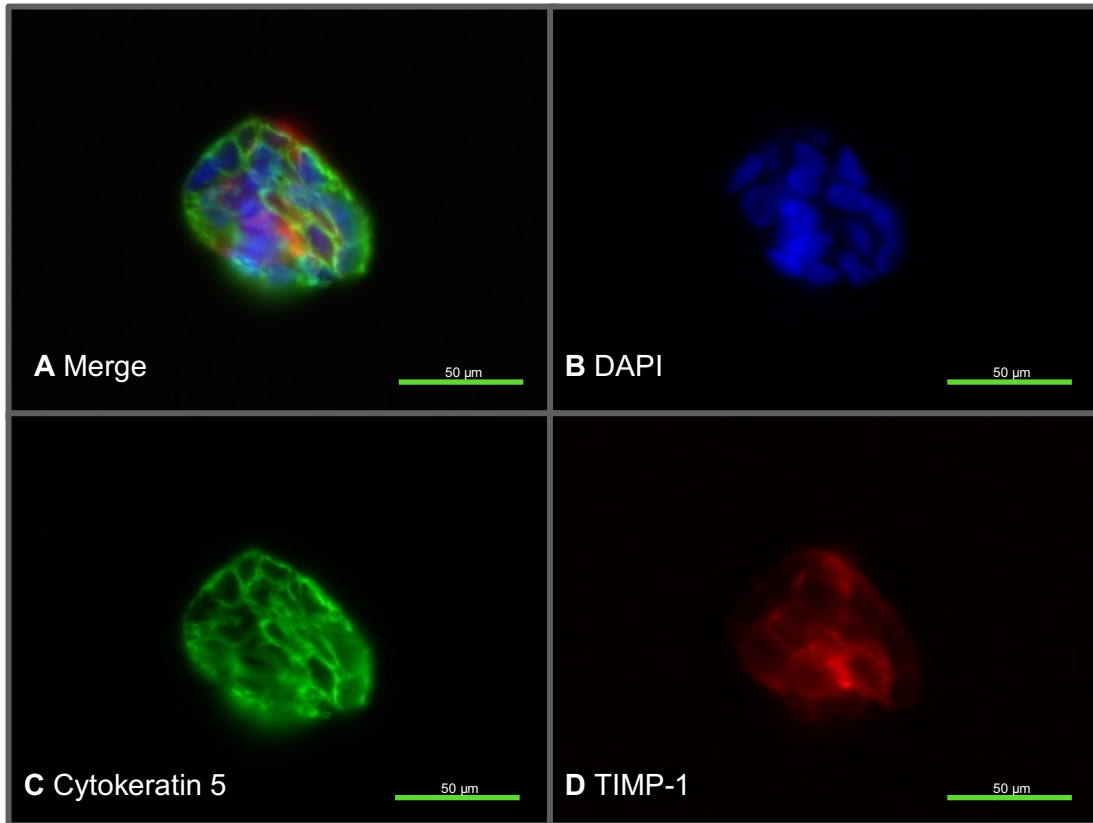


Abbildung 51 IFL BC13 DAPI, Cytokeratin 5 und TIMP-1

- A Mergel von CK5, TIMP-1, DAPI – Zu sehen ist ein CK5-positives (grün) Organoid mit inhomogenem Signal für TIMP-1 (rot) über das ganze Organoid. DAPI (blau) markiert die Zellkerne.
- B DAPI-Färbung der Zellkerne
- C Cytokeratin 5 (Alexa488) - Die Zellen des Organoids sind CK5-positiv.
- D TIMP-1 (Cy3) - deutliches Signal für TIMP-1 inter- wie intrazellulär
- Maßstabsbalken: 50 µm

Für TIMP-2 war ein weniger deutliches Fluoreszenzsignal zu sehen als für TIMP-1. TIMP-2 verteilte sich wie TIMP-1 unregelmäßig über die Organoiden und schien v. a. im Bereich der Basalmembran vorzukommen (Abbildung 52). Da das Signal aber insgesamt sehr schwach war und sich am ehesten in der Einzeldarstellung von Cy3 zeigte, ist eine Beurteilung nur schwer möglich. Zu den Ergebnissen der RT-PCR passt dies jedoch. Alle untersuchten Organoidlinien wiesen ein Signal für TIMP-2 auf.

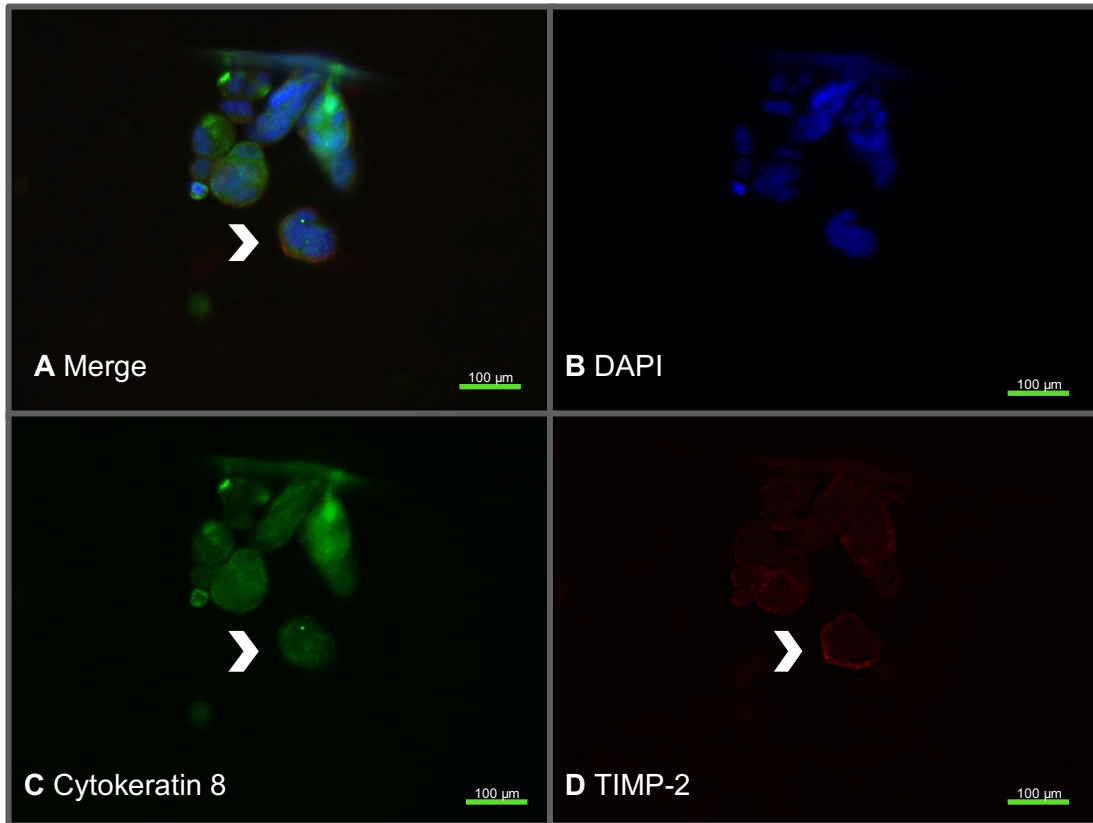


Abbildung 52 IFL BC13 DAPI, Cytokeratin 8 und TIMP-2

- A Merge von CK8, TIMP-2, DAPI – Zu sehen sind CK8-positive (grün) Organoide; TIMP-2 (rot) ist in der Merge-Aufnahme kaum zu sehen. Nur bei dem mit dem Pfeil markierten Organoid ist ein roter Randsaum zu erkennen. DAPI (blau) markiert die Zellkerne.
- B DAPI-Färbung der Zellkerne
- C Cytokeratin 8 (Alexa488) - Die Organoide, die in der Aufnahme zu sehen sind, stellen sich als überwiegend CK8-positiv dar.
- D TIMP-2 (Cy3) - In der Einzeldarstellung von Cy3 ist am ehesten ein schwaches Signal der TIMP-2 Färbung zu erkennen, die sich vor allem auf den Randbereich der Organoide begrenzt; am ehesten zu sehen bei dem mit einem Pfeil markierten Organoid.

Maßstabsbalken: 100 µm

Wie für TIMP-2 zeigte das Ergebnis der Färbungen gegen TIMP-3 (nicht abgebildet) nur ein schwaches Signal. Ansonsten war eine TIMP-3 assoziierte Fluoreszenz über das gesamte Organoid zu finden. Möglich ist hier aber auch eine Hintergrundfärbung, die keine spezifische Zuordnung zu TIMP-3 zulässt. Die Färbungen hierzu waren nicht eindeutig, in der RT-PCR jedoch war TIMP-3 für BC13, BC43, BC60 und BC97 nachgewiesen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die verwendeten Antikörper gegen die membranständigen Matrix-Metalloproteasen als nicht geeignet für diese Methodik der Immunfluoreszenzmarkierung erwiesen. Die Markierungen der TIMPs deckten sich mit den Ergebnissen der RT-PCR und zeigten ein je nach TIMP-Typ bestimmtes Verteilungsmuster über die Organoide.

III.4.2. Paraffinschnitte

Im Unterschied zu den Kryostatschnitten mussten die Paraffinschnitte vor der Immunfluoreszenzmarkierung zunächst entparaffiniert und demaskiert werden. Wie im Teil „Methoden“ beschrieben, kann es durch die Paraffineinbettung Formaldehyd-fixierter Proben zu einer Maskierung von Epitopen durch Vernetzungsreaktionen kommen. Dies behindert die Bindung von Antikörpern. Ein Demaskierungsprozess (*antigen retrieval*) ist hier also im Gegensatz zu den Kryostatschnitten notwendig, um eventuelle Quervernetzungen zu lösen.

Bereits vorgefertigte Paraffinschnitte wurden freundlicherweise von der Frauenklinik AG Koch zur Verfügung gestellt. Mithilfe der Paraffinschnitte konnte zum Einen die oben beschriebene anfängliche Problematik der Immunfluoreszenzfärbung bei den Kryostatschnitten aufgeklärt werden, wie sie im vorausgegangenen Abschnitt beschrieben war, und zum Anderen konnten sie als weitere Methode als Vergleichspunkt dienen.

Die Paraffinschnitte von Organoidlinien wurden auf ähnliche Proteine wie die Kryostatschnitte hin angefärbt und die Methoden somit nicht nur verglichen, sondern auch die Ergebnisse der Kryofärbungen ggf. untermauert. Die Paraffinschnitte waren von anderen Organoidlinien der AG Koch angefertigt als die eigens etablierten Linien, die kryofixiert und -gefärbt wurden. Markiert wurde auch hier nach CK5, CK8, Perlecan, Laminin $\alpha 3$, -4, -5, Integrin $\beta 1$, MMP-15, TIMP-1, -2, -3.

Auch in den Paraffinschnitten von anderen BC- und Kontroll-Organoidlinien konnte die Spezifität von Zellen im Organoid für CK5 oder CK8 festgestellt werden (Abbildung 53). Ebenso zeigte sich eine Anfärbung der Basalmembran mittels Perlecan rund um die Organoide (Abbildung 54).

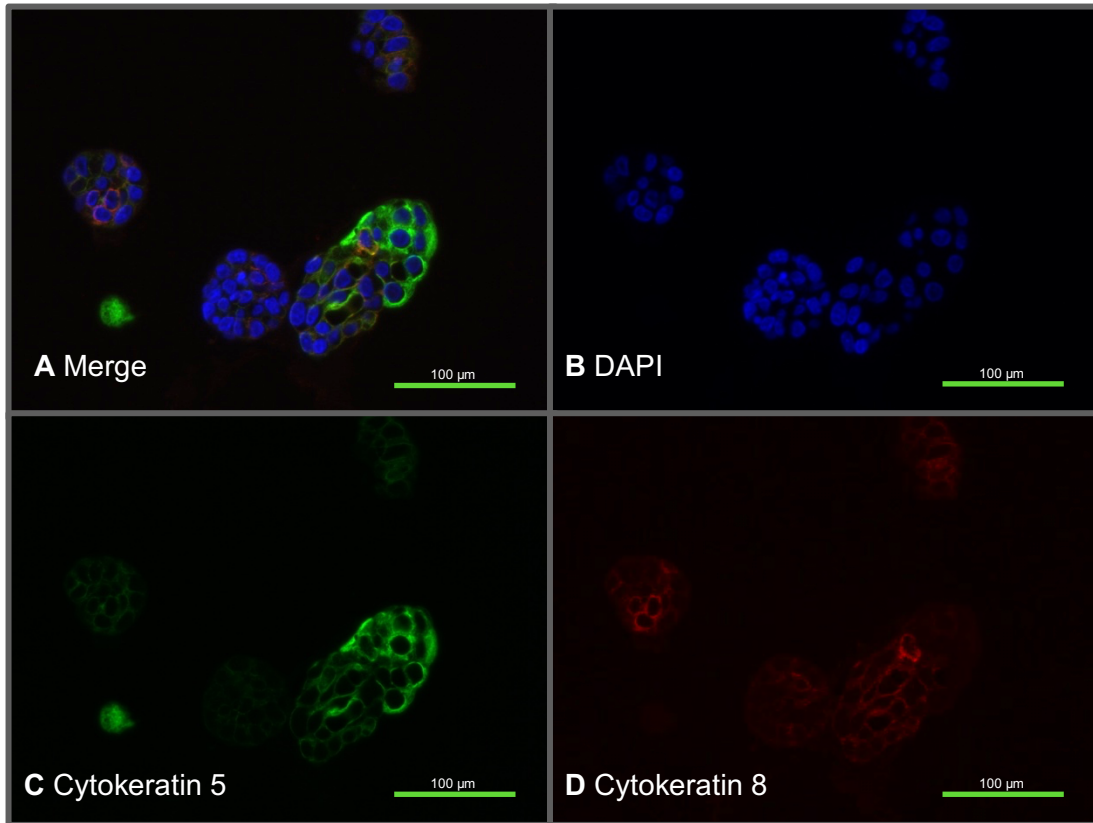


Abbildung 53 IFL K7 DAPI, Cytokeratin 5 und Cytokeratin 8

- A Merge von CK5, CK8, DAPI - Während der rechte Anteil des Organoids deutlich CK5-positiv (grün) ist, zeigt sich im linken Anteil des Organoids eine schwache Fluoreszenz, die von der Anfärbung auf CK8 (rot) herrührt. DAPI (blau) markiert die Zellkerne.
- B DAPI-Färbung der Zellkerne
- C Cytokeratin 5 (Alexa488) - Zu sehen ist die deutliche Aufteilung des Organoids in CK5-positive und CK5-negative Zellen.
- D Cytokeratin 8 (Cy3) - Für CK8 ist ein schwaches Signal im linken Anteil des Organoids zu sehen.

Maßstabsbalken: 100 µm

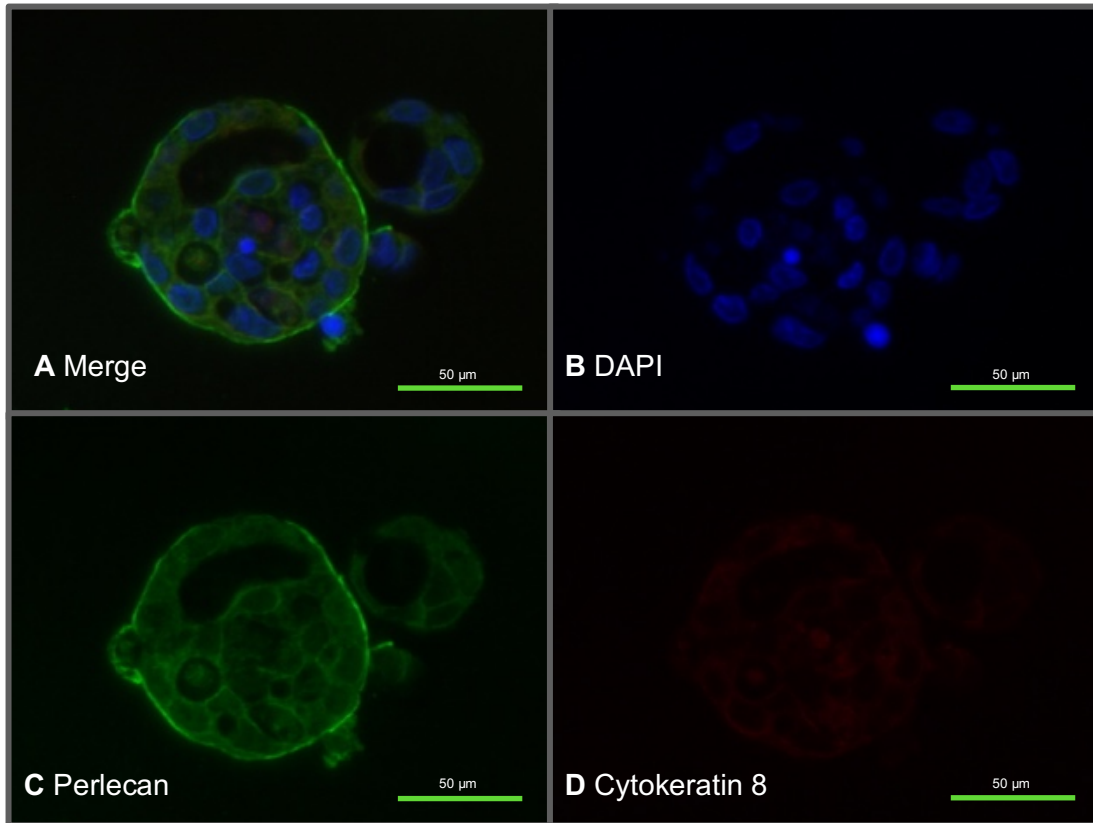


Abbildung 54 IFL BC117 DAPI, Perlecan und Cytokeratin 8

- A Merged image of Perlecan, CK8, DAPI – Perlecan (green) surrounds the organoid corresponding to the basement membrane, and stronger signals are also seen around cyst-like structures, in which no nuclei are visible in DAPI (blue); CK8 (red) is only weakly represented. DAPI marks the nuclei
- B DAPI staining of nuclei
- C Perlecan (Alexa488) - Perlecan surrounds the organoid as basement membrane and also around cystic structures.
- D Cytokeratin 8 (Cy3) - no signal, possibly CK8-negative section of the organoid
- Scale bars: 50 µm

The staining for integrins in the cryostat sections could already show that these are distributed in the organoid as cell adhesion molecules intercellularly and at the basement membrane. Laminins are closely linked to the integrins. They are part of the basement membrane and link these via integrins to the cell. In the paraffin sections, the laminin chains $\alpha 4$ and $\alpha 5$ were stained. These stainings show that they are v. a. intercellularly as well as covering with

Perlecan verteilen - ähnlich wie die Integrine. Die Signalstärke der Lamininfärbungen unterschied sich aber je nach Färbemethode (s. *Chamberslides*) und nach Organoidlinie. Laminin $\alpha 5$ ließ sich in den Paraffinschnitten nicht nachweisen. Färbungen nach Laminin $\alpha 5$ erzeugten kein Signal in der Fluoreszenz (Abbildung 55). Die RT-PCR-Ergebnisse, in denen sich Laminin $\alpha 5$ durchweg nachweisen ließ, lassen aber erwarten, dass Laminin $\alpha 5$ auch in Färbungen anderer Organoidlinien zu finden sein sollte. Deshalb ist eine Eignung des verwendeten Antikörpers für Paraffinschnitte fraglich.

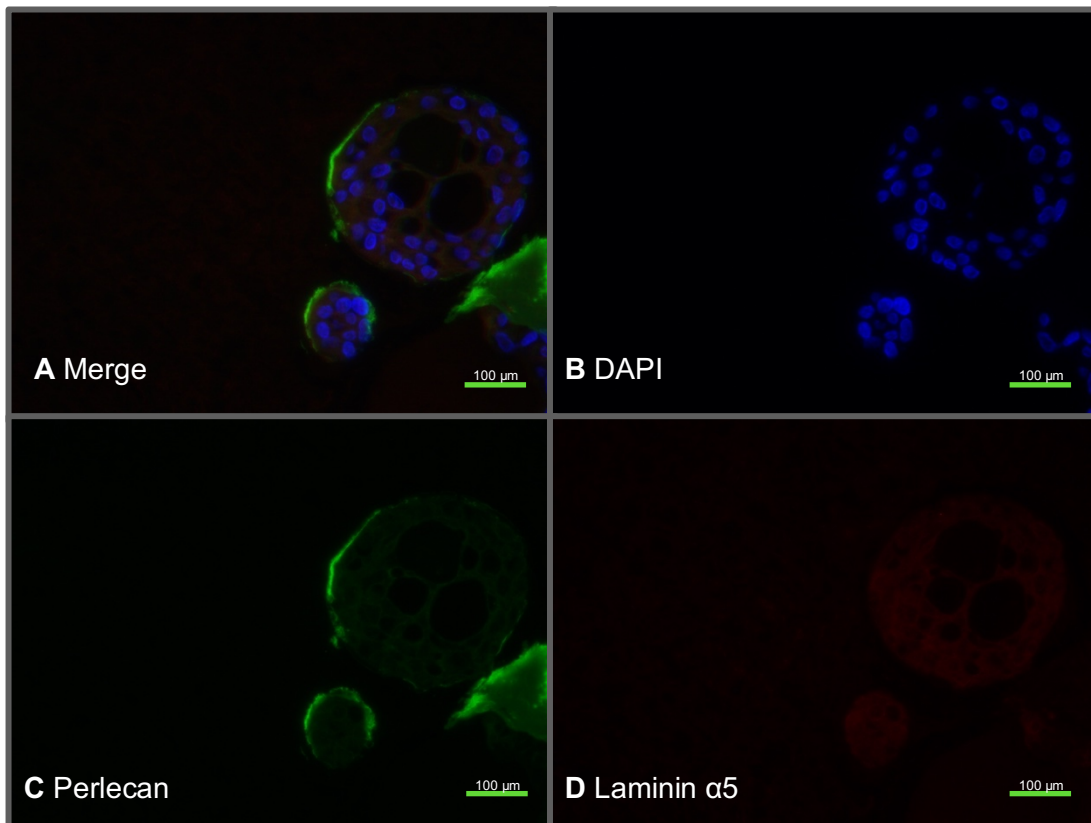


Abbildung 55 IFL BC101 DAPI, Perlecan und Laminin $\alpha 5$

- A Merge von Perlecan, Laminin $\alpha 5$, DAPI - Für Perlecan (grün) ist eine diskontinuierliche Umrandung der Organoide erkennbar, das Signal für Laminin $\alpha 5$ (rot) ist nur schwach vorhanden. DAPI (blau) markiert die Zellkerne.
- B DAPI-Färbung der Zellkerne
- C Perlecan (Alexa488) als Marker für die Basalmembran
- D Laminin $\alpha 5$ (Cy3) - schwaches Signal, das auch Hintergrund der Cy3-Färbung sein kann
Maßstabsbalken 100 μm

Für die Färbung von Laminin $\beta 1$ verhielt es sich ähnlich wie bei den anderen Laminen und die Färberegebnisse unterschieden sich teilweise zwischen den Organoidlinien bzw. je nach Färbemethode. Insgesamt war in den Paraffinschnitten nur ein sehr schwaches Signal zu erreichen, das nicht sicher von einem Fluoreszenzhintergrund abzugrenzen war, jedoch stellte sich eine verstärkte Intensität der Laminin $\beta 1$ -Markierung im Bereich der Basalmembran dar (Abbildung 56). Zeitgleich mit Laminin $\beta 1$ ist in Abbildung 56 die Markierung von Laminin $\alpha 4$ dargestellt. Färbungen gegen Laminin $\alpha 4$ zeigten häufig ein schwaches Signal, jedoch unterschied sich die Signalstärke z. T. auch je nach gefärbter Organoidlinie. So zeigte beispielsweise die BC173 (Abbildung 56) eine deutliche Fluoreszenz. Hier lässt sich eine mögliche Lokalisation von Laminin $\alpha 4$ interzellulär und im Bereich der Basalmembran ableiten. Hier kann ebenfalls kein direkter Vergleich zu den RT-PCR-Ergebnissen gezogen werden. Die in dieser Arbeit untersuchten Organoidlinien waren für Laminin $\alpha 4$ durchweg positiv in der RT-PCR, was eine Positivität in anderen Organoidlinien wahrscheinlich macht.

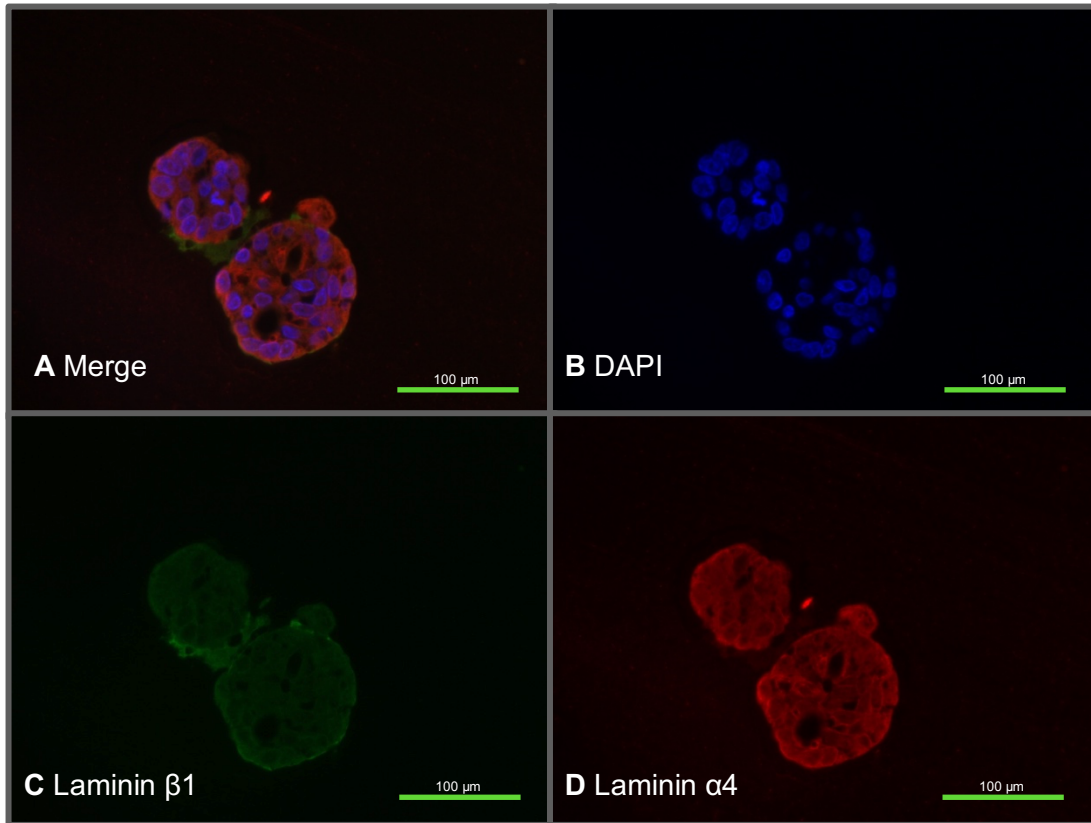


Abbildung 56 IFL BC173 DAPI, Laminin β 1 und Laminin α 4

- A Merge von Laminin β 1, Laminin α 4, DAPI - Laminin β 1 (grün) zeigt ein schwaches, eher im Organoid randständiges Signal, während Laminin α 4 (rot) ein deutliches Signal über das gesamte Organoid aufweist. DAPI (blau) markiert die Zellkerne.
- B DAPI-Färbung der Zellkerne
- C Laminin β 1 (Alexa488) - schwaches, eher im Organoid randständiges Signal
- D Laminin α 4 (Cy3) - deutliches Signal über das gesamte Organoid mit stärksten Intensitäten zwischen den Zellen im Organoid zu vermuten

Maßstabsbalken: 100 μ m

Insgesamt waren die Ergebnisse der Färbungen auf Laminine in den Paraffinschnitten unterschiedlich. Vor allem die Antikörpererkennung von Laminin α 5 und β 1 ist in Frage zu stellen. Zu erwarten wäre ein klares Fluoreszenzbild, da auch in der RT-PCR alle Laminine bis auf Laminin γ 3 mit gutem Bandenmuster nachweisbar waren.

Die Färbungen von Integrinen, Lamininen und Perlecan unterstrichen den erwarteten Parenchym-ähnlichen Aufbau der Organoide, während die TIMPs in den Kryostatschnitten mit einem eher schwach ausgeprägten Fluoreszenzsignal schwierig zu bewerten

waren. Auch in den Paraffinschnitten zeigten TIMPs eine eher schwache bis sogar keine Fluoreszenz (Abbildung 57). Ergänzend zu den TIMPs wurden in den Paraffinschnitten (sowie im folgenden Abschnitt den *Chamberslides*) auch verschiedene MMPs gefärbt. Wie in den Kryostatschnitten bereits war auch in den Paraffinschnitten die Färbung nach MMPs häufig negativ und erzeugte ein schwaches bis kaum vorhandenes Signal (Abbildung 58). Auch hier bestehen aufgrund des anderen Organoidlinien-Materials keine direkten Vergleichswerte zu PCR-Ergebnissen.

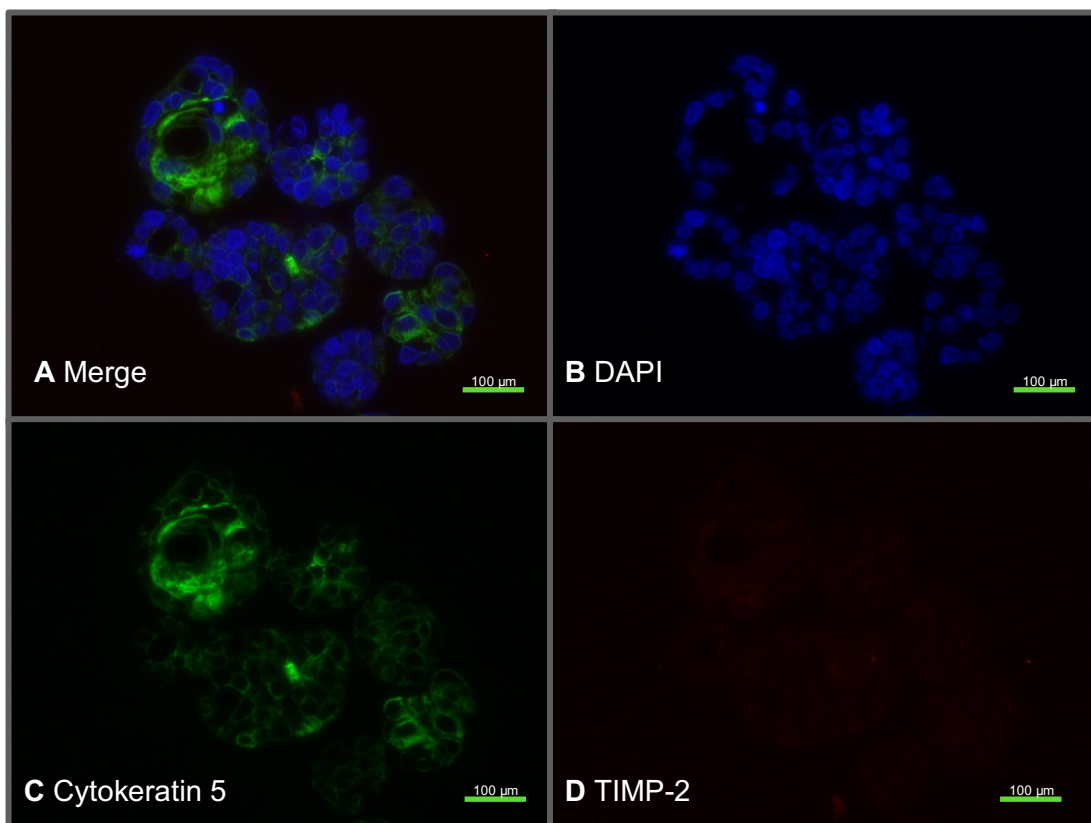


Abbildung 57 IFL K7 DAPI, CK5 und TIMP-2

- A Mergelansicht von CK5, TIMP-2, DAPI - CK5 (grün) zeigt irreguläre Färbungen in Teilen der Organoide entsprechend einer Zellspezialisierung dieser hin zu basalen Zellen, für TIMP-2 (rot) ist kein Signal zu sehen. DAPI (blau) markiert die Zellkerne.
- B DAPI-Färbung der Zellkerne
- C Cytokeratin 5 - Teile der Organoide werden deutlich für CK5 angefärbt.
- D TIMP-2 - kein Signal erkennbar
- Maßstabsbalken: 100 µm

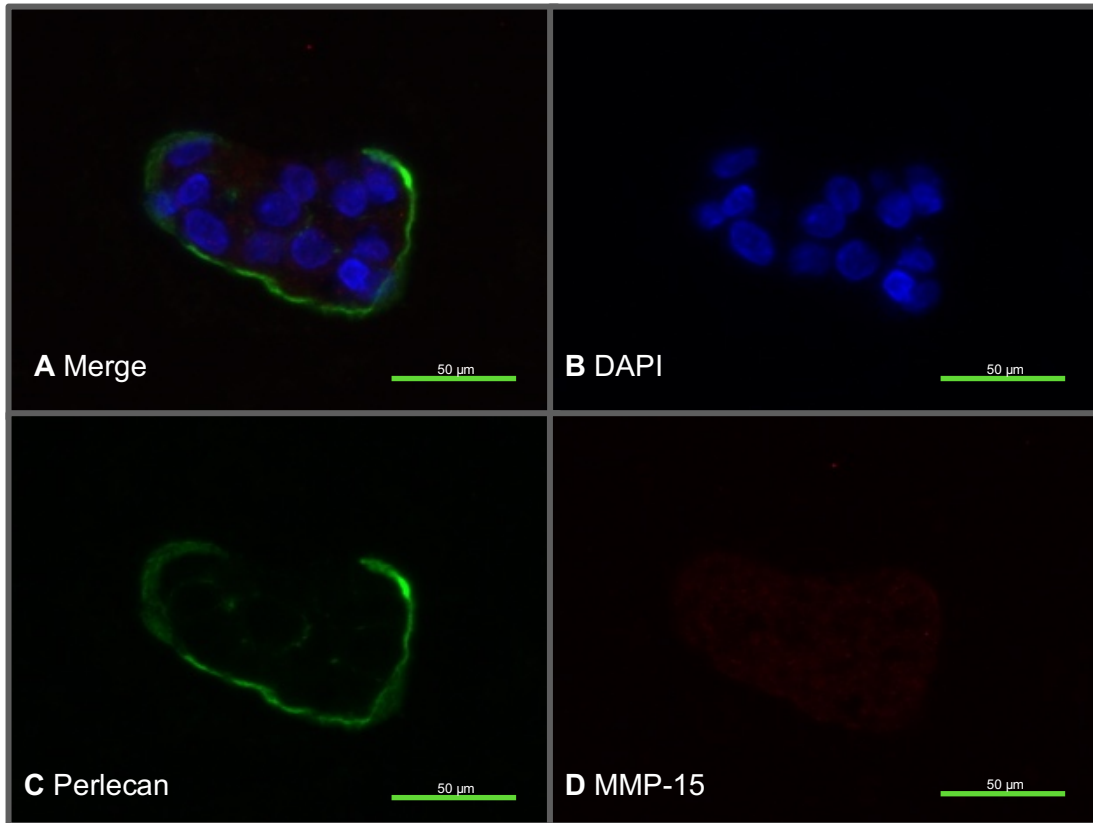


Abbildung 58 IFL K7 DAPI, Perlecan und MMP-15

- A Merge von Perlecan, MMP-15, DAPI – Perlecan (grün) zeigt hier wieder schön eine Umrandung des Organoids im Sinne der Basalmembran, während für MMP-15 (rot) kein Signal aufzeigbar ist. DAPI (blau) markiert die Zellkerne.
- B DAPI-Färbung der Zellkerne
- C Perlecan (Alexa488) - Färbung entsprechend der Basalmembran
- D MMP-15 (Cy3) - kein Signal

Maßstabsbalken: 50 µm

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Ergebnisse der Färbungen der Paraffinschnitte weitestgehend mit denen der Kryostatschnitte deckten. Vereinzelt fanden sich Immunfluoreszenzmarkierungen, die kein aussagekräftiges Bild lieferten. Eine Eignung dieser Antikörper für die Markierung von Paraffinschnitten ist fraglich.

III.4.3. Chambersslides

Die Methode der Kryostat- und Paraffinschnitte ist eine Färbemethode, die immer nur eine Ebene des Organoids widerspiegelt. Zur besseren räumlichen Aufschlüsselung der Organoidstruktur wurde versucht, Färbemethoden für dreidimensionale Objekte (Organoid im Ganzen) zu etablieren. Hierzu diente u. a. die Färbung in *Chambersslides*, wie sie im Abschnitt Methoden beschrieben ist.

Nachdem schon in den Schnittmethoden gezeigt werden konnte, dass sich die Zellen in Organoiden entweder CK5-positiv oder CK8-positiv darstellen, sollte dies in den dreidimensionalen Methoden weiterverfolgt werden. Hier bestätigte sich, was in den Kryostat- und Paraffinschnitten schon zu sehen war - die Organoide teilen sich ziemlich deutlich in Zellen, die entweder CK5 oder CK8 exprimieren. Es konnte sogar gezeigt werden, dass CK5-positive basale Zellen vorwiegend im Randbereich der Organoide exprimiert zu werden scheinen und CK8-positive luminale Zellen im Gegensatz dazu vorwiegend im Inneren des Organoids angefärbt werden konnten (Abbildung 59).

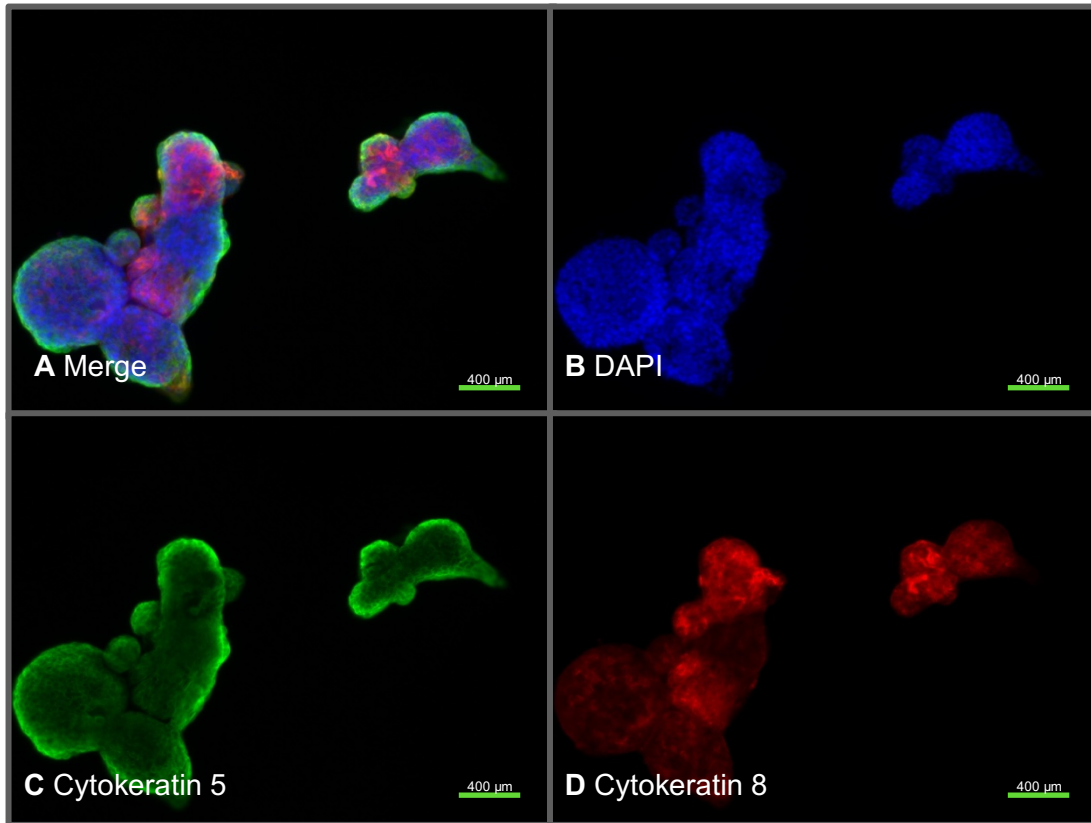


Abbildung 59 IFL BC13 DAPI, Cytokeratin 5 und Cytokeratin 8

- A Merged image of CK5, CK8, and DAPI - As described in the preceding methods, it is also possible here to divide the organoid into CK5-positive (green) and CK8-positive (red) cells through the unequal staining of CK5 and CK8 in the organoid. DAPI (blue) marks the nuclei.
- B DAPI staining of the nuclei
- C Cytokeratin 5 (Alexa488) - A staining of CK5 is found in the depicted organoids, e.g. in the peripheral region of the organoid.
- D Cytokeratin 8 (Cy3) - A staining of CK8 is in contrast to CK5 here, e.g. centrally in the organoid detectable, but with different intensities within the organoid.

Scale bars: 400 µm

Also Perlecan and β 1-Integrin should be more thoroughly examined in a three-dimensional setting. Perlecan could be stained with the highest intensity around the organoid in the peripheral region, as well as finely granularly also within the organoid, most pericellularly (Abbildung 60 + 61). Integrin β 1 as a representative of the Integrin family could be stained relatively homogeneously over the entire organoid, where the staining pattern is based on a

interzelluläre sowie Basalmembran-assoziierte Lokalisation schließen ließ (Abbildung 60). Ein vergleichbares Verteilungsmuster zeigte sich bereits in den Färbungen der Kryostatschnitte.

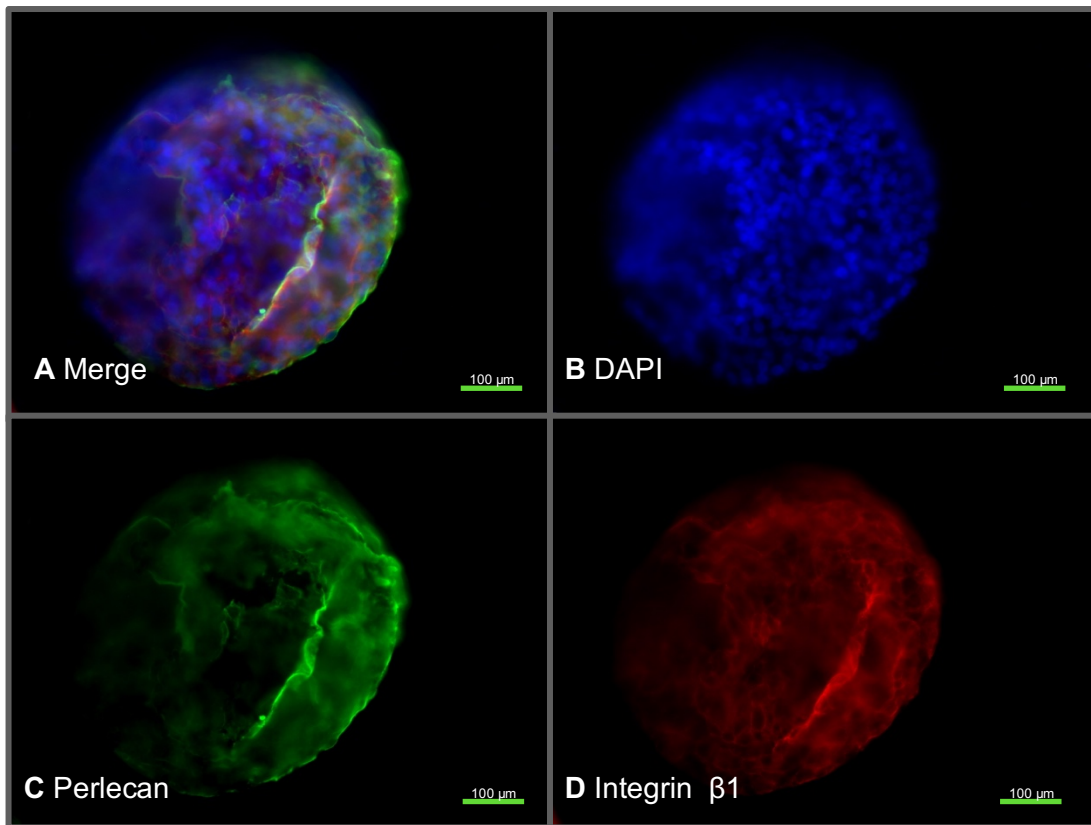


Abbildung 60 IFL BC13 DAPI, Perlecan und Integrin β 1

- A Merge von Perlecan, Integrin β 1, DAPI - Das abgebildete Organoid ist vermutlich nicht in einer Ebene gelegen, Perlecan (grün) zeigt hier wieder eine bandförmige Anfarbung, die jedoch nicht eindeutig dem äußeren Rand des Organoids zuzuordnen ist, Integrin β 1 (rot) ist gleichmäßig über das Organoid angefärbt. DAPI (blau) markiert die Zellkerne.
- B DAPI-Färbung der Zellkerne
- C Perlecan (Alexa488) - bandförmige Anfarbung
- D Integrin β 1 (Cy3) - gleichmäßige Anfarbung innerhalb des Organoids mit eher interzellulärer Konzentration

Maßstabsbalken: 100 μ m

Laminin α 5 ist in der folgenden Abbildung (Abbildung 61) stellvertretend für die Laminin-Familie abgebildet. Ähnlich wie bei den Integrinen zeigte sich auch hier eine beinahe deckungsgleiche Fluoreszenzfärbung mit Perlecan, wobei die Intensität des Laminin α 5-

Signals im Randbereich des Organoids am stärksten war und sich zum Inneren hin weniger intensiv zeigte.

Anders als bei den Kryo- und Paraffinschnitten ergeben die Färbungen der Laminine in den *Chamberslides* deutliche Fluoreszenzbilder, die auch mit den Ergebnissen der RT-PCR-Analyse kongruent sind. Laminin $\alpha 5$ war in allen untersuchten Organoidlinien deutlich nachweisbar in der RT-PCR-Analyse.

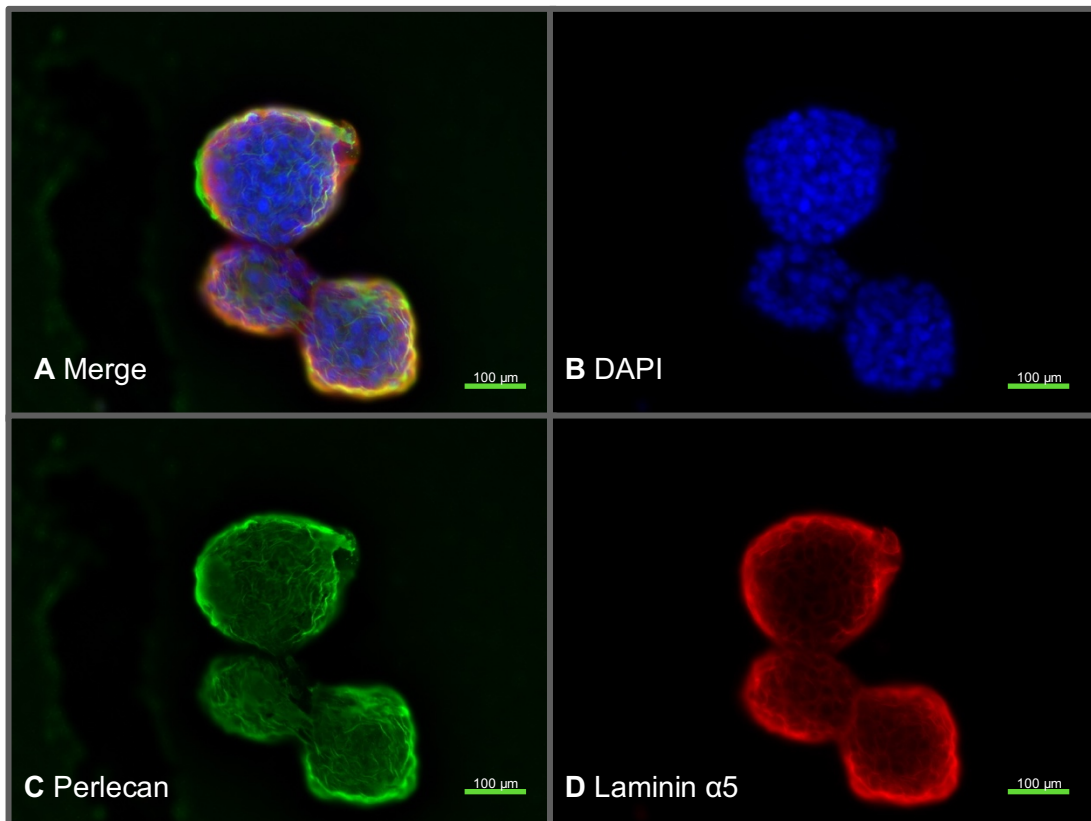


Abbildung 61 IFL BC13 DAPI, Perlecan und Laminin $\alpha 5$

A Merge von Perlecan, Laminin $\alpha 5$, DAPI - Die Färbung für Perlecan (grün) zeigt seine höchsten Intensitäten bandförmig entlang der zu erwartenden Basalmembran, jedoch auch fein interzellulär; Laminin $\alpha 5$ (rot) wird hier fast deckungsgleich zu Perlecan angefärbt mit geringerer Konzentration im Organoid. DAPI (blau) markiert die Zellkerne.

B DAPI-Färbung der Zellkerne

C Perlecan (Alexa488) - randständig betonte, bandförmige Anfärbung von Perlecan, sowie fein interzellulär

D Laminin $\alpha 5$ (Cy3) - fast deckungsgleiche Anfärbung mit Perlecan

Maßstabsbalken: 100 μm

Mit der Methode zur dreidimensionalen Färbung der Organoide in *Chambersslides* wurde auch die Färbung nach MMPs abermals reproduziert. Hier konnte für einige MMPs ein deutliches, spezifisches Signal erreicht werden. Vor allem für MMP-15, MMP-17 und MMP-24 zeigte sich ein Signal - vergleichend mit der RT-PCR-Analyse decken sich diese Ergebnisse. Wenn auch die Banden für MMP-17 und -24 häufig nur schwach ausgebildet waren, ergab sich in der RT-PCR für die untersuchten Organoidlinien i. d. R. ein positives Ergebnis.

Die Immunfluoreszenzmarkierungen auf MMP-15 präsentierten sich als inhomogene Färbung über das Organoid (Abbildung 62). Das Färbemuster verteilte sich diffus mit am ehesten nukleärer/zytosolischer Verteilung. Nach den Ergebnissen der RT-PCR wäre ein Fluoreszenzsignal für MMP-15-Färbungen zu erwarten, da alle getesteten Organoidlinien für MMP-15 deutlich positiv waren.

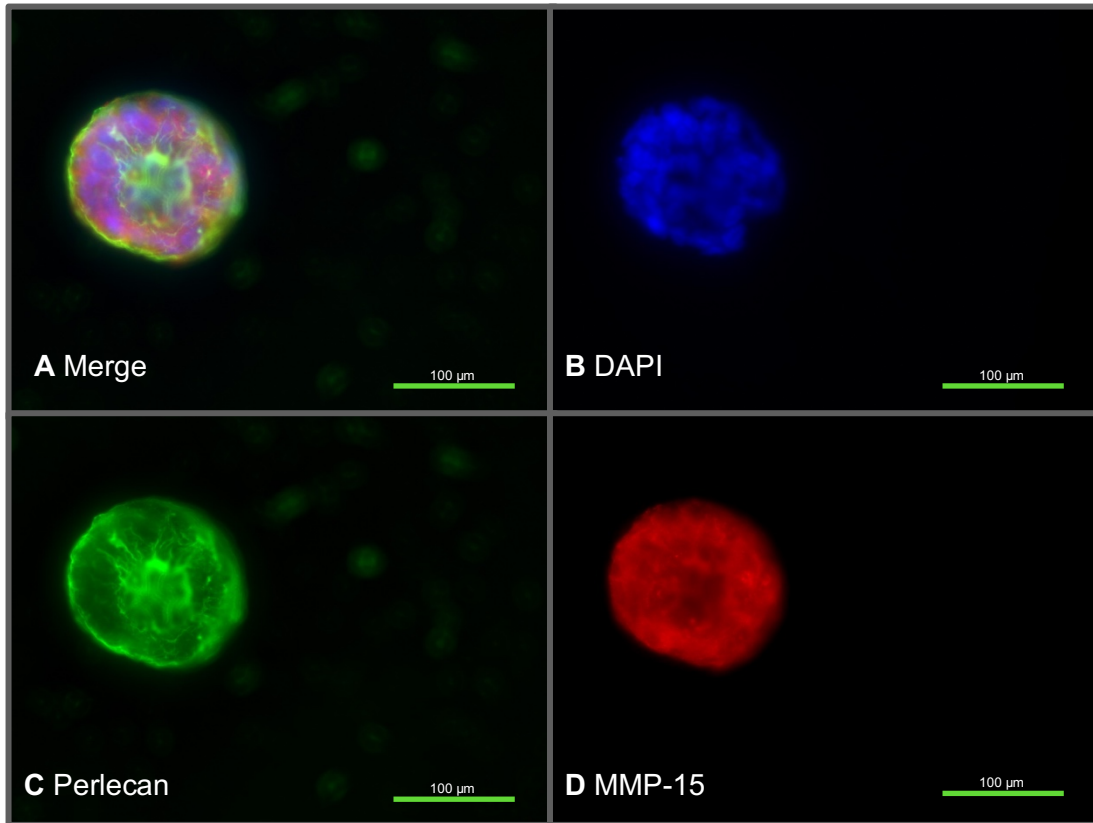


Abbildung 62 IFL BC13 DAPI, Perlecan und MMP-15

- A Merge von Perlecan, MMP-15, DAPI – Zu sehen ist eine rand- und zentralbetonte Anfärbung von Perlecan (grün), sowie ein eher unspezifisches Signal für MMP-15 (rot) mit am ehesten interzelluläre Anfärbung mit zentraler Abschwächung. DAPI (blau) markiert die Zellkerne.
- B DAPI-Färbung der Zellkerne
- C Perlecan (Alexa488) - rand- und zentralbetonte Anfärbung mit feinen Strukturen innerhalb des Organoids
- D MMP-15 (Cy3) - eher unspezifisches Signal, keine konkrete Zuordnung möglich, jedoch am ehesten interzellulär

Maßstabsbalken: 100 µm

Färbungen nach MMP-16 zeigten weitestgehend ein schwaches bzw. nicht vorhandenes Fluoreszenzsignal, wie z. B. bei BC13 (Abbildung 63), was zu den Ergebnissen der RT-PCR passt. Die RT-PCR wies in keiner Organoidlinie ein deutliches Vorhandensein von MMP-16 nach, was auch keinen Nachweis in einer Fluoreszenzmarkierung erwarten ließ. Vor allem im Vergleich zur parallel durchgeführten Färbung nach Integrin β 1, die ein sehr klares Bild ergab hat, zeigte sich, dass für MMP-16 keine deutliche Anfärbung stattgefunden hat (Abbildung 63).

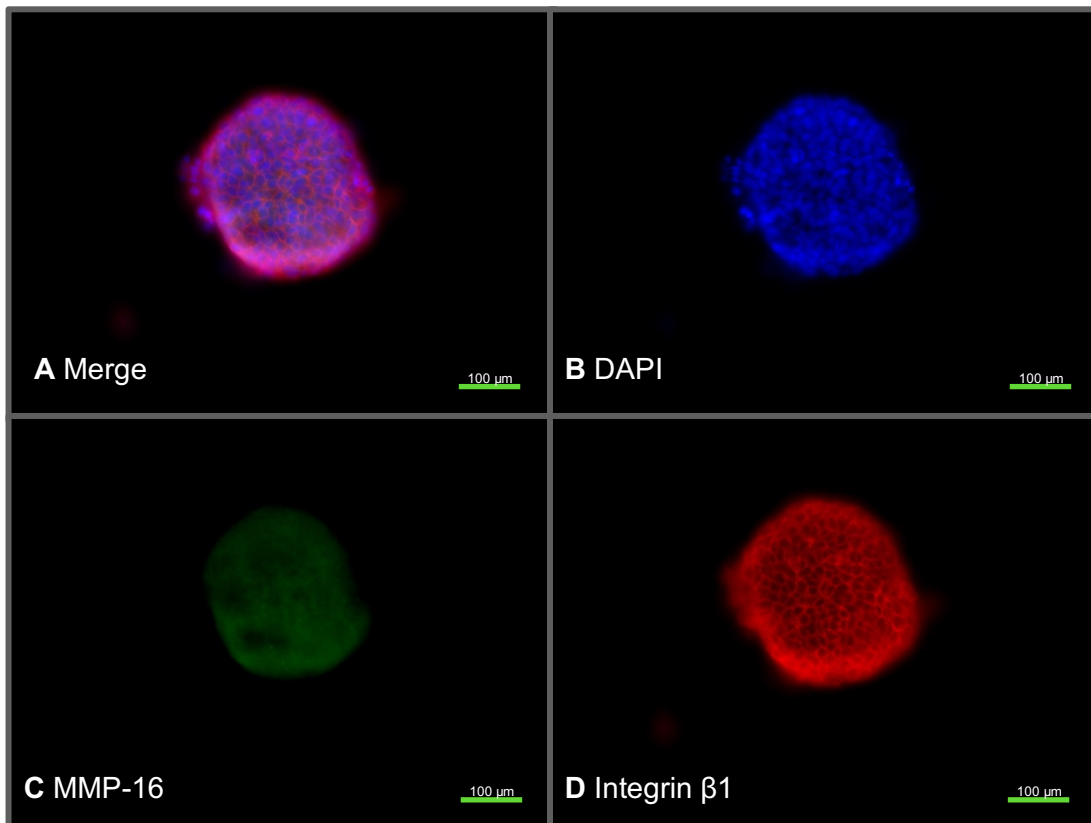


Abbildung 63 IFL BC13 DAPI, MMP-16 und Integrin β 1

- A Merge von MMP-16, Integrin β 1, DAPI – Zu sehen ist ein schwaches Signal für MMP-16 (grün), das nicht unbedingt spezifisch zuzuordnen ist, Anfärbung von Integrin β 1 (rot) deutlich interzellulär über das gesamte Organoid. DAPI (blau) markiert die Zellkerne.
 - B DAPI-Färbung der Zellkerne
 - C MMP-16 (Alexa488) - schwaches Signal, nicht von einem Fluoreszenzhintergrund eindeutig abzugrenzen
 - D Integrin β 1 (Cy3) - deutliches Signal interzellulär gleichmäßig über das gesamte Organoid
- Maßstabsbalken: 100 μ m

Bei vorhandener Fluoreszenz war eine Zuordnung der Färbung von MMP-17 zu einer bestimmten Struktur nicht eindeutig möglich (Abbildung 64). Es zeigten sich bandförmige Anfärbungen am ehesten im inter-/intrazellulären Bereich.

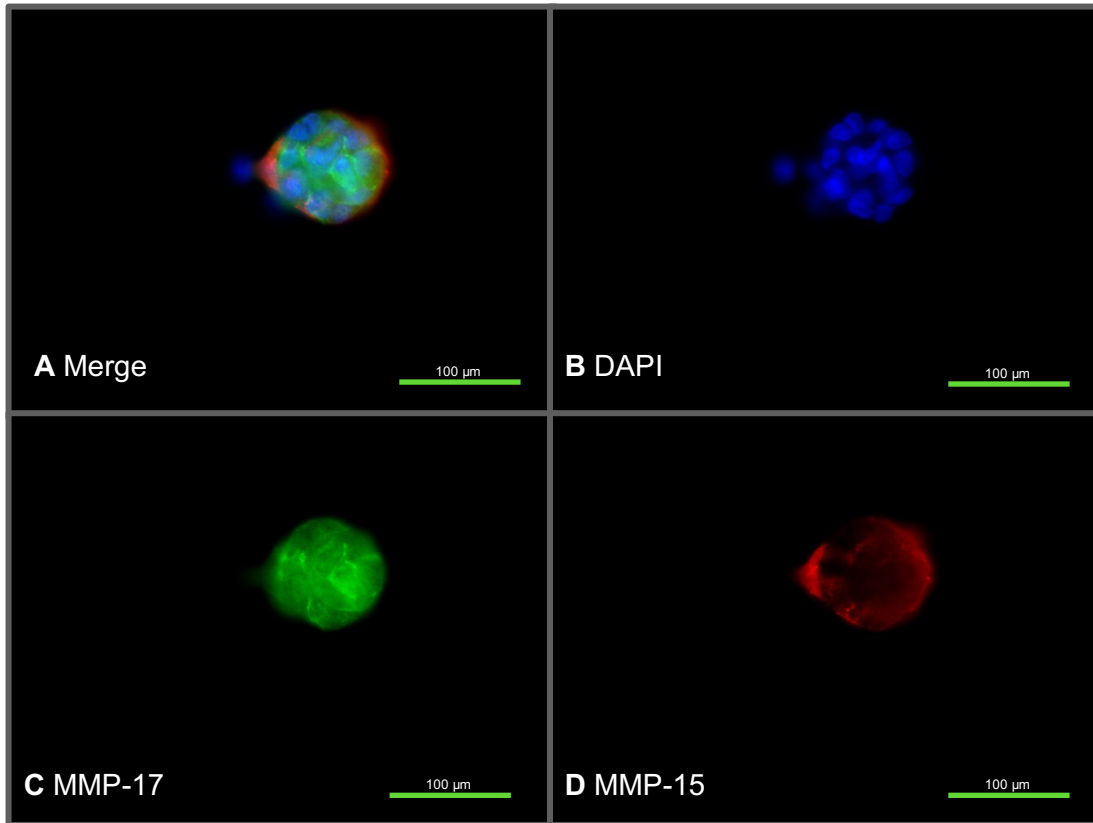


Abbildung 64 IFL BC13 DAPI, MMP-17 und MMP-15

- A Merge von MMP-17, MMP-15, DAPI - stellenweise deutliche Anfärbung von MMP-17 (grün) im Organoid, MMP-15 (rot) v. a. im Randbereich des Organoids angefärbt. DAPI (blau) markiert die Zellkerne.
- B DAPI-Färbung der Zellkerne
- C MMP-17 (Alexa488) - stellenweise deutliche Anfärbung von MMP-17 im Organoid, am ehestens perizellulär
- D MMP-15 (Cy3) - Anfärbung von MMP-15 v. a. im Randbereich und z. T. im Organoid gelegen

Maßstabsbalken: 100 µm

Färbungen für MMP-24 zeigten eine eher diffuse Verteilung über das gesamte Organoid, jedoch mit deutlichem Signal, am ehesten auf den interzellulären Bereich fokussiert, entsprechend der parallel durchgeführten Färbung nach Integrin β 1 (Abbildung 65). Färbungen von MMP-24 und Integrin β 1 überlappen sich hier weitestgehend.

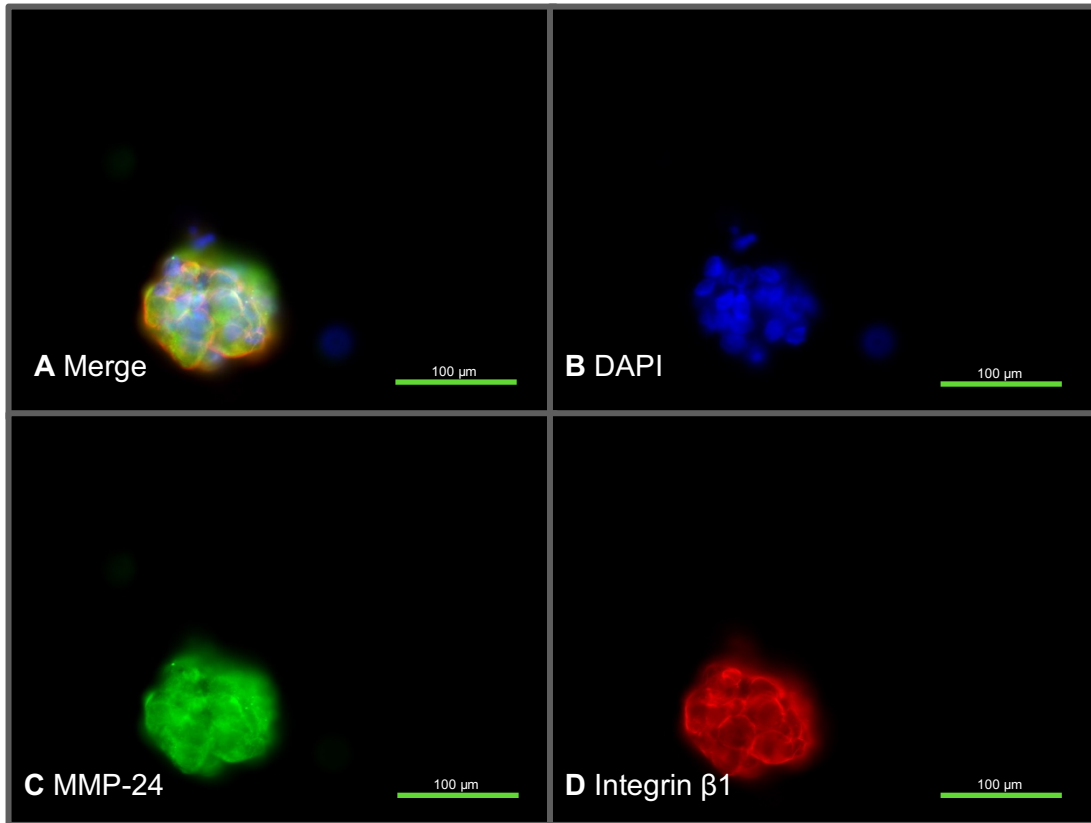


Abbildung 65 IFL BC13 DAPI, MMP-24 und Integrin β 1

- A Merge von MMP-24, Integrin β 1, DAPI – Das Anfärbungsmuster von MMP-24 (grün) ist nicht genau zuzuordnen, aber am ehesten wie Integrin β 1 (rot) interzellulär lokalisiert. DAPI (blau) markiert die Zellkerne.
- B DAPI-Färbung der Zellkerne
- C MMP-24 (Alexa488) - diffuses Signal für MMP-24, am ehesten spezifische Anfärbung interzellulär und membranständig
- D Integrin β 1 (Cy3) - deutliche interzelluläre Anfärbung von Integrin β 1
- Maßstabsbalken: 100 μ m

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Färbungen nach Cytokeratinen, Integrinen und anderen Basalmembranbestandteilen bestätigten, was die Kryostat- und Paraffinschnittmethoden bereits zeigten. Verschiedene Matrix-Metalloproteasen ließen sich in den *Chamberslides* prominent anfärben.

III.4.4. LSM880 mit Airyscan-Detektor

Weiterführend als dreidimensionale Färbemethode der Organoide wurde zusätzlich zu den *Chamberslides*-Färbungen für die Aufnahme am *Laser-Scan*-Mikroskop (LSM) durchgeführt.

Der Vorteil des *Laser-Scan*- (und auch des Multiphoton-) Mikroskops ist, dass auch in einem dreidimensionalen Objekt die einzelnen Ebenen betrachtet werden können.

In Zusammenarbeit mit Daniel Carvajal Berrio aus der AG Prof. Schenke-Layland konnten Organoide der Linie BC13, BC60 und BC97 am LSM aufgenommen werden.

Hierbei lag der Fokus der Fragestellung auf einer genauen Betrachtung des Aufbaus der Organoide anhand der Marker Cytokeratin 5 und Cytokeratin 8, sowie Perlecan und zusätzlich MMP-15. MMP-15 wurde für die Färbung ausgewählt, da das Korrelat zu MMP-15 in der RT-PCR-Analyse in allen Organoidlinien nachweisbar war und somit zumindest indirekt ein Nachweis bereits vorhanden war, dass MMP-15 RNA-Produkte von den Organoidzellen gebildet wurden. Cytokeratin 5 und Perlecan wurden beide mit Alexa488, Cytokeratin 8 und MMP-15 mit Alexa 594 gefärbt. Von beiden sekundären Antikörpern war bekannt, dass am Multiphoton-Mikroskop und am LSM ein gutes Bild erzeugt werden konnte.

Die Organoide wurden v. a. mit Airyscan-Detektor am *Laser-Scan*-Mikroskop aufgenommen, da die Verwendung des Airyscan-Detektors eine sehr gute Bildauflösung bietet. Bei den Aufnahmen mit Airyscan-Detektor mehrerer Ebenen wurde dabei darauf verzichtet, den DAPI-Kanal mit aufzunehmen, um die Aufnahmezeit der Bilder zu verkürzen. Eine Darstellung der Verteilung von CK5 und CK8 war dennoch möglich.

Durch die Aufnahme mit Airyscan am *Laser-Scan*-Mikroskop ließ sich eine sehr gute Auflösung erzielen, durch die mit der Färbung auf CK5 und CK8 die einzelnen Zytoskelettfilamente der Cytokeratine dargestellt werden konnten (Abbildung 66). Es wurden hauptsächlich Z-Stacks erstellt, da sich die Fragestellung v. a. nach der generellen Verteilung CK5- und CK8-positiver Zellen im Organoid richtete.

Auf die Aufnahme mit dem Multiphoton-Mikroskop konnte gänzlich verzichtet werden, da das Clearing mit der Fructose-Glycerin-Lösung in der Vorbereitung so gut funktionierte, dass auch mit dem *Laser-Scan*-Mikroskop in tiefere Schichten der Organoide penetriert werden konnte.

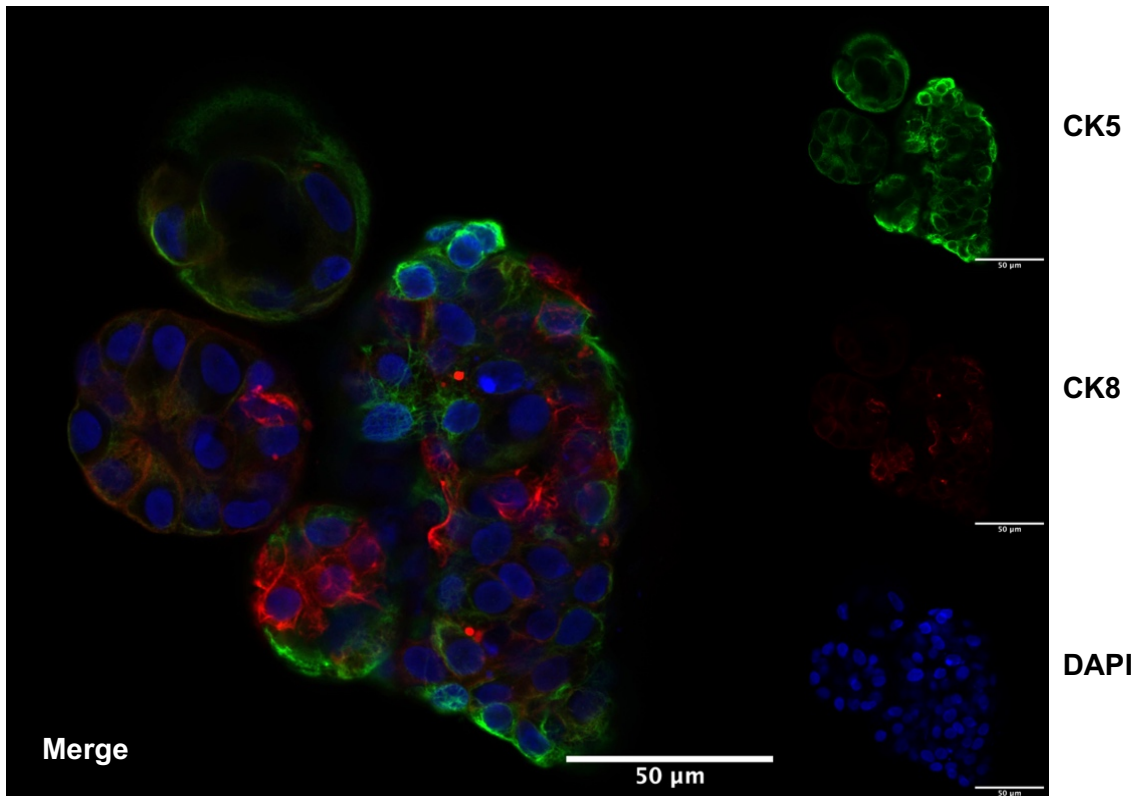


Abbildung 66 Aufnahme CK5/CK8 LSM880 mit Airyscan einer einzelnen Ebene von BC13

Die Aufnahme erfolgte am Laser-Scan-Mikroskop mit Airyscan. Aufgenommen wurde nur eine einzelne Ebene der Organoide, wodurch der DAPI-Kanal miteinbezogen werden konnte.

Airyscan ermöglicht Aufnahmen mit hoher Auflösung. Im Bild sind die einzelnen Cytokeratin-Filamente sowohl von CK5 als auch CK8 zu erkennen. Des Weiteren lässt sich hier zeigen, dass auch in der 3D-Betrachtung die Organoide in CK5-positive- und CK8-positive-Zellen aufgeteilt sind.

Maßstabsbalken: 50 µm

In den Z-Stack-Aufnahmen am LSM, bei denen alle paar Mikrometer eine Aufnahme einer Ebene des Organoids gemacht wird, fiel auf, dass sich CK8 auf den Randbereich des Organoids konzentrierte, während CK5 daran ansetzend auf den Innenbereich des Organoids übergang (Abbildung 67 + 68).

Dies ließ sich in allen drei gefärbten Linien reproduzieren. Kleinere Organoide jedoch zeigten dieses Färbemuster nicht unbedingt. Hier waren Färbungen von CK5 und CK8 eher inhomogen über das Organoid verteilt (Abbildung 67).

Deutlich war aber, dass jede Zelle im Organoid nur eines der beiden Cytokeratine exprimierte - CK5 oder CK8 (Abbildung 67). Dies lässt auf eine Aufteilung des Organoids in

CK5- und CK8-positive Zellen schließen, wie es auch schon die vorausgehenden Färbemethoden (Kyrostat- und Paraffinschnitte, sowie *Chamberslides*) zeigten.

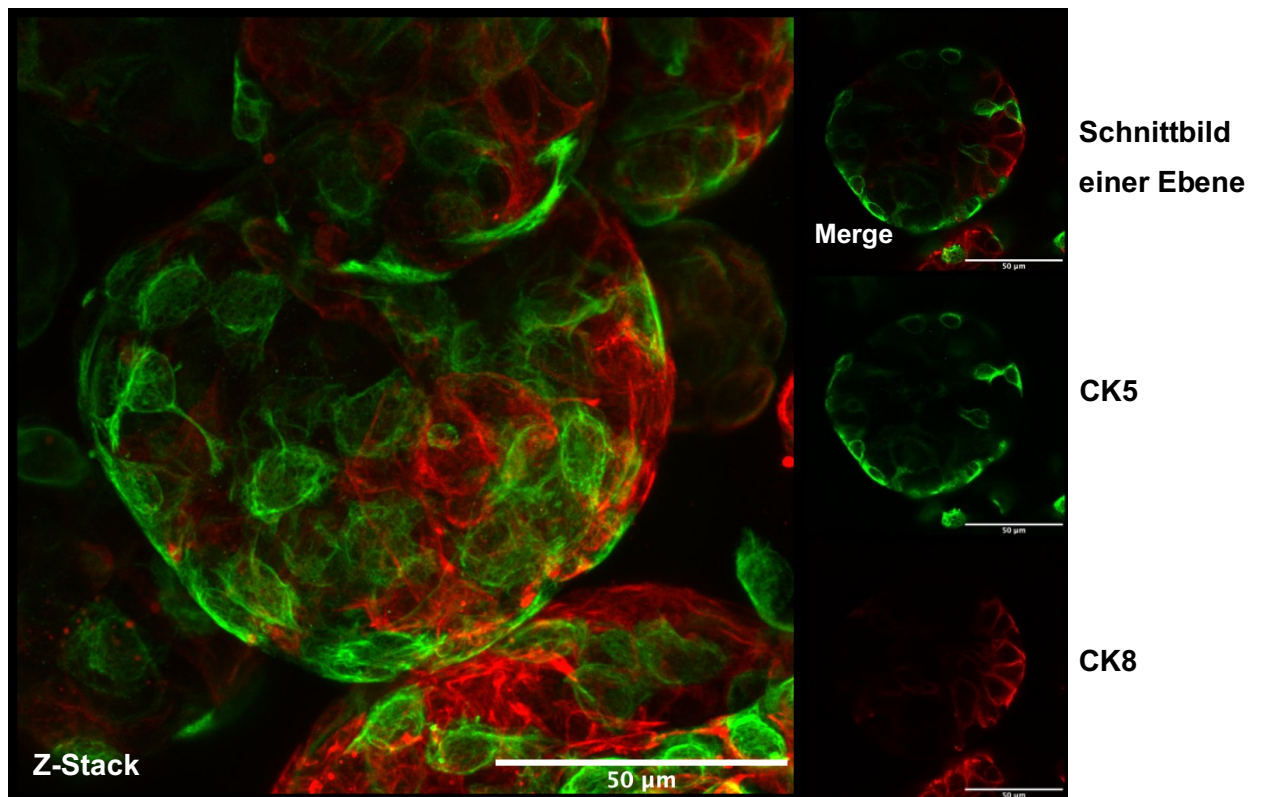


Abbildung 67 Aufnahme (Z-Stack) CK5/CK8 LSM880 mit Airyscan-Detektor von BC13

Hier wurde ein verhältnismäßig kleineres Organoid aufgenommen. Die Verteilung von CK8-positive Zellen auf den Randbereich und CK5-positive Zellen auf den Innenbereich zeigte sich hier weniger. Jedoch ist hier auch die klare Trennung in CK5-exprimierende und CK8-exprimierende Zellen erkennbar.

Maßstabsbalken: 50 µm

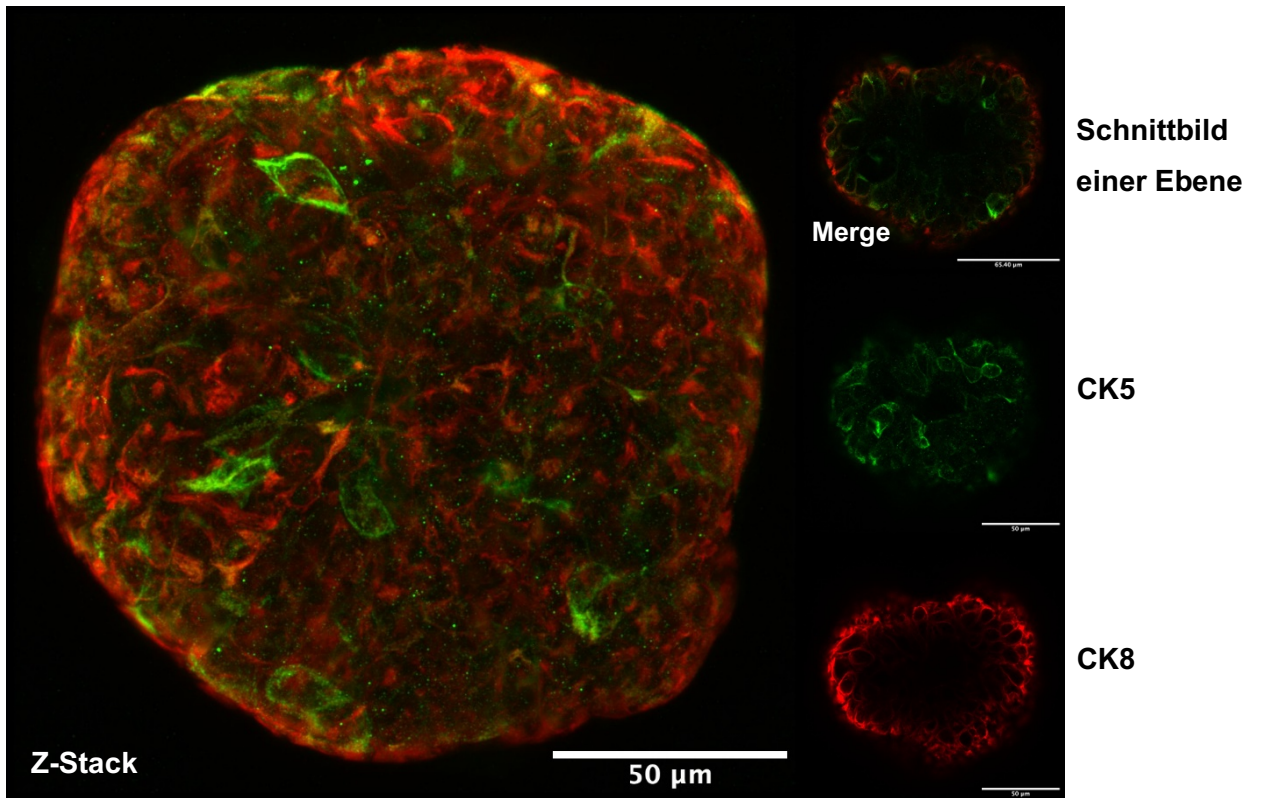


Abbildung 68 Aufnahme (Z-Stack) CK5/CK8 LSM880 mit Airyscan-Detektor von BC60

Man kann eine Aufteilung des Organoids in CK5-positive und CK8-positive Zellen erkennen, wobei sich die luminalen CK8-positiven Zellen v. a. im Randbereich des Organoids befinden und sich die basalen CK5-positiven Zellen von da aus in den Innenbereich ausbreiten.

Maßstabsbalken: 50 µm

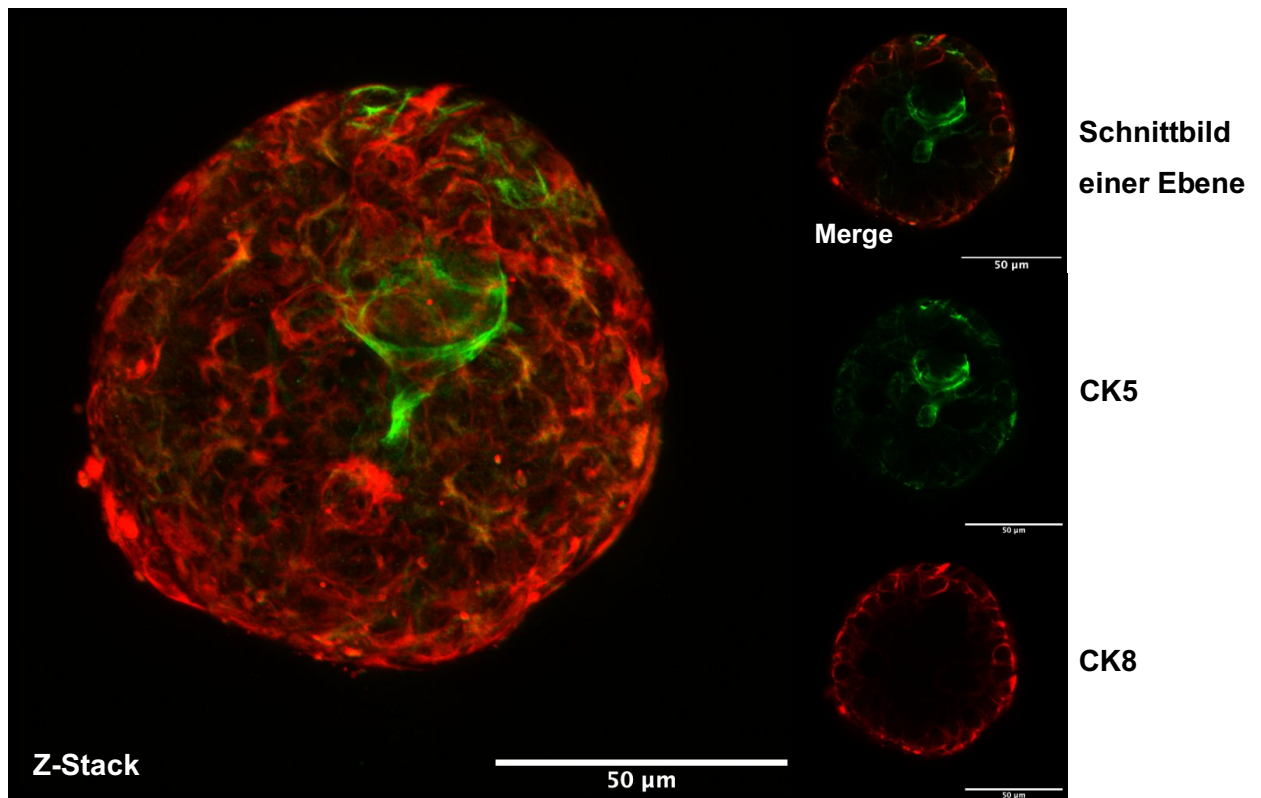


Abbildung 69 Aufnahme (Z-Stack) CK5/CK8 LSM880 mit Airyscan-Detektor von BC97

Wie auch schon in Abbildung 68 zeigt sich eine Verteilung luminaler CK8-positiver Zellen auf den Außenbereich und basaler CK5-positiver Zellen auf den Innenbereich. Eine Überlappung von CK5- und CK8-angefärbten Zellen liegt nicht vor.

Maßstabsbalken: 50 µm

Parallel zu CK5 und CK8 wurde auch Perlecan in Kombination mit MMP-15 angefärbt. Wie auch schon in anderen Färbemethoden, wie z. B. den Kryostat- und Paraffinschnitten, zeigte sich auch am LSM, dass Perlecan das Organoid rundum entsprechend einer Basalmembran umgibt (Abbildung 70). MMP-15 ließ sich auch am LSM nicht beurteilen. In Ermangelung einer Negativkontrolle lässt sich auch nicht sagen, ob dies auf ein tatsächliches Fehlen von MMP-15 zurückzuführen ist oder der Antikörper für die Färbungen nicht brauchbar war. Da das MMP-15 Korrelat in der PCR jedoch in allen Organoidlinien positiv nachgewiesen werden konnte, ist ein Versagen des Antikörpers wahrscheinlich. Diese Problematik zeigte sich bereits in den anderen Färbemethoden.

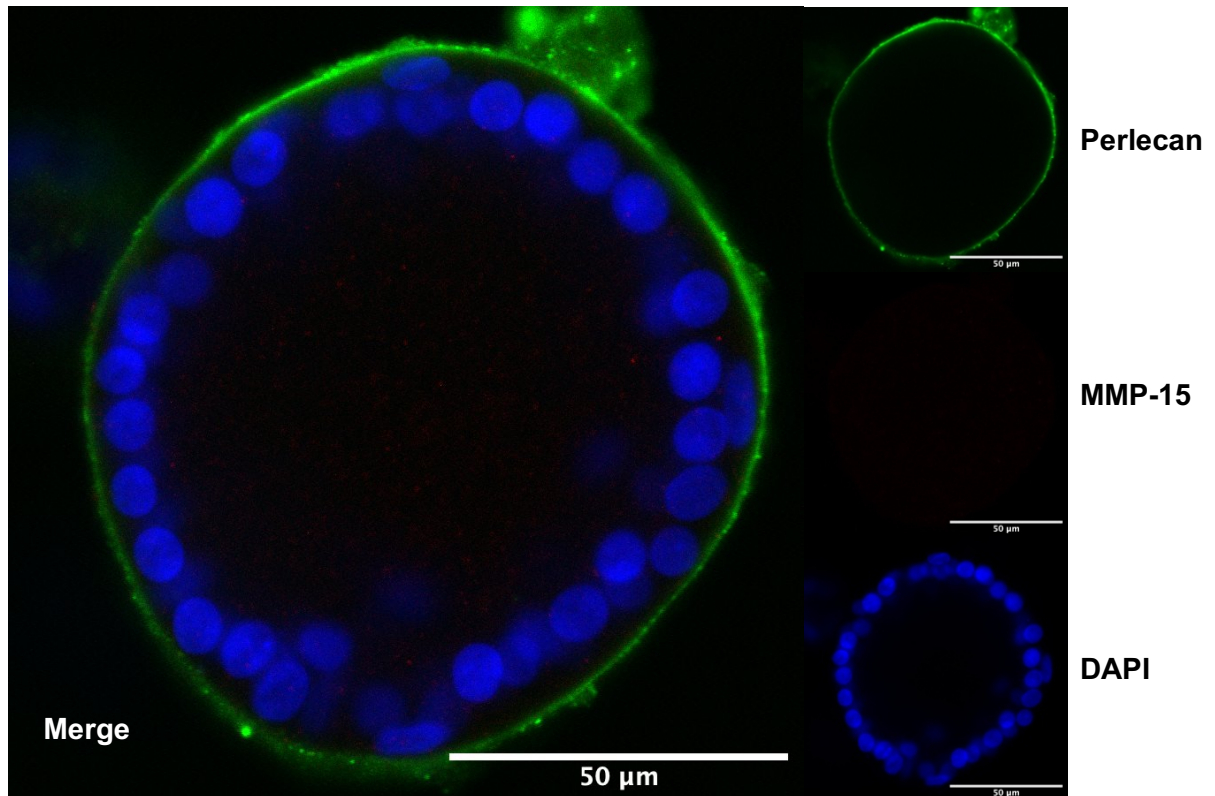


Abbildung 70 Aufnahme Perlecan/MMP-15 LSM880 von BC13

Die Färbung nach Perlecan zeigte auch in der Aufnahme mit dem LSM eine durchgängige, das Organoid rundum umgebende Basalmembranstruktur. MMP-15 ließ sich - wie auch schon in anderen Färbemethoden aufgetreten - nicht anfärben. Das hier dargestellte Organoid weist ein cystisches Muster auf, wie an dem Fehlen von angefärbten Zellkernen im Zentrum zu erkennen ist. Maßstabsbalken: 50 µm

Insgesamt unterstützten die Aufnahmen am LSM deutlich, was die Kryo- und Paraffinschnitte sowie die *Chamberslides* schon zeigten.

IV. Diskussion

Organoide sind vielversprechende Organ-Modelle, die neue Wege in der Forschung eröffnen und in Zukunft einen großen Stellenwert einnehmen können. Durch ihre Abstammung von multipotenten Stammzellen können sie bereits eine Reihe von Organen re-präsentieren und haben eine hohe Potenz hinsichtlich ihrer Vergleich- und Anwendbarkeit auf das Ursprungsgewebe mit sich. Organoide können über mehrere Passagen hinweg zuverlässig in Kultur gehalten werden und bleiben überdies i. d. R. genetisch wie phänotypisch stabil. Ihre Proteinausstattung ähnelt nach heutigem Stand der des Primärgewebes (Drost and Clevers, 2018). Sie können so als realistische *in vitro* Modelle von humanen Organen angewandt werden, an denen über die Grundlagenforschung hinaus auch eine Reihe von spezifischeren Forschungen, wie der Untersuchung von Pathomechanismen oder auch (individualisierte) Medikamententestungen, möglich sind.

Bisher sind jedoch selbst grundlegende Fragen über viele Organoid-Typen noch nicht ausreichend geklärt. Sie können sich je nach Gewebeansprung gegebenenfalls schon in ihrem Aufbau unterscheiden. Während Organoide enteralen Ursprungs bereits gut untersucht sind und schon im klinischen Setting Anwendung finden, so bleiben bei mammalen Organoiden noch einige grundlegende Fragen offen. Die vorliegende Arbeit hat zur Entschlüsselung der Zusammensetzung von Mamma-Ca-Organoiden ihren Teil beigetragen.

Es konnte gezeigt werden, dass Mamma-Ca-Organoide morphologisch genauso unterschiedlich sind wie ihre Primärtumoren und dass sie aus verschiedenen Zelltypen aufgebaut sind, die untereinander Adhärenzkontakte ausbilden und von einer Basalmembran umgeben sind. Die unterschiedliche Expression von basalen bzw. luminalen Markern zeigt die Aufteilung der Mamma-Ca-Organoide in epithelial differenzierte Zellen auf, wie sie auch im menschlichen Organismus zu finden ist.

Nach bereits etablierten Protokollen (Sachs et al., 2018) konnten Mamma-Ca-Organoidlinien zuverlässig etabliert und über mehrere Passagen hinweg in Kultur gehalten werden. Durch ihr stabiles und größtenteils rasches Wachstum eigneten sie sich für verschiedene Untersuchungsmethoden und konnten für molekularbiologische Testungen sowie für Immunfluoreszenzmarkierungen verwendet werden.

IV.1 Wachstum der Organoide

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit den Kulturbedingungen der Gruppe um Clevers (Drost and Clevers, 2018) erfolgreich Organoidlinien aus Mamma generiert und über mehrere Passagen hinweg kultiviert werden konnten.

Die etablierten Linien wuchsen zuverlässig, blieben über lange Zeiträume stabil und erreichten Größen von bis zu 500 μm . Die meisten Organoide bzw. Organoidlinien stoppten ihr Wachstum bei ca. 150 - 200 μm , was möglicherweise auf eine limitierte Diffusionsfähigkeit von Sauerstoff in das Innere des Organoids zurückzuführen ist. Sauerstoff kann nur über eine begrenzte Strecke hinweg per Diffusion in menschlichem Gewebe transportiert werden, die beschriebene Grenze liegt hier bei 100 - 200 μm (Carmeliet and Jain, 2000). Darüber hinaus ist eine Versorgung über Blutgefäße (Angiogenese) notwendig, die in Organoiden noch nicht gewährleistet werden kann. Wie es deshalb möglich ist, dass Mamma-Ca-Organoide Größen entwickeln konnten, die mehr als das Doppelte der Diffusionsgrenze entsprachen, wurde hier nicht geklärt. Teilweise konnte ein Zusammenschluss mehrerer kleinerer Organoide zu einem großen Organoid beobachtet werden, das mehr als 200 μm groß war. Ob dieser Zusammenschluss einen positiven Effekt auf die Versorgung des Organoids haben könnte, kann in weiteren Versuchen überprüft werden.

Es gab auch immer wieder Zellproben, aus denen keine Organoidlinien gewonnen werden konnten. Diese wuchsen entweder sehr langsam und erreichten keine Größen $> 100 \mu\text{m}$ oder stellten das Wachstum nach den ersten Passagen ein. Ein Zusammenhang zwischen dem Tumortyp und dem Organoidwachstumsverhalten konnte nicht festgestellt werden. Sowohl aus Tumoren vom *non-special-type* (NST) als auch aus invasiv-lobulären Karzinomen konnten Organoidlinien generiert werden. Alle untersuchten Organoidtypen waren Östrogenrezeptor (ER) und Progesteronrezeptor (PR) positiv, BC43 sogar zusätzlich HER2 positiv (triple⁺), sodass auch die Rezeptorausstattung der Tumore keine eindeutigen Schlüsse auf das Wachstum der Organoide zulässt.

Es wurden auch Zellen aus gesundem Kontrollgewebe einer präventiven Mastektomie in Organoidkultur genommen (K7). Diese bildeten zwar ebenso Organoide und konnten als Linie mit > 5 Passagen etabliert werden, jedoch wuchsen sie sehr langsam und blieben bei Größen mit weniger als 100 μm . Ob dies auf die Tatsache zurückzuführen ist, dass es sich bei K7 um eine Kontrollzelllinie aus gesundem Brustgewebe einer präventiven Mastektomie handelte, ist nicht sicher zu sagen. Vergleichend mit Organoiden aus

malignem Gewebe konnte aus der K7 zumindest eine Linie generiert werden, während dies bei ähnlich langsam wachsenden Kulturen aus Tumorgewebe nicht möglich war.

Ein weiterer Einflussfaktor auf das Organoidwachstum könnte das verwendete Matrigel (BME Typ II, Cultrex®) als Substituent der Extrazellulärmatrix *in vitro* sein. Die Zusammensetzung aus u. a. Lamininen und Kollagenen bildet das Stützgerüst für die Differenzierung der eingesäten Stammzellen zu Organoiden, eine Interaktion zwischen Matrigel-Komponenten und den Organoidzellen ist nicht auszuschließen. Bisher wird dieser Extrazellulärmatrix-Ersatz noch aus Tumorgewebe des Engelbreth-Holm-Swarm-Tumors (EHS) gewonnen, wodurch noch im Ursprungstumor enthaltene Wachstumsfaktoren vorliegen können, die das Wachstum bestimmter Organoiden beeinflussen können (<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/353200102?lang=de®ion=DE>). Eine Entwicklung und Verwendung von genau definierten synthetischen Matrices kann den Einfluss verbliebener Wachstumsfaktoren in der verwendeten Ersatz-Extrazellulärmatrix minimieren (Gjorevski et al., 2016) - dies wäre auch ein wichtiger Schritt hin zur therapeutischen Anwendung von Organoiden im menschlichen Organismus, z. B. im Sinne von Organtransplantationen. Die auf die entsprechende Zellkultur angepasste Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix spielt bei der Entwicklung optimierter Kulturen sicherlich ebenfalls eine tragende Rolle für ein optimales Wachstum der Organoiden.

Eine weitere Frage, die bisher offengeblieben ist, ist, ob es sich bei den generierten Organoiden aus Tumorbiopsien tatsächlich um Organoiden malignen Ursprungs handelt, oder ob in der Gewebeprobe enthaltene gesunde Zellen die Tumor-Organoidkulturen im Verlauf überwachsen. Untersuchungen diesbezüglich haben bereits ergeben, dass in Organoidkulturen aus Tumorgewebe häufig Mixkulturen aus malignem und benignem Gewebe vorliegen (Goldhammer et al., 2019). Für die weitere Qualitätssteigerung von Organoidkulturen ist eine genauere Untersuchung und Entwicklung von Reinkulturen unerlässlich.

Im herkömmlichen, etablierten BC-Medium ist FBS enthalten, was eine genaue Definition der Komponenten des Mediums erschwert und somit einen nicht kalkulierbaren Einfluss auf Versuche haben kann. Deshalb wurden im Verlauf zwei Ansätze mit einem FBS-haltigen und einem FBS-freien BC-Medium verglichen. Hier zeigte sich die Notwendigkeit des Zusetzens von FBS in das BC-Medium, um ein gutes Organoidwachstum zu gewährleisten.

Zukünftige Studien müssen zeigen, welche definierten Wachstumsfaktoren das FBS ersetzen können.

IV.2 Molekularbiologische Expressionsstudien

Die RT-PCR eignete sich zur qualitativen Untersuchung des Vorhandenseins von Transkripten der untersuchten Proteine und Enzyme. Da in der RT-PCR zunächst die RNA isoliert wird, die direkt korrelieren kann mit der tatsächlichen Proteinausstattung, kann auf das Vorhandensein der untersuchten Proteine geschlossen werden. Allerdings muss auch festgehalten werden, dass der Nachweis der Transkripte nicht in jedem Fall das Vorhandensein der Translationsprodukte zur Folge haben muss.

IV.2.1 RT-PCR-Analyse der verschiedenen Laminine

Laminine sind ubiquitäre Bestandteile der Basalmembran und haben durch ihre Zusammensetzung aus drei Ketten eine breite Heterogenität. Je nach Gewebe können bestimmte Laminine mehr oder weniger häufig vorkommen. Genauso wurde in früheren Arbeiten bereits eine veränderte Expression von Lamininen in pathologischen Prozessen beobachtet. So konnte z. B. festgestellt werden, dass ein Switch von Laminin $\beta 2$ hin zu Laminin $\beta 1$ in der Basalmembran von Blutgefäßen invasiver Brusttumore sowie deren Metastasen stattfindet (Holler, 2005, Fujita et al., 2005).

Durch die RT-PCR-Analysen der verwendeten Organoidzelllinien konnte gezeigt werden, dass auch in Mamma-Ca-Organoiden verschiedene Lamininketten durchgängig exprimiert werden. Bis auf die Lamininkette $\gamma 3$ konnten alle anderen Lamininketten in unterschiedlicher Stärke in den verschiedenen Organoidlinien detektiert werden. Laminine sind als solche wichtige Zelladhäsionskontakte, da sie mit Integrinen in direkten Kontakt treten und somit für epitheliale Gewebe unerlässlich sind (Holler, 2005). Der durchgehende Nachweis von Lamininketten in allen Organoidlinien stützt ihren Epithel-ähnlichen Aufbau aus Zellen, die über Zell-Zell-Kontakte miteinander verbunden sind.

Da aber nur eine Untersuchung der Einzelketten vorgenommen wurde, können keine Rückschlüsse auf das Vorkommen von bestimmten heterotrimeren Lamininisoformen und ggf. damit zusammenhängenden pathologischen Prozessen gezogen werden.

IV.2.2 RT-PCR-Analyse der verschiedenen MT-MMPs

Die RT-PCR-Analysen der MT-MMPs erzielten für die verschiedenen untersuchten Organoidlinien unterschiedliche Ergebnisse. Bis auf MMP-15 wurde keine MT-MMP in allen Organoidlinien gleichermaßen nachgewiesen.

MMP-14 und MMP-15 wurden in vorausgegangenen Arbeiten bereits als Marker für eine schlechte Prognose identifiziert, wenn sie in Brusttumoren vermehrt exprimiert wurden (Radisky and Radisky, 2015, Roy and Walsh, 2014). Die mRNA Expression von MMP-14 und MMP-15 korrelierte dabei mit einem schlechten Gesamtüberleben der Patientinnen (McGowan and Duffy, 2008). Über den klinischen Status der Patientinnen dieser Arbeit ist leider nichts bekannt, sodass die RT-PCR-Ergebnisse nicht mit dem Befinden der Patientinnen verglichen werden können. Über die Bedeutung von MMP-16, -17, -24 und -25 in Brusttumoren ist noch nicht viel bekannt. Generell sind MMPs bekanntermaßen am Um- und Abbau der Extrazellulärmatrix beteiligt. Eine von Tumor zu Tumor unterschiedliche Ausstattung an MMPs konnte schon von anderen Arbeitsgruppen festgestellt werden, sodass es nicht verwunderlich ist, dass auch die jeweiligen Organoide diesbezüglich differieren (Roy and Walsh, 2014).

IV.2.3 RT-PCR-Analyse der verschiedenen TIMPs

In früheren Arbeiten konnte eine TIMP-1 Hochregulation und eine verminderte Expression von TIMP-3 als Prädiktoren für ein schlechtes Outcome bei Patientinnen mit Mamma-Ca herausgearbeitet werden, während sich die Expression von TIMP-2 und -4 je nach Tumor unterscheiden konnte und keine nähere Prognosestellung zuließ (Jackson et al., 2017). Für TIMP-4 wurde beobachtet, dass es v. a. in früheren Stadien der Erkrankung vermehrt exprimiert wurde, während es in späteren, invasiven Stadien reduziert vorlag.

In den RT-PCR-Analysen waren alle vier TIMPs in allen Organoidlinien nachzuweisen. TIMP-2 und -3 waren dabei durchgehend mit einer deutlichen Bande nachweisbar, während für zwei Organoidlinien (BC43 und BC60) bei TIMP-1 und -4 unterschiedlich intensive Banden erzeugt werden konnten. Ein Zusammenhang zwischen dem Tumortyp bzw. dem Tumorstadium und der TIMP-Expression in den Organoiden konnte nicht festgestellt werden. Alle Organoide stammten von invasiven Brusttumoren mit einem TNM-Stadium von mindestens pT1 und einem Grading von > 1 ab. Die Organoidlinie BC13 war die einzige mit bekannten Fernmetastasen (cM1) und auch in dieser ließ sich TIMP-4 in der RT-PCR-Analyse nachweisen.

Hier lässt sich ebenfalls kein Vergleich mit dem aktuellen klinischen Status der Patientinnen ziehen, um die RT-PCR-Ergebnisse der TIMPs genauer einzuordnen.

IV.3 Immunfluoreszenzmarkierungen humaner Mamma-Ca-Organoide

IV.3.1 Vergleich von Immunfluoreszenzmethoden

Insgesamt waren die verwendeten Methoden an Kryostat- und Paraffinschnitten, in *Chamberslides* und am LSM-Mikroskop zur Markierung von Proteinkomponenten in Organoiden anwendbar.

Nach anfänglichen Schwierigkeiten mit der Markierung der kryofixierten Schnitte erwies sich auch diese Methode als gut gebräuchlich und ergab aussagekräftige Bilder. Diese Methode hielt sich vom Zeitaufwand im Rahmen und war von der Bildqualität vergleichbar mit den Paraffinschnitten.

An dieser Stelle soll noch einmal die Verwendung von Histogel in Kombination mit TissueTek[®] als ungeeignete Methode für die Immunfluoreszenzmarkierungen hervorgehoben werden. Während Histogel zur Einbettung in Paraffinschnitten bereits weit verbreitet angewandt wird, konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass es zusammen mit TissueTek[®] zu einer Bindung von Zweitantikörpern an unspezifische Strukturen zu führen scheint und somit keine aussagekräftigen Bilder möglich sind.

Während für Paraffinschnitte bekannt ist, dass sie die Bindung von Antikörpern an ihre Zielstrukturen erschweren oder behindern können, ist eine konkrete Ursache für die mangelnde Eignung von Antikörpern in Kryostatschnitten nicht bekannt. Befürchtungen einer möglichen Behinderung der Antikörperbindung in Paraffin-eingebetteten Organoiden ließen sich anhand der Färbeergebnisse bestätigen. Wichtig dabei zu beachten ist, dass nicht alle entstandenen Strukturveränderungen bei der Paraffineinbettung reversibel sind und somit nicht durch eine Antigen-Demaskierung gelöst werden können (Lang, 2013). Einzelne Antikörper, die erfolgreich für die Immunfluoreszenzmarkierung der Kryostatschnitte verwendet wurden, ergaben in den Paraffinschnitten kein Signal, so z. B. Antikörper gegen CK8. Auch Antikörper gegen Laminin α 5 und Laminin β 1, die in den Färbemethoden der Kryostatschnitte und der *Chamberslides* gute Ergebnisse lieferten, brachten in den Paraffinschnitten nur ein sehr schwaches bis gar kein Signal. Ansonsten deckten sich die Bilder der Paraffinschnitte mit ähnlichen Ergebnissen in den Kryostatschnitten oder *Chamberslides*. Aufgrund der mangelnden Vergleichbarkeit mit vorliegenden PCR-Ergebnissen der verwendeten Organoidlinien für die Paraffinschnitte können die Ergebnisse der Fluoreszenzbilder der Paraffinschnitte jedoch nicht abschließend eingeordnet werden.

Die *Chamberslide*-Methode erwies sich trotz der Betrachtung am nicht-konfokalen Mikroskop der im Ganzen gefärbten Organoide als sehr zufriedenstellend. Färbungen waren i. d. R. erfolgreich und ergaben ein gut zu beurteilendes Bild. Im Gegensatz zu den Kryostat- und Paraffinschnitten konnten in den *Chamberslides* mit den Antikörpern gegen MT-MMPs wie MMP-15 oder -24 auch gute Färbeergebnisse erzielt werden. Dies lässt darauf schließen, dass die entsprechenden Antikörper nicht für jede der durchgeführten Immunfluoreszenzmarkierungsmethoden gleich gut geeignet sind und spricht eher gegen ein generelles Fehlen der markierten Zelladhäsionsmoleküle bzw. Proteasen in den untersuchten Organoiden, wenn der Bildnachweis negativ war.

Die im Ganzen gefärbten Organoide in den *Chamberslides* wurden an einem nicht-konfokalen Immunfluoreszenz-Mikroskop ausgewertet, bei dem nur eine zweidimensionale Betrachtung möglich ist. Hier kann zwar das Organoid als Ganzes betrachtet werden, es können jedoch noch keine definitiven Aussagen über die genaue Lokalisation im Organoid getroffen werden. Aufgrund der Dreidimensionalität in den *Chamberslides* konnte es außerdem zu Fluoreszenzüberlagerungen kommen, die das Bild verzerren konnten. Deshalb ist eine genauere Betrachtung der vollständigen Organoide anhand einer anderen Betrachtungsmethode (z. B. Multiphoton-/*Laser-Scan*-Mikroskop) sinnvoll, um den Aufbau genauer aufzuschlüsseln. Die LSM-Aufnahmen boten dabei zusätzlich eine gute Auflösung, bei entsprechend höherem Zeitaufwand. Hier zeigte sich jedoch, dass Markierungen von MMP-15 im Gegensatz zu den *Chamberslides* bei der Betrachtung am LSM nicht detektiert werden konnten. Eine zufriedenstellende Antwort hierauf wurde bislang noch nicht gefunden.

IV.3.2 Aufbau von Organoiden in der IFL

Die Färbungen mit Perlecan, Cytokeratinen und Integrinen geben einen groben Überblick über den Aufbau der Organoide. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Mamma-Ca-Organoide von einer Basalmembran umgeben sind, in basale CK5-positive und lumenale CK8-positive Zellen aufgeteilt sind und diese Aufteilung über das gesamte Organoid konstant ist. In allen angewandten Immunfluoreszenzmarkierungstechniken zeigte sich diese Spezialisierung von Zellen. Die dreidimensionalen Färbemethoden wie die für *Chamberslides*, aber vor allem für die Betrachtung am LSM ermöglichten eine nähere Betrachtung der Verteilung der CK5- und CK8-positiven Zellen im Mamma-Ca-Organoid. In den Schnittbildmethoden (Kryostat- und Paraffinschnitt) waren die unterschiedlich differenzierten Zellen inhomogen über die Organoide verteilt. Perlecan als

Marker für die Basalmembran zeigte, dass die Organoide von einer Basalmembran umgeben sind. So wäre am ehesten zu erwarten, dass die basalen, CK5-exprimierenden Zellen dieser aufsitzen würden. In den durchgeführten Färbungen für die Betrachtung am LSM zeigte sich dies jedoch eher umgekehrt - CK8-positive Zellen waren eher im Randbereich der Basalmembran aufsitzend zu finden anstelle der CK5-positiven. Ob sich hier aber generell CK8-positive Zellen tatsächlich auf den Randbereich und CK5-positive Zellen auf das Zentrum konzentrieren, ließ sich nicht eindeutig nachweisen. Die Verteilung scheint sich je nach Organoid und evtl. abhängig von der Größe des Organoids zu unterscheiden. Die größeren Organoide zeigten eher ein Verteilungsmuster mit CK8-positiven Zellen außen und CK5-positiven Zellen innerhalb des Organoids. Ein möglicher Einflussfaktor könnte zudem die unterschiedlich stark ausgeprägte Penetration der Antikörper in das Organoid während des Färbeprozesses sein. In diesem Falle würden die Ergebnisse der LSM-Färbungen nicht die exakte Wirklichkeit der Verteilung der Cytokeratine im Organoid widerspiegeln.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Zellen innerhalb eines Mamma-Ca-Organoids über Integrine miteinander verbunden sein können, sowie im Organoid weitere für Epithelien wichtige Bestandteile wie Laminine enthalten sind. Je nach Integrin-Typ bzw. Lamininkette war das Verteilungsmuster ein anderes. Da es sich bei Lamininen und Integrinen aber um ubiquitär vorkommende Proteine handelt, ist eine Beurteilung der Bilder anhand dessen gut möglich. Die Wahrscheinlichkeit eines Versagens der Färbung bei fehlendem Fluoreszenzsignal ist dabei höher als ein gänzlich fehlendes Fehlen von Integrinen und Lamininen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Organoid aus unterschiedlichen Zellen zu bestehen scheint, die sich in luminale und basale Zellen entsprechend ihrer Cytokeratin-Expression einteilen lassen, und dass es sich um solide Zellverbände handelt, die durch Integrine verbunden und durch eine Basalmembran umgeben sind. Färbungen mit Antikörpern gegen extrazelluläre MT-MMPs und TIMPs waren abhängig von der Färbemethode unterschiedlich gut durchführbar. Insgesamt war eine Eignung der verwendeten Antikörper jedoch fraglich.

IV.4 Vergleich von IFL und RT-PCR-Analyse

Wie bereits im Vergleich der Färbemethoden erwähnt, unterschieden sich die Methoden zur Immunfluoreszenzmarkierung in ihren Ergebnissen bei gleichen Antikörpern.

So war z. B. in den Kryostatschnitten bei Färbungen nach MMP-15 kein Signal zu sehen, während in den *Chamberslides* mit gleichem Antikörper deutlich MMP-15 markiert werden konnte. Die RT-PCR-Analyse ergab, dass in allen untersuchten Organoidlinien RNA-Produkte für MMP-15 nachgewiesen werden konnten. Dies lässt rückschließen, dass es sich bei den Färbungen der Kryostatschnitte eher um eine mangelnde Eignung der Antikörper handelt als um einen tatsächlichen negativen Nachweis von MMP-15.

Ebenso widersprüchlich waren die Ergebnisse der RT-PCR-Analyse von MMP-17 verglichen mit der Immunfluoreszenzfärbung. Hier war jedoch die RT-PCR-Analyse in der untersuchten Organoidlinie negativ, während durch die Immunfluoreszenzmarkierung ein deutliches Bild (in den *Chamberslides*) generiert werden konnte. Da in anderen Organoidlinien Genprodukte für MMP-17 in der RT-PCR-Analyse nachgewiesen werden konnten, ist dies vermutlich nicht auf einen Fehler in der RT-PCR-Analyse zurückzuführen. Woher diese Diskrepanz kommt, ist bisher noch unklar.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen für TIMPs und Laminine waren i. d. R. mit denen der RT-PCR-Analyse kongruent. Die meisten Laminine sowie die meisten TIMPs waren auch in der RT-PCR-Analyse durchgehend nachzuweisen. Vereinzelt gab es Färbungen, bei denen kein Signal durch die Immunfluoreszenzmarkierung erreicht werden konnte - dies zog sich dann durch alle Organoidlinien und alle Färbungen, so dass von einem Versagen des verwendeten Antikörpers ausgegangen werden kann.

Insgesamt stimmten die Ergebnisse der *Chambersslide*-Färbungen mit denen der RT-PCR-Analyse am besten überein. Hier konnte am häufigsten und am zuverlässigsten ein gutes Bild generiert werden, das die Ergebnisse der RT-PCR-Analyse widerspiegelte. Für die Kryostatschnitte konnte immer wieder beobachtet werden, dass einzelne Färbungen kein Signal erzeugten, was darauf hinweist, dass - genau wie für Paraffinschnitte - nicht alle Antikörper für die Verwendung auf Kryostatschnitten geeignet sind.

Die Färbung von Organoiden in der *Chambersslide*-Methode benötigt kein weiteres Einbetten in ein Einbettmedium, das eine Antikörper-Verteilung bzw. Bindung an Zielstrukturen behindern könnte, so wie TissueTek® (in Kombination mit Histogel) bei den Kryostatschnitten oder Paraffin bei den Paraffinschnitten. Da hier aber keine genaue Betrachtung einer einzelnen Ebene möglich ist und sich Fluoreszenzen überlagern können, kann die *Chambersslide*-Methode kein vollständiger Ersatz für 2D-Techniken wie die der Kryostatschnitte sein, sondern lediglich als Ergänzung dienen.

IV.5 Ausblick

Organoide verbreiten sich als Forschungsobjekte seit einigen Jahren rasant über Arbeitsgruppen der ganzen Welt. Durch ihre phänotypische wie genotypische Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe und ihre Unabhängigkeit vom Mikromilieu *in vivo* stellen Organoiden nicht nur in der Grundlagenforschung einen neuen Meilenstein dar, sondern sind auch für weiterführende Untersuchungen von Pathologien bis hin zur klinischen Anwendung im Sinne einer individualisierten Medizin einsetzbar (Tuveson and Clevers, 2019). Organoiden sind im Vergleich zu anderen Tumormodellen schnell und effektiv zu kultivieren und haben somit vor allem im Bereich der präklinischen Grundlagenforschung über die letzten Jahre Einzug gehalten. Jedoch gibt es schon erste Bestrebungen, individualisierte Medikamententestungen an Organoiden auch im klinischen Setting zu etablieren. So können Organoiden aus rektalen Biopsien dazu beitragen, das Ansprechen von Medikamenten bei Patienten mit Cystischer Fibrose vorauszusagen (Dekkers et al., 2016). Die Ausweitung von Organoidkulturen über Gewebe verschiedensten Ursprungs hat bereits das Anlegen erster Biobanken ermöglicht, die einen breiten Zugriff auf eine Reihe von Organoiden zulassen (<https://huborganoids.nl/organoid-biobank/>). Durch dieses breite Angebot an malignen, pathologischen und physiologischen Organoiden sind Untersuchungen im großen Stil möglich, so z. B. Medikamententestungen *in vitro*. Organoiden gewinnen somit im präklinischen wie im klinischen Setting zunehmend an Bedeutung. In dieser Arbeit konnte bereits ein Ausschnitt dessen gezeigt werden, wie vielseitig Organoiden für verschiedenste Methoden in der Forschung angewandt werden können. Weiterführend bietet sich eine Ausweitung auf eine größere Anzahl an Organoidlinien an, um die Evidenz der Ergebnisse zu erhöhen.

In dieser Arbeit konnte ein erster Baustein hin zur Aufschlüsselung des Aufbaus von Mamma-Ca-Organoiden gesetzt werden. Durch ihre Aufteilung in basale und luminale Zellen, die von einer Basalmembran umgeben und durch Zell-Zell-Kontakte verbunden sind, sowie Aspekte einer extrazellulären Matrix aufweisen, sind sie ihrem Ursprungsgewebe *in vivo* sehr nah und dienen somit als sehr realistische Modelle *in vitro*. Interessant wäre im weiteren Verlauf der noch genauere Aufbau von Organoiden: Wo genau sitzen die Stammzellen? Sind alle der differenzierten Zellen funktionsfähig?

Sowohl für die Ausstattung der Mamma-Ca-Organoiden mit MMPs als auch mit TIMPs würde sich weiterführend ein Vergleich mit dem klinischen Status der Patientinnen als auch mit der Zusammensetzung der Primärtumore anbieten. Da durch frühere Arbeiten

bereits herausgearbeitet werden konnte, dass bestimmte MMPs und TIMPs in frühen wie in späten Stadien von Brusttumoren vermehrt exprimiert werden und mit einer schlechteren Prognose korrelieren, so könnten diese als Forschungsgegenstand für neue prognostische Marker sowie Therapieansätze dienen (Radisky and Radisky, 2015). Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass in Organoiden sowohl MMPs als auch TIMPs nachweisbar sind, könnten sie in Zukunft genutzt werden, um derartige Untersuchungen weiter voranzutreiben.

IV.6 Zusammenfassung

Brustkrebs ist trotz der diagnostischen und therapeutischen Fortschritte der letzten Jahrzehnte immer noch die häufigste Tumorerkrankung unter Frauen mit einer weiterhin signifikanten Mortalität.

Das Organoidmodell ist ein wertvoller Baustein in der Erforschung der Pathogenese und der Entwicklung neuer Forschungskonzepte für Brusttumoren. Durch die gute Vergleichbarkeit von Organoidkulturen mit ihrem Ursprungsgewebe können *in vitro*-Untersuchungen angestellt werden, die nah am menschlichen Individuum Erkenntnisse ermöglichen. Dies kann die Patientenversorgung verbessern und die individualisierte Medizin weiter vorantreiben.

Wie in dieser Arbeit gezeigt, können Brustkrebs-Organoide bereits zuverlässig generiert werden. In den meisten Fällen konnten Stammzellen in Organoidkultur ausgesät werden, die binnen maximal zwei Wochen erste Organoide ausbildeten. Hierbei wurden erfolgreich mehrere gut wachsende Organoide mit Größen bis zu 500 µm erzeugt, die auch nach wiederholten Passagen weiterwuchsen. Es konnte gezeigt werden, dass Organoide essenzielle Bestandteile wie Zell-Zell-Kontakte (Integrine) und Basalmembranbestandteile (Perlecan, Laminine) enthalten und somit Parenchym-ähnlich aufgebaut sind. Auch ubiquitär extrazellulär vorkommende Proteine (MMPs, TIMPs), die sich je nach Gewebe in ihrer Ausprägung unterscheiden können, konnten nachgewiesen werden.

An den etablierten Mamma-Ca-Organoiden konnten verschiedene Untersuchungen vorgenommen werden. Sie waren sowohl für (antikörperbasierte) Färbemethoden als auch für molekulargenetische Techniken gut geeignet sind. In den Immunfluoreszenzmarkierungen konnte eine unterschiedliche Differenzierung von Zellen innerhalb des Mamma-Ca-Organoids in CK5-positive (basale) und CK8-positive (luminale) Zellen nachgewiesen werden. Auch Integrine als Zell-Zell-Kontrakte sowie das Vorhandensein einer Basalmembran mit Bestandteilen wie Perlecan und Lamininen konnte aufgezeigt werden.

Die unterschiedliche Expression von extrazellulären Bestandteilen wie die MMPs und die TIMPs war in den Immunfluoreszenzmarkierungen nicht so zuverlässig darstellbar wie in der RT-PCR-Analyse. In der IFL zeigte sich vereinzelt eine mangelnde Eignung von Antikörpern für spezifische Färbemethoden. Am erfolgreichsten konnten die Antikörper in der *Chamberslide*-Methode angewendet werden. Die RT-PCR-Analyse zeigte, dass Organoide durchweg die für Parenchyme notwendigen Bestandteile wie Laminine enthielten, und gleichzeitig, dass die Ausstattung an MMPs und TIMPs verschieden sein kann. Diese morphologische Variabilität spiegelt die interindividuell verschiedenen Tumoren der Patientinnen wider.

Die durchgeführte Arbeit konnte darstellen, dass Mamma-Ca-Organoide als geeignetes „Organmodell“ *in vitro* dienen können. Außerdem sind sie eine Basis, um weitere Erkenntnisse über Aufbau und Ausstattung zu gewinnen. Die Bedeutung von Organoiden in der Grundlagen- und in der klinischen Forschung wird hier weiter deutlich. Hierauf aufbauend kann die Entwicklung individualisierter Therapien weiter ausgeweitet werden und neue Schritte in der Mamma-Ca-Therapie zur besseren medizinischen Versorgung der Patientinnen unternommen werden.

V Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die ein Gelingen meiner Dissertation möglich gemacht haben.

Allen voran danke ich Herrn Prof. Dr. Gerd Klein, der mich schon mit dem Themenvorschlag überzeugt hat und von dem ich mich über den ganzen Zeitraum der Arbeit wunderbar betreut gefühlt habe. Ich danke für die stetige Mühe und die genommene Zeit bei der Erstellung dieser Arbeit!

Des Weiteren bedanke ich mich herzlichst bei allen „Haupt- und Nebendarstellern“, die ein Gelingen möglich gemacht haben:

Leander Schwaibold, Svenja Wingerter und Dominik Daub für die geduldige Einarbeitung und für die Klärung und Lösung aller möglichen labortechnischen und organisatorischen Fragen.

Frau Dr. Christine Mayer, die mich ebenfalls mit endloser Geduld unterstützt und gefördert hat und von der ich während der ganzen Ausarbeitung meiner Dissertation eine Menge gelernt habe.

Herrn Dr. André Koch und Frau Ingrid Teufel für die freundliche Mitbetreuung und die Unterstützung bei der Lösung nicht vorhersehbarer technischer Probleme, sowie für die Bereitstellung von Material für ein reibungsloses Gelingen.

Herrn Prof. Dr. Wilhelm K. Aicher für das Bereitstellen von notwendigem Equipment zur Durchführung der Arbeit.

Herrn Daniel Carvajal Berrío für seine Zeit, seine Geduld und seine Freundlichkeit trotz mancher Verzögerung und das schnelle Beantworten von Emails aller Art.

Meiner Mama, die mich immer unterstützt, immer für mich da ist und mir mit einer Engelsgeduld aus allen Layout-Krisen geholfen hat.

Meinem Freund, der sich neben seiner eigenen Doktorarbeit immer wieder die Zeit genommen hat, sich darüber hinaus auch noch mit meiner zu beschäftigen und der mir das Gefühl gibt, alles schaffen zu können.

VI Literaturverzeichnis

- ALEXANDER, C. M., HANSELL, E. J., BEHRENDTSEN, O., FLANNERY, M. L., KISHNANI, N. S., HAWKES, S. P. & WERB, Z. 1996. Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development*, 122, 1723-36.
- ANNES, J. P., MUNGER, J. S. & RIFKIN, D. B. 2003. Making sense of latent TGF β activation. *J Cell Sci*, 116, 217-24.
- ANTONIOU, A., PHAROAH, P. D., NAROD, S., RISCH, H. A., EYFJORD, J. E., HOPPER, J. L., LOMAN, N., OLSSON, H., JOHANSSON, O., BORG, A., PASINI, B., RADICE, P., MANOUKIAN, S., ECCLES, D. M., TANG, N., OLAH, E., ANTONCULVER, H., WARNER, E., LUBINSKI, J., GRONWALD, J., GORSKI, B., TULINIUS, H., THORLACIUS, S., EEROLA, H., NEVANLINNA, H., SYRJÄKOSKI, K., KALLIONIEMI, O. P., THOMPSON, D., EVANS, C., PETO, J., LALLOO, F., EVANS, D. G. & EASTON, D. F. 2003. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*, 72, 1117-30.
- ARTHUR, R. S., WANG, T., XUE, X., KAMENSKY, V. & ROHAN, T. E. 2020. Genetic factors, adherence to healthy lifestyle behavior, and risk of invasive breast cancer among women in the UK Biobank. *J Natl Cancer Inst*; 112, 893-901.
- AUMAILLEY, M., BRUCKNER-TUDERMAN, L., CARTER, W. G., DEUTZMANN, R., EDGAR, D., EKBLUM, P., ENGEL, J., ENGVALL, E., HOHENESTER, E., JONES, J. C., KLEINMAN, H. K., MARINKOVICH, M. P., MARTIN, G. R., MAYER, U., MENEGUZZI, G., MINER, J. H., MIYAZAKI, K., PATARROYO, M., PAULSSON, M., QUARANTA, V., SANES, J. R., SASAKI, T., SEKIGUCHI, K., SOROKIN, L. M., TALTS, J. F., TRYGGVASON, K., UITTO, J., VIRTANEN, I., VON DER MARK, K., WEWER, U. M., YAMADA, Y. & YURCHENCO, P. D. 2005. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol*, 24, 326-32.
- BARNES, B., KRAYWINKEL, K., NOWOSSADECK, E., SCHÖNFELD, I., STARKER, A., WIENECKE, A. & WOLF, U. 2016. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Robert Koch-Institut.
- BARTFELD, S., BAYRAM, T., VAN DE WETERING, M., HUCH, M., BEGTHEL, H., KUJALA, P., VRIES, R., PETERS, P. J. & CLEVERS, H. 2015. In vitro expansion of human gastric epithelial stem cells and their responses to bacterial infection. *Gastroenterology*, 148, 126-136.e6.
- BEHJATI, S., HUCH, M., VAN BOXTEL, R., KARTHAUS, W., WEDGE, D. C., TAMURI, A. U., MARTINCORENA, I., PETLJAK, M., ALEXANDROV, L. B., GUNDEM, G., TARPEY, P. S., ROERINK, S., BLOKKER, J., MADDISON, M., MUDIE, L., ROBINSON, B., NIK-ZAINAL, S., CAMPBELL, P., GOLDMAN, N., VAN DE WETERING, M., CUPPEN, E., CLEVERS, H. & STRATTON, M. R. 2014. Genome sequencing of normal cells reveals developmental lineages and mutational processes. *Nature*, 513, 422-425.
- BIERLEY, J. D. G., MARY K.; WITTEKIND, CHRISTIAN 2017. *TNM Classification of Malignant Tumours*.
- BOJ, S. F., HWANG, C.-I., BAKER, L. A., CHIO, I. I. C., ENGLE, D. D., CORBO, V., JAGER, M., PONZ-SARVISE, M., TIRIAC, H., SPECTOR, M. S., GRACANIN, A.,

- ONI, T., YU, K. H., VAN BOXTEL, R., HUCH, M., RIVERA, K. D., WILSON, J. P., FEIGIN, M. E., ÖHLUND, D., HANDLY-SANTANA, A., ARDITO-ABRAHAM, C. M., LUDWIG, M., ELYADA, E., ALAGESAN, B., BIFFI, G., YORDANOV, G. N., DELCUZE, B., CREIGHTON, B., WRIGHT, K., PARK, Y., MORSINK, F. H. M., MOLENAAR, I. Q., BOREL RINKES, I. H., CUPPEN, E., HAO, Y., JIN, Y., NIJMAN, I. J., IACOBUZIO-DONAHUE, C., LEACH, S. D., PAPPIN, D. J., HAMMELL, M., KLIMSTRA, D. S., BASTURK, O., HRUBAN, R. H., OFFERHAUS, G. J., VRIES, R. G. J., CLEVERS, H. & TUVESON, D. A. 2015. Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell*, 160, 324-338.
- BONNANS, C., CHOU, J. & WERB, Z. 2014. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 786-801.
- CAREY, L. A., METZGER, R., DEES, E. C., COLLICCHIO, F., SARTOR, C. I., OLLILA, D. W., KLAUBER-DEMORE, N., HALLE, J., SAWYER, L., MOORE, D. T. & GRAHAM, M. L. 2005. American Joint Committee on Cancer tumor-node-metastasis stage after neoadjuvant chemotherapy and breast cancer outcome. *J Natl Cancer Inst*, 97, 1137-42.
- CARMELIET, P. & JAIN, R. K. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407, 249-57.
- CASTRO, H. C., ABREU, P. A., GERALDO, R. B., MARTINS, R. C., DOS SANTOS, R., LOUREIRO, N. I., CABRAL, L. M. & RODRIGUES, C. R. 2011. Looking at the proteases from a simple perspective. *J Mol Recognit*, 24, 165-81.
- CHUA, C. W., SHIBATA, M., LEI, M., TOIVANEN, R., BARLOW, L. J., BERGREN, SARAH K., BADANI, K. K., MCKIERNAN, J. M., BENSON, M. C., HIBSHOOSH, H. & SHEN, M. M. 2014. Single luminal epithelial progenitors can generate prostate organoids in culture. *Nat Cell Biol*, 16, 951-961.
- COUSSENS, L. M., FINGLETON, B. & MATRISIAN, L. M. 2002. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*, 295, 2387-92.
- CUI, N., HU, M. & KHALIL, R. A. 2017. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 147, 1-73.
- CURTIS, C., SHAH, S. P., CHIN, S. F., TURASHVILI, G., RUEDA, O. M., DUNNING, M. J., SPEED, D., LYNCH, A. G., SAMARAJIWA, S., YUAN, Y., GRÄF, S., HA, G., HAFARI, G., BASHASHATI, A., RUSSELL, R., MCKINNEY, S., LANGERØD, A., GREEN, A., PROVENZANO, E., WISHART, G., PINDER, S., WATSON, P., MARKOWETZ, F., MURPHY, L., ELLIS, I., PURUSHOTHAM, A., BØRRESENDALE, A. L., BRENTON, J. D., TAVARÉ, S., CALDAS, C. & APARICIO, S. 2012. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 486, 346-52.
- DEKKERS, J. F., ALIEVA, M., WELLENS, L. M., ARIESE, H. C. R., JAMIESON, P. R., VONK, A. M., AMATNGALIM, G. D., HU, H., OOST, K. C., SNIPPERT, H. J. G., BEEKMAN, J. M., WEHRENS, E. J., VISVADER, J. E., CLEVERS, H. & RIOS, A. C. 2019. High-resolution 3D imaging of fixed and cleared organoids. *Nat Protoc*, 14, 1756-1771.
- DEKKERS, J. F., BERKERS, G., KRUISSELBRINK, E., VONK, A., DE JONGE, H. R., JANSSENS, H. M., BRONSVELD, I., VAN DE GRAAF, E. A., NIEUWENHUIS, E. E., HOUWEN, R. H., VLEGGAR, F. P., ESCHER, J. C., DE RIJKE, Y. B., MAJLOOR, C. J., HEIJERMAN, H. G., DE WINTER-DE GROOT, K. M., CLEVERS, H., VAN DER ENT, C. K. & BEEKMAN, J. M. 2016. Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. *Sci Transl Med*, 8, 344ra84.

- DEWARD, A. D., CRAMER, J. & LAGASSE, E. 2014. Cellular heterogeneity in the mouse esophagus implicates the presence of a nonquiescent epithelial stem cell population. *Cell Rep*, 9, 701-711.
- DIEDRICH, K. H., WOLFGANG; JONAT, WALTER; SCHULTZE-MOSGAU, ASKAN; SCHNEIDER, KLAUS-THEO M.; WEISS, JÜRGEN M. 2007. *Gynäkologie und Geburtshilfe*, Springer.
- DROST, J. & CLEVERS, H. 2018. Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer*, 18, 407-418.
- DURBEEJ, M. 2010. Laminins. *Cell Tissue Res*, 339, 259-68.
- EGEBLAD, M. & WERB, Z. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 2, 161-74.
- FISCHER, U. B., FRIEDEMANN 2014. *Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms*, Georg Thieme Verlag.
- FRANTZ, C., STEWART, K. M. & WEAVER, V. M. 2010. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*, 123, 4195-4200.
- FUJII, M., SHIMOKAWA, M., DATE, S., TAKANO, A., MATANO, M., NANKI, K., OHTA, Y., TOSHIMITSU, K., NAKAZATO, Y., KAWASAKI, K., URAOKA, T., WATANABE, T., KANAI, T. & SATO, T. 2016. A colorectal tumor organoid library demonstrates progressive loss of niche factor requirements during tumorigenesis. *Cell Stem Cell*, 18, 827-838.
- FUJITA, M., KHAZENON, N. M., BOSE, S., SEKIGUCHI, K., SASAKI, T., CARTER, W. G., LJUBIMOV, A. V., BLACK, K. L. & LJUBIMOVA, J. Y. 2005. Overexpression of β 1-chain-containing laminins in capillary basement membranes of human breast cancer and its metastases. *Breast Cancer Res*, 7, R411-21.
- GJOREVSKI, N., SACHS, N., MANFRIN, A., GIGER, S., BRAGINA, M. E., ORDONEZ-MORAN, P., CLEVERS, H. & LUTOLF, M. P. 2016. Designer matrices for intestinal stem cell and organoid culture. *Nature*, 539, 560-564.
- GOLDHAMMER, N., KIM, J., TIMMERMANS-WIELENGA, V. & PETERSEN, O. W. 2019. Characterization of organoid cultured human breast cancer. *Breast Cancer Res*, 21, 141.
- GUSTERSON, B. A. & STEIN, T. 2012. Human breast development. *Semin Cell Dev Biol*, 23, 567-73.
- HOHENESTER, E. & YURCHENCO, P. D. 2013. Laminins in basement membrane assembly. *Cell Adh Migr*, 7, 56-63.
- HOLLER, E. 2005. Laminin isoform expression in breast tumors. *Breast Cancer Res*, 7, 166.
- HOLLIDAY, D. L. & SPEIRS, V. 2011. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*, 13, 215.
- HOLMBECK, K., BIANCO, P., CATERINA, J., YAMADA, S., KROMER, M., KUZNETSOV, S. A., MANKANI, M., GEHRON ROBNEY, P., POOLE, A. R., PIDOUX, I., WARD, J. M. & BIRKEDAL-HANSEN, H. 1999. MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell*, 99, 81-92.
- [HTTPS://HUBORGANOIDS.NL/ORGANOID-BIOBANK/](https://huborganoids.nl/organoid-biobank/). *Organoid Biobank* [Online]. <https://huborganoids.nl/organoid-biobank/>: Hubrecht Organoid Technology (HUB). [Accessed 15.04. 2021].
- [HTTPS://WWW.SIGMAALDRICH.COM/CATALOG/PRODUCT/SIGMA/353200102?LANG=DE®ION=DE](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/353200102?LANG=DE®ION=DE). *Cultrex® BME, Type 2 PathClear®* [Online]. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/353200102?lang=de®ion=DE>: Merck KGaA. [Accessed 13.04.2021 2021].

- [HTTPS://WWW.SPEKTRUM.DE/LEXIKON/BIOLOGIE/PROTEASEN/54116#](https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/proteasen/54116#). 1999.
Lexikon der Biologie - Proteasen [Online].
<https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/proteasen/54116#>:
 Spektrum Akademischer Verlag. [Accessed 23.04. 2020].
- HUANG, L., HOLTZINGER, A., JAGAN, I., BEGORA, M., LOHSE, I., NGAI, N., NOSTRO, C., WANG, R., MUTHUSWAMY, L. B., CRAWFORD, H. C., ARROWSMITH, C., KALLOGER, S. E., RENOUF, D. J., CONNOR, A. A., CLEARY, S., SCHAEFFER, D. F., ROEHL, M., TSAO, M.-S., GALLINGER, S., KELLER, G. & MUTHUSWAMY, S. K. 2015. Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids. *Nat Med*, 21, 1364-1371.
- HUBERT, C. G., RIVERA, M., SPANGLER, L. C., WU, Q., MACK, S. C., PRAGER, B. C., COUCE, M., MCLENDON, R. E., SLOAN, A. E. & RICH, J. N. 2016. A three-dimensional organoid culture system derived from human glioblastomas recapitulates the hypoxic gradients and cancer stem cell heterogeneity of tumors found *in vivo*. *Cancer Res*, 76, 2465-2477.
- HUCH, M., DORRELL, C., BOJ, S. F., VAN ES, J. H., LI, V. S. W., VAN DE WETERING, M., SATO, T., HAMER, K., SASAKI, N., FINEGOLD, M. J., HAFT, A., VRIES, R. G., GROMPE, M. & CLEVERS, H. 2013. *In vitro* expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature*, 494, 247-250.
- HYNES, R. O. & NABA, A. 2012. Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4, a004903.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, W., THE GLOBAL CANCER OBSERVATORY (GLOBOCAN). 2014.
https://ci5.iarc.fr/Ci5plus/old/Graph1p.asp?cancer%5B%5D=152&female=2&age_from=1&age_to=18&country%5B%5D=27600000&period=2012&type=1&orientation=1&window=1&grid=1&line=2&scale=0&submit=%C2%A0%C2%A0%C2%A0Execute%C2%A0%C2%A0%C2%A0 [Online]. [Accessed 10.12. 2019].
- IOZZO, R. V. 1998. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem*, 67, 609-52.
- ITOH, Y. 2015. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biol*, 44-46, 207-23.
- JACKSON, H. W., DEFAMIE, V., WATERHOUSE, P. & KHOKHA, R. 2017. TIMPs: versatile extracellular regulators in cancer. *Nat Rev Cancer*, 17, 38-53.
- JI, L.-W., JING, C.-X., ZHUANG, S.-L., PAN, W.-C. & HU, X.-P. 2019. Effect of age at first use of oral contraceptives on breast cancer risk: An updated meta-analysis. *Medicine*, 98, e15719.
- KAMB, A. 2005. What's wrong with our cancer models? *Nat Rev Drug Disc*, 4, 161-165.
- KAPOOR, C., VAIDYA, S., WADHWAN, V., KAUR, G. & PATHAK, A. 2016. Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). *J Cancer Res Ther*, 12, 28-35.
- KESSENBROCK, K., PLAKS, V. & WERB, Z. 2010. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, 141, 52-67.
- KESSLER, M., HOFFMANN, K., BRINKMANN, V., THIECK, O., JACKISCH, S., TOELLE, B., BERGER, H., MOLLENKOPF, H. J., MANGLER, M., SEHOULI, J., FOTOPOULOU, C. & MEYER, T. F. 2015. The Notch and Wnt pathways regulate stemness and differentiation in human fallopian tube organoids. *Nat Commun*, 6, 8989.

- KEYHANI, E., MUHAMMADNEJAD, A. & KARIMLOU, M. 2012. Prevalence of HER-2-positive invasive breast cancer: a systematic review from Iran. *Asian Pac J Cancer Prev*, 13, 5477-82.
- KLEIN, G., SCHMAL, O. & AICHER, W. K. 2015. Matrix metalloproteinases in stem cell mobilization. *Matrix Biol*, 44-46, 175-83.
- KLOKER, L. D., YURTTAS, C. & LAUER, U. M. 2018. Three-dimensional tumor cell cultures employed in virotherapy research. *Oncolytic Virother*, 7, 79-93.
- KREBSGESELLSCHAFT, D. G. F. G. U. G. D. 2020. *interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms* [Online]. <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/032-045OL.html>. [Accessed 19.11. 2020].
- KRETZSCHMAR, K. & CLEVERS, H. 2016. Organoids: modeling development and the stem cell niche in a dish. *Dev Cell*, 38, 590-600.
- LANG, G. 2013. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*, Springer Verlag Wien.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. 2015. *Taschenlehrbuch Histologie*, Thieme.
- MACIAS, H. & HINCK, L. 2012. Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 1, 533-57.
- MAIMETS, M., ROCCHI, C., BRON, R., PRINGLE, S., KUIPERS, J., GIEPMANS, BEN N. G., VRIES, ROBERT G. J., CLEVERS, H., DE HAAN, G., VAN OS, R. & COPPES, ROBERT P. 2016. Long-term *in vitro* expansion of salivary gland stem cells driven by Wnt signals. *Stem Cell Rep*, 6, 150-162.
- MARKOWITZ, S. D. & BERTAGNOLLI, M. M. 2009. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *New Engl J Med*, 361, 2449-2460.
- MCGOWAN, P. & DUFFY, M. 2008. Matrix metalloproteinase expression and outcome in patients with breast cancer: Analysis of a published database. *Ann Oncol*, 19, 1566-72.
- MURPHY, G. 2011. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol*, 12, 233.
- NIK-ZAINAL, S., DAVIES, H., STAAF, J., RAMAKRISHNA, M., GLODZIK, D., ZOU, X., MARTINCORENA, I., ALEXANDROV, L. B., MARTIN, S., WEDGE, D. C., VAN LOO, P., JU, Y. S., SMID, M., BRINKMAN, A. B., MORGANELLA, S., AURE, M. R., LINGJAERDE, O. C., LANGEROD, A., RINGNER, M., AHN, S. M., BOYAULT, S., BROCK, J. E., BROEKS, A., BUTLER, A., DESMEDT, C., DIRIX, L., DRONOV, S., FATIMA, A., FOEKENS, J. A., GERSTUNG, M., HOOIJER, G. K., JANG, S. J., JONES, D. R., KIM, H. Y., KING, T. A., KRISHNAMURTHY, S., LEE, H. J., LEE, J. Y., LI, Y., MCLAREN, S., MENZIES, A., MUSTONEN, V., O'MEARA, S., PAUORTE, I., PIVOT, X., PURDIE, C. A., RAINE, K., RAMAKRISHNAN, K., RODRIGUEZ-GONZALEZ, F. G., ROMIEU, G., SIEUWERTS, A. M., SIMPSON, P. T., SHEPHERD, R., STEBBINGS, L., STEFANSSON, O. A., TEAGUE, J., TOMMASI, S., TREILLEUX, I., VAN DEN EYNDEN, G. G., VERMEULEN, P., VINCENT-SALOMON, A., YATES, L., CALDAS, C., VAN'T VEER, L., TUTT, A., KNAPPSKOG, S., TAN, B. K., JONKERS, J., BORG, A., UENO, N. T., SOTIRIOU, C., VIARI, A., FUTREAL, P. A., CAMPBELL, P. J., SPAN, P. N., VAN LAERE, S., LAKHANI, S. R., EYFJORD, J. E., THOMPSON, A. M., BIRNEY, E., STUNNENBERG, H. G., VAN DE VIJVER, M. J., MARTENS, J. W., BORRESENDALE, A. L., RICHARDSON, A. L., KONG, G., THOMAS, G. & STRATTON, M. R. 2016. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*, 534, 47-54.
- OVERALL, C. M. & KLEIFELD, O. 2006. Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 6, 227-239.

- OVERALL, C. M. & LÓPEZ-OTÍN, C. 2002. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer*, 2, 657-672.
- PAGE-MCCAW, A., EWALD, A. J. & WERB, Z. 2007. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 221-233.
- PETERSEN, O. W. & POLYAK, K. 2010. Stem cells in the human breast. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a003160.
- PHAROAH, P. D., DAY, N. E., DUFFY, S., EASTON, D. F. & PONDER, B. A. 1997. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*, 71, 800-9.
- PICCARD, H., VAN DEN STEEN, P. E. & OPDENAKKER, G. 2007. Hemopexin domains as multifunctional liganding modules in matrix metalloproteinases and other proteins. *J Leukoc Biol*, 81, 870-92.
- POOLA, I., DEWITTY, R. L., MARSHALLECK, J. J., BHATNAGAR, R., ABRAHAM, J. & LEFFALL, L. D. 2005. Identification of MMP-1 as a putative breast cancer predictive marker by global gene expression analysis. *Nat Med*, 11, 481-483.
- RADISKY, E. S. & RADISKY, D. C. 2010. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 15, 201-212.
- RADISKY, E. S. & RADISKY, D. C. 2015. Matrix metalloproteinases as breast cancer drivers and therapeutic targets. *Front Biosci*, 20, 1144-1163.
- RAWLINGS, N. D., BARRETT, A. J. & BATEMAN, A. 2012. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res*, 40, D343-D350.
- REN, W., LEWANDOWSKI, B. C., WATSON, J., AIHARA, E., IWATSUKI, K., BACHMANOV, A. A., MARGOLSKEE, R. F. & JIANG, P. 2014. Single Lgr5- or Lgr6-expressing taste stem/progenitor cells generate taste bud cells ex vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111, 16401-16406.
- RIVERA, S., KHRESTCHATISKY, M., KACZMAREK, L., ROSENBERG, G. A. & JAWORSKI, D. M. 2010. Metzincin proteases and their inhibitors: foes or friends in nervous system physiology? *J Neurosci*, 30, 15337-15357.
- ROCK, J. R., ONAITIS, M. W., RAWLINS, E. L., LU, Y., CLARK, C. P., XUE, Y., RANDELL, S. H. & HOGAN, B. L. M. 2009. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 12771-12775.
- RODRÍGUEZ, D., MORRISON, C. J. & OVERALL, C. M. 2010. Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*, 1803, 39-54.
- ROY, D. M. & WALSH, L. A. 2014. Candidate prognostic markers in breast cancer: focus on extracellular proteases and their inhibitors. *Breast Cancer*, 6, 81-91.
- SACHS, N. & CLEVERS, H. 2014. Organoid cultures for the analysis of cancer phenotypes. *Curr Opin Genet Dev*, 24, 68-73.
- SACHS, N., DE LIGT, J., KOPPER, O., GOGOLA, E., BOUNOVA, G., WEEBER, F., BALGOBIND, A. V., WIND, K., GRACANIN, A., BEGTHEL, H., KORVING, J., VAN BOXTEL, R., DUARTE, A. A., LELIEVELD, D., VAN HOECK, A., ERNST, R. F., BLOKZIJL, F., NIJMAN, I. J., HOOGSTRAAT, M., VAN DE VEN, M., EGAN, D. A., ZINZALLA, V., MOLL, J., BOJ, S. F., VOEST, E. E., WESSELS, L., VAN DIEST, P. J., ROTTENBERG, S., VRIES, R. G. J., CUPPEN, E. & CLEVERS, H. 2018. A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity. *Cell*, 172, 373-386.e10.

- SATO, T., STANGE, D. E., FERRANTE, M., VRIES, R. G. J., VAN ES, J. H., VAN DEN BRINK, S., VAN HOUTD, W. J., PRONK, A., VAN GORP, J., SIERSEMA, P. D. & CLEVERS, H. 2011. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and barrett's epithelium. *Gastroenterology*, 141, 1762-1772.
- SCHMIDT-MATTHIESEN, H. D. WALLWIENER, 2005. *Gynäkologie und Geburtshilfe*, Schattauer.
- SEFTOR, R. E. B., HESS, A. R., SEFTOR, E. A., KIRSCHMANN, D. A., HARDY, K. M., MARGARYAN, N. V. & HENDRIX, M. J. C. 2012. Tumor cell vasculogenic mimicry: from controversy to therapeutic promise. *Am J Pathol*, 181, 1115-1125.
- SEKHON, B. 2010. Matrix metalloproteinases—An overview. *Res Rep Biol*, 2010:1, 1-20.
- SINN, H.-P. & KREIPE, H. 2013. A brief overview of the WHO classification of breast tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care (Basel, Switzerland)*, 8, 149-154.
- SPARANO, J. A., BERNARDO, P., STEPHENSON, P., GRADISHAR, W. J., INGLE, J. N., ZUCKER, S. & DAVIDSON, N. E. 2004. Randomized phase III trial of marimastat versus placebo in patients with metastatic breast cancer who have responding or stable disease after first-line chemotherapy: Eastern Cooperative Oncology Group Trial E2196. *J Clin Oncol*, 22, 4683-4690.
- STETLER-STEVENSON, W. G. 2008. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal*, 1, re6-re6.
- TAKADA, Y., YE, X. & SIMON, S. 2007. The integrins. *Genome Biol*, 8, 215.
- THEOCHARIS, A. D., SKANDALIS, S. S., GIALELI, C. & KARAMANOS, N. K. 2016. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev*, 97, 4-27.
- TORRE, L. A., BRAY, F., SIEGEL, R. L., FERLAY, J., LORTET-TIEULENT, J. & JEMAL, A. 2015. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 65, 87-108.
- TURCO, M. Y., GARDNER, L., HUGHES, J., CINDROVA-DAVIES, T., GOMEZ, M. J., FARRELL, L., HOLLINSHEAD, M., MARSH, S. G. E., BROSENS, J. J., CRITCHLEY, H. O., SIMONS, BENJAMIN D., HEMBERGER, M., KOO, B.-K., MOFFETT, A. & BURTON, GRAHAM J. 2017. Long-term, hormone-responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium. *Nat Cell Biol*, 19, 568-577.
- TUVESON, D. & CLEVERS, H. 2019. Cancer modeling meets human organoid technology. *Science*, 364, 952.
- VIZOSO, F. J., GONZÁLEZ, L. O., CORTE, M. D., RODRÍGUEZ, J. C., VÁZQUEZ, J., LAMELAS, M. L., JUNQUERA, S., MERINO, A. M. & GARCÍA-MUÑIZ, J. L. 2007. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Brit J Cancer*, 96, 903-911.
- VLACHOGIANNIS, G., HEDAYAT, S., VATSIOU, A., JAMIN, Y., FERNÁNDEZ-MATEOS, J., KHAN, K., LAMPIS, A., EASON, K., HUNTINGFORD, I., BURKE, R., RATA, M., KOH, D.-M., TUNARIU, N., COLLINS, D., HULKKI-WILSON, S., RAGULAN, C., SPITERI, I., MOORCRAFT, S. Y., CHAU, I., RAO, S., WATKINS, D., FOTIADIS, N., BALI, M., DARVISH-DAMAVANDI, M., LOTE, H., ELTAHIR, Z., SMYTH, E. C., BEGUM, R., CLARKE, P. A., HAHNE, J. C., DOWSETT, M., DE BONO, J., WORKMAN, P., SADANANDAM, A., FASSAN, M., SANSOM, O. J., ECCLES, S., STARLING, N., BRACONI, C., SOTTORIVA, A., ROBINSON, S. P., CUNNINGHAM, D. & VALERI, N. 2018. Patient-derived organoids model

- treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science*, 359, 920-926.
- WORKMAN, M. J., MAHE, M. M., TRISNO, S., POLING, H. M., WATSON, C. L., SUNDARAM, N., CHANG, C. F., SCHIESSER, J., AUBERT, P., STANLEY, E. G., ELEFANTY, A. G., MIYAOKA, Y., MANDEGAR, M. A., CONKLIN, B. R., NEUNLIST, M., BRUGMANN, S. A., HELMRATH, M. A. & WELLS, J. M. 2017. Engineered human pluripotent-stem-cell-derived intestinal tissues with a functional enteric nervous system. *Nat Med*, 23, 49-59.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), T. G. C. O. G. March 2019. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf> [Online]. [Accessed 10.12. 2019].

VII Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der medizinischen Universitätsklinik Department Innere Medizin II, Abteilung für Hämatologie, Onkologie, Klinische Immunologie und Rheumatologie unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Gerd Klein durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. Gerd Klein.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. Christine Mayer, cand. med. Dominik Daub und Svenja Wingerter von mir eigenständig und in Zusammenarbeit mit Dr. Christine Mayer durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Unterschrift

