

β 1-Integrin-vermittelte Tumor-Stroma-Interaktionen im kolorektalen Karzinom

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Diplom-Biochemikerin
Miriam Widder

geb. am 13.05.1985 in Bad Frankenhausen

Gutachter

1. Prof. Dr. R. A. Benndorf
2. PD Dr. L. P. Müller
3. Prof. Dr. C. Ritter

Halle/Saale, den 05.11.2015

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
1. EINLEITUNG	1
1.1 Das Tumorstroma und dessen Rolle in der Tumorbiologie	1
1.1.1 Tumore – komplexe Organe aus malignen Zellen und Tumorstroma	1
1.1.2 Das 3D-Sphäroidmodell zur Untersuchung von Tumor-Stroma-Interaktionen.....	1
1.1.3 Die Rolle Tumor-assoziiierter Fibroblasten in der Tumorbiologie	2
1.1.4 Möglicher Ursprung Tumor-assoziiierter Fibroblasten.....	4
1.2 Die Rolle von MSC in der Tumorbiologie	4
1.2.1 Vorkommen von MSC im humanen Organismus und generelle Eigenschaften	4
1.2.2 MSC als Teil des Tumorstromas	5
1.3 Das kolorektale Karzinom (CRC) als Modell zur Untersuchung von Tumor-Stroma-Interaktionen.....	7
1.3.1 Grundlegendes zum CRC	7
1.3.2 Die Bedeutung des Tumorstromas für das Wachstum von CRC.....	8
1.4 Zielstellung.....	10
2. MATERIALIEN	11
2.1 Zellen.....	11
2.2 Chemikalien und Materialien.....	11
2.2.1 Allgemeine Chemikalien.....	11
2.2.2 Antikörper	12
2.2.3 Oligonukleotide	13
2.2.4 Plasmide.....	14
2.2.5 Lentivirale shRNA-Partikel	14
2.3 Medien, Puffer und Lösungen.....	15
2.3.1 Medien und Lösungen für die Zellkultur	15
2.3.2 Medien und Puffer	16
2.3.3 Färbelösungen.....	17
2.4 Verbrauchsmaterialien und Geräte	17

3.	METHODEN	18
3.1	Kultivierung von Zelllinien	18
3.2	Isolierung und Kultivierung von MSC	18
3.3	Gewinnung konditionierten Mediums von MSC und CCD18Co	18
3.4	Generierung stabil fluoreszenzmarkierter Zellen	19
3.4.1	Grundlegende Methodik.....	19
3.4.2	Gewinnung und Titerbestimmung lentiviraler Partikel.....	19
3.4.3	Transduktion adhärenter Zellen und Gewinnung stabil fluoreszenz- markierter Klone.....	20
3.5	Generierung stabiler knock-down Zellen	20
3.5.1	Herstellung von $\beta 1$ - <i>Integrin</i> knock-down CRC-Zellen.....	20
3.5.2	Herstellung von $\beta 1$ - <i>Integrin</i> knock-down MSC.....	21
3.5.3	Herstellung von <i>Kollagen I $\alpha 1$</i> knock-down MSC.....	21
3.6	Wachstums- und Zytotoxizitätsanalysen mittels Sulforhodamin B-Assay	21
3.6.1	Wachstumsanalysen mittels Sulforhodamin B-Assay.....	22
3.6.2	Zytotoxizitätsanalysen mittels Sulforhodamin B-Assay.....	22
3.7	Tumorigenitätsassay mittels Soft-Agar	22
3.8	Analyse des Differenzierungspotentials von MSC	23
3.9	Durchflusszytometrische Untersuchung von Oberflächenmarkern des Immunphänotyps von MSC	24
3.10	<i>In vitro</i>-Analyse der Proliferation von CRC-Zellen in Abhängigkeit von MSC ...	24
3.10.1	Proliferation von CRC-Zellen in direkter Kokultur mit MSC.....	24
3.10.2	Proliferation von CRC-Zellen bei Präsenz von konditioniertem Medium von MSC.....	25
3.11	Kultivierung von CRC-Zellen im 3D-Kulturmodell	25
3.11.1	Etablierung des 3D-Kulturmodells mittels Acid-Phosphatase-Assay.....	25
3.11.2	Generierung von 3D-Mischkulturen.....	26
3.11.3	Zusätze für die 3D-Kultur.....	26
3.12	<i>In vitro</i>-2D-Assay zur Analyse der Adhäsion von CRC-Zellen an MSC	27
3.13	Western-Blot-Analysen	27
3.14	Quantitative <i>real-time</i> PCR	28

3.15	Tierversuche	29
3.15.1	Generierung subkutaner Xenografte	30
3.15.2	Analyse der β 1-Integrin-abhängigen Lungenmetastasierung von CRC-Zellen an MSC	30
3.15.3	Nicht-invasives <i>in vivo</i> multispektral-Fluoreszenzimaging.....	31
3.16	Histologische Untersuchungen von 3D-Kulturen, Xenograften und Lungen.....	32
3.16.1	Paraffin-Einbettung von 3D-Kulturen, Lungen und Xenograften	32
3.16.2	Anfertigung von Gewebedünnschnitten	32
3.16.3	Hämatoxylin- & Eosin-Färbung	33
3.16.4	Immunhistochemische Färbung.....	33
3.16.5	AZAN-Färbung	33
3.17	Mikroskopische Untersuchung und Bildgebung	34
3.17.1	Fotodokumentation von 2D- und 3D-Kulturen sowie Lungen	34
3.17.2	Analyse von Mitosen in Xenograften	34
3.18	Statistische Analysen.....	34
3.18.1	Gemischt-lineares Modell zur Bestimmung der MSC-vermittelten Wachstumsförderung von CRC-Xenograften	34
3.18.2	Weitere statistische Analysen.....	35
4.	ERGEBNISSE	36
4.1	Der Einfluss von MSC auf das Wachstum von CRC-Xenograften <i>in vivo</i>.....	36
4.1.1	MSC vermitteln eine Wachstumsförderung von CRC im Nacktmausmodell.....	36
4.1.2	Gemischt-lineares Modell zur MSC-vermittelten Wachstumsförderung von CRC im Nacktmausmodell.....	37
4.1.3	MSC vermitteln die Wachstumsförderung von CRC während einer frühen Phase des Xenograftwachstums	38
4.1.4	Die MSC-vermittelte Wachstumsförderung von CRC beruht nicht ausschließlich auf dem immunregulatorischen Potential von MSC.....	41
4.2	Der Einfluss von MSC auf die Proliferation von CRC-Zellen <i>in vitro</i>	42
4.2.1	Die direkte Kultivierung mit MSC führt nicht zu einem Proliferationsvorteil von CRC-Zellen	42
4.2.2	Weitere Analysen zum Einfluss von MSC auf die Proliferation von CRC-Zellen.....	43

4.3	Der Einfluss von MSC auf die Sphäroidbildung E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen <i>in vitro</i>	44
4.3.1	Etablierung der 3D-Kultur von CRC-Zellen.....	44
4.3.2	MSC vermitteln die Sphäroidbildung in per se zur Sphäroidbildung unfähigen CRC-Zellen.....	45
4.3.3	Das frühe nekrotische Absterben Sphäroid-integrierter MSC bestätigt deren frühen Einfluss auf CRC-Zellen.....	46
4.3.4	ECM vermittelt die Sphäroidbildung in per se zur Sphäroidbildung unfähigen CRC-Zellen.....	48
4.3.5	MSC-sezerniertes Kollagen I vermittelt die Sphäroidbildung in per se zur Sphäroidbildung unfähigen CRC-Zellen.....	50
4.3.6	MSC vermitteln die Sphäroidbildung spezifisch in E-Cadherin-dysfunktionalen CRC-Zellen.....	51
4.4	Der Einfluss von β1-Integrin auf die MSC-vermittelte Sphäroidbildung E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen <i>in vitro</i>	54
4.4.1	Die Blockade von β 1-Integrin, nicht aber VCAM-1, hebt die MSC-vermittelte Sphäroidbildung E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen auf.....	54
4.4.2	Die MSC-vermittelte Sphäroidbildung E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen bedingt MSC-exprimiertes β 1-Integrin.....	55
4.4.3	Die MSC-vermittelte Sphäroidbildung E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen bedingt CRC-exprimiertes β 1-Integrin.....	57
4.5	Der Einfluss von β1-Integrin auf die MSC-vermittelte Wachstumsförderung spezifischer E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen <i>in vivo</i>	59
4.5.1	MSC vermitteln die Wachstumsförderung <i>in vivo</i> auch in der weiteren E-Cadherin-dysfunktionalen CRC-Zelllinie Colo320DM.....	59
4.5.2	CRC-exprimiertes β 1-Integrin ist relevant für die MSC-vermittelte Wachstumsförderung α -Catenin-defizienter CRC-Zellen <i>in vivo</i>	60
4.5.3	MSC-exprimiertes β 1-Integrin ist nicht ausschließlich relevant für die Wachstumsförderung α -Catenin-defizienter CRC-Zellen <i>in vivo</i>	62
4.5.4	CRC-exprimiertes β 1-Integrin ist relevant für die frühe Adhäsion α -Catenin-defizienter CRC-Zellen an MSC.....	63
4.5.5	CRC-exprimiertes β 1-Integrin ist relevant für eine MSC-induzierte Erhöhung der Mitoserate in Xenograften α -Catenin-defizienter CRC-Zellen.....	66

5.	DISKUSSION	70
5.1	Wesentliche Resultate	70
5.2	Die Förderung des frühen Wachstums von CRC durch MSC	71
5.2.1	Die spezifische Wachstumsförderung des CRC durch MSC unabhängig von deren immunregulatorischem Potential.....	71
5.2.2	Die frühe MSC-vermittelte Wachstumsförderung des CRC.....	73
5.2.3	Die Rolle von MSC beim Aufbau der Tumorarchitektur E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen	74
5.3	Die Interaktionspartner zwischen MSC und CRC	76
5.3.1	β 1-Integrin als Interaktionspartner auf Seiten der CRC-Zellen.....	76
5.3.2	β 1-Integrin als Interaktionspartner auf Seiten der MSC.....	79
5.3.3	Kollagen I als Interaktionspartner auf Seiten der MSC	81
5.4	Die Effekte der Interaktion zwischen MSC und α-Catenin-defizienten CRC-Zellen	82
5.4.1	Einfluss der Interaktion auf die Metastasierung α -Catenin-defizienter CRC-Zellen.....	82
5.4.2	Einfluss der Interaktion auf die Proliferation α -Catenin-defizienter CRC-Zellen.....	84
5.5	Stellenwert der Arbeit/Methodische Aspekte	87
6.	ZUSAMMENFASSUNG	88
7.	AUSBLICK	89
8.	LITERATUR	90
9.	ANHANG	102
	Abbildungen	102
	Tabellen	113
	Erklärung	115
	Danksagung	116
	Lebenslauf	117
	Publikationsliste	119

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Länder, Chemikalien, SI-Einheiten sowie Puffer und Medien werden nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt. Für Fachtermini wurden die in der englischen Fachliteratur gebräuchlichen Abkürzungen verwendet. Genbezeichnungen sowie aus dem Englischen oder dem Lateinischen übernommene Begriffe und Namen werden in der Arbeit kursiv hervorgehoben.

Abb.	Abbildung
ADM	Adipogenes Differenzierungsmedium
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
Aph	<i>Acid Phosphatase</i>
AZAN	Färbung mit Azokarmin und Anilinblau-Orange G
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Differenzierungscluster
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cM	konditioniertes Medium
CMV	Cytomegalievirus
CRC	Kolorektales Karzinom
CXCL	C-X-C Motiv-Chemokin-Ligand
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	Grünfluoreszierendes Protein (<i>enhanced</i> -Variante)
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
FAP	<i>Fibroblast Activation Protein</i>
FC	Durchflusszytometrie
FI	Fluoreszenzintensität
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum

GAPDH	<i>Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase</i>
GVHD	<i>Graft-Versus-Host-Disease</i>
HE	Hämatoxylin- & Eosin-Färbung
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
<i>hMLH1</i>	<i>human mutL homolog 1 (DNA-mismatch-Reparaturgen)</i>
<i>hMSH2</i>	<i>human mutS homolog 2 (DNA-mismatch-Reparaturgen)</i>
HNPCC	Hereditäres Nicht-Polyposis-assoziiertes Kolorektales Karzinom
HRP	Meerrettichperoxidase
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
i.v.	intravenös
IGF-1/2	<i>Insulin-like Growth Factor 1/2</i>
IHC	Immunhistochemie
IL-6	Interleukin-6
kd	knock-down
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
<i>Kol I $\alpha 1$</i>	<i>Kollagen I $\alpha 1$</i>
LP	Langpass (-Filter)
LTR	<i>Long Terminal Repeats</i>
MAPK	Mitogen-Aktivierte Proteinkinase
MMP	Matrix-Metalloproteasen
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSC	Mesenchymale Stammzelle
msFI	nicht-invasives <i>in vivo</i> multispektral-Fluoreszenzimagining
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NOG-Maus	NOD/Shi- <i>scid</i> /IL-2R γ^{null} -Maus
OD	Optische Dichte
ODM	Osteogenes Differenzierungsmedium

PD	Populationsverdopplung
PDGF(R)	<i>Platelet Derived Growth Factor (Receptor)</i>
PDT	Populationsverdopplungszeit
PE	Phycoerythrin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative <i>real-time</i> Polymerasekettenreaktion
<i>Ras</i>	<i>Rat sarcoma</i>
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROI	<i>Region Of Interest</i>
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SDF-1	<i>Stromal cell-Derived Factor 1</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SRB	Sulforhodamin B
Stabw	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TAF	Tumor-assoziierte Fibroblasten
TBP	TATA-Box-Bindeprotein
TCA	Trichloressigsäure
TGF- β	<i>Transforming Growth Faktor-β</i>
TLR-4	<i>Toll Like Receptor-4</i>
VEGF(R)	<i>Vascular Endothelial Growth Factor (Receptor)</i>
WB	Western-Blot
WT	Wildtyp
α -SMA	<i>alpha-Smooth Muscle Actin</i>
2D/3D	2-dimensional/3-dimensional

1. EINLEITUNG

1.1 Das Tumorstroma und dessen Rolle in der Tumorbiologie

1.1.1 Tumore – komplexe Organe aus malignen Zellen und Tumorstroma

Nach der Definition von Hanahan und Weinberg zeichnet sich ein Tumor durch sechs allgemeingültige Charakteristika der malignen Zellen – den *hallmarks of cancer* – aus. Dazu zählen u.a. die Resistenz gegen Apoptose, die Induktion von Angiogenese und die Autarkie in der Proliferation (Hanahan und Weinberg 2000). Der traditionelle Blick auf Tumore, mit ausschließlicher Konzentration auf maligne Zellen, hat sich in den letzten 15 Jahren weiterentwickelt. Hanahan und Weinberg ergänzten die *hallmarks of cancer* 2011 um den Begriff des Tumorstromas, dem Tumormikromilieu, das die malignen Zellen umgibt (Hanahan und Weinberg 2011). Ein Tumor wird nicht ausschließlich als Gesamtheit der malignen Zellen angesehen, sondern als komplexes Organ, in dem nicht-maligne Zellen der Mikroumgebung eine entscheidende Rolle einnehmen. Diese setzt sich vorrangig aus Fibroblasten, Endothelzellen, Perizyten, Zellen des Immunsystems und extrazellulärer Matrix (ECM) zusammen. Zwischen Tumorzellen und den einzelnen Bestandteilen der Mikroumgebung liegt ein komplexer wechselseitiger Kontakt (*cross-talk*) vor, der an die physiologische Wundheilung erinnert (Liotta und Kohn 2001). Durch diese Interaktion wird ein reaktives Stroma aufgebaut, das sich durch eine gesteigerte Sezernierung inflammatorischer Signale, eine aktive Neoangiogenese, eine erhöhte Anzahl fibroblastenähnlicher Zellen und eine aktive Produktion von ECM auszeichnet (Spaeth *et al.* 2008; Rønnov-Jessen *et al.* 1996; Tlsty und Hein 2001). Durch dieses reaktive Stroma wird in komplexer Weise die Entartung eines normalen Epithels über eine prä-maligne Dysplasie bis hin zu einem invasiven, metastasierenden Karzinom begünstigt.

1.1.2 Das 3D-Sphäroidmodell zur Untersuchung von Tumor-Stroma-Interaktionen

Durch die komplexe Architektur von Tumoren wird bewusst, dass die 2D-Kultivierung von Zellen als Monolayer kein optimales *in vitro*-Modell zur Analyse der Tumorbiologie darstellt. Untersuchungen mittels 2D-Kulturen *in vitro* lassen sich nur schwer auf 3D-wachsende, solide Tumore *in vivo* translätieren. Der *in vivo*-Zustand kann besser simuliert werden, wenn Zellen *in vitro* mit der *Liquid-Overlay*-Methode kultiviert werden, wobei deren Adhäsion an die Zellkulturoberfläche durch die Beschichtung mit Agarose verhindert wird. Die Zellen wachsen nicht mehr in einem 2D-Zellverband, sondern nehmen ein 3D-Wachstum als multizelluläres Sphäroid ein (Yuhas *et al.* 1977).

Tumorzellen, die als Sphäroid wachsen, zeigen Wachstumskinetiken (Landry *et al.* 1982), Stoffwechselraten (Sutherland 1988) und Resistenzen gegenüber Bestrahlung (Sutherland und Durand 1976) und Chemotherapie (Nederman 1984 a), die vergleichbar mit denen von Tumorzellen *in vivo* sind. Die intrinsischen Charakteristika der Tumorzellen erreichen durch die Kultivierung im Sphäroid einen *in vivo*-ähnlichen Zustand. Dabei spielen interzelluläre

sowie Zell-Matrix-Interaktionen und die Differenzierung der Zellen innerhalb des Sphäroids eine entscheidende Rolle (Sutherland 1988; Ghosh *et al.* 2005; Nederman *et al.* 1984 b). Strukturell sind Sphäroide durch proliferierende Zellen in der Peripherie und ruhende Zellen im Zentrum gekennzeichnet. Es liegen nach innen abnehmende Gradienten von Sauerstoff und Nährstoffen sowie nach außen abnehmende Gradienten von Stoffwechselprodukten vor (Friedrich *et al.* 2007 a). Ab einer gewissen Größe setzt im Sphäroidkern Apoptose bzw. Nekrose ein. Das Sphäroidmodell entspricht damit den biologischen Verhältnissen avaskulärer Tumorregionen bzw. Mikrometastasen (Abb. 1.1; Friedrich *et al.* 2007 a) und stellt durch den intermediären Charakter zwischen 2D-Zellkultur und *in vivo*-Tumoren ein anerkanntes Modell zur Untersuchung der Tumorbiologie *in vitro* dar (Kunz-Schughart 1999; Mueller-Klieser 1997).

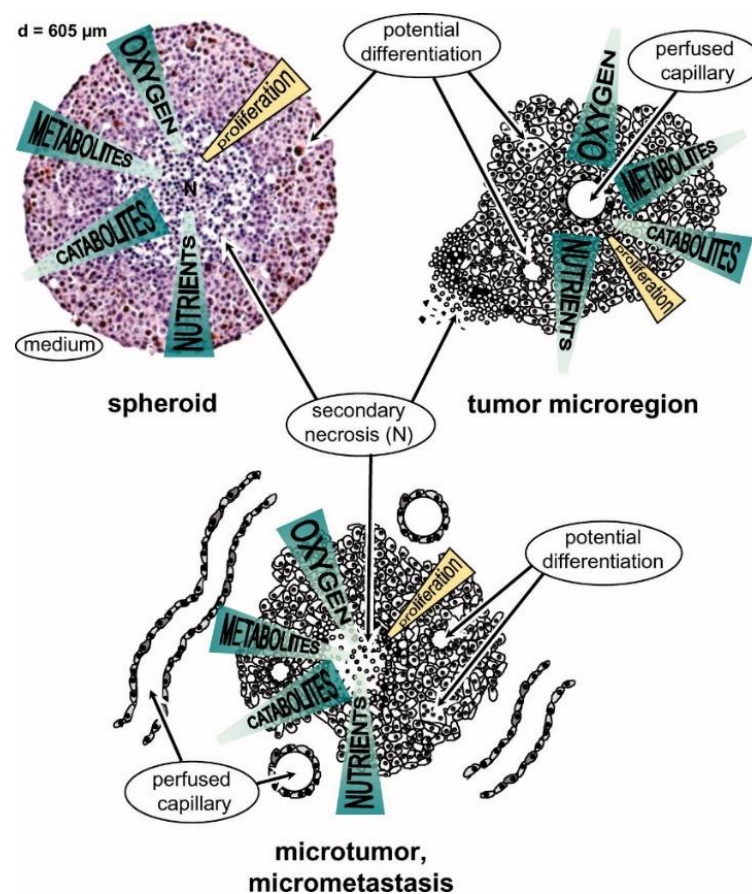


Abb. 1.1: Darstellung der Analogie von Sphäroiden und Mikrometastasen anhand ausgewählter Gradienten. Aus Friedrich *et al.* 2007 a

1.1.3 Die Rolle Tumor-assoziiierter Fibroblasten in der Tumorbiologie

Eine besondere Rolle im Tumorstroma nehmen Fibroblasten ein. Im gesunden Gewebe stellen Fibroblasten nicht-vaskuläre, nicht-epitheliale und nicht-inflammatorische Zellen dar (Tarin und Croft 1969). Wichtige Funktionen dieser Zellpopulation sind die Produktion und der proteolytische Umbau von ECM sowie die Regulation von Entzündungsprozessen und Wundheilung (Angeli *et al.* 2009), während der sie einen kontraktilen Phänotyp annehmen und sich durch eine gesteigerte Produktion von ECM auszeichnen (Darby *et al.* 2014).

Neben gesundem Gewebe lassen sich Fibroblasten auch in soliden Tumoren nachweisen. Einhergehend mit der Analogie zwischen Tumoren und Wundgewebe (Dvorak 1986) besitzen sie innerhalb des Tumorstromas einen veränderten Phänotyp, der an den der Wundheilung erinnert (Kalluri und Zeisberg 2006; Xouri und Christian 2010). Diese aktivierten Fibroblasten des Tumorstromas werden als Tumor-assoziierte Fibroblasten (TAF) bezeichnet (Mueller und Fusenig 2004). TAF sind spindelförmige mesenchymale Zellen, die durch die Expression bestimmter Marker wie α -SMA (α -Smooth Muscle Actin), Vimentin und FAP (*Fibroblast Activation Protein*) gekennzeichnet sind (Garin-Chesa *et al.* 1990; Lazard *et al.* 1993), und denen ein Einfluss bei der Realisierung der *hallmarks of cancer* zugesprochen wird:

Es wurde gezeigt, dass TAF einen Einfluss auf die Initiierung des Tumorwachstums nehmen, da sie im Gegensatz zu normalen Fibroblasten u.a. die Proliferation und maligne Transformation von Prostataepithelzellen fördern, was letztlich zur Entstehung von Tumoren führt (Olumi *et al.* 1999).

Weiterhin wird TAF eine Bedeutung in der Progression des Tumorwachstums zugeschrieben. In Xenograftexperimenten mit Mammakarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass durch die Koinjektion der Tumorzellen mit TAF, nicht aber mit normalen Fibroblasten, ein stärkeres Xenograftwachstum erreicht wird (Orimo *et al.* 2005). Es wurde zudem gezeigt, dass TAF eine Vielzahl löslicher Faktoren exprimieren, die die Proliferation und Differenzierung epithelialer Zellen fördern und somit Einfluss auf das Tumorwachstum nehmen können (Bhowmick *et al.* 2004).

Außerdem ist bekannt, dass TAF eine Funktion in der Angiogenese von Tumoren übernehmen. Es wurde gezeigt, dass fibroblastäre Zellen des Tumorstromas VEGF exprimieren (Fukumura *et al.* 1998). VEGF ist der prominenteste Mediator der Angiogenese. Es hat einen Effekt auf die Proliferation von Endothelzellen und deren Motilität. Die Angiogenese ist entscheidend für die Tumorprogression, da der Tumor zum einen über Gefäße mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt wird und zum anderen, da Gefäße die Grundvoraussetzung für die Metastasierung darstellen (Carmeliet und Jain 2000; Folkman 2003).

TAF spielen weiterhin eine Rolle bei der Invasion von Tumorzellen. So fördern sie die für die Metastasierung nötige Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) in Tumorzellen durch die Expression von HGF und TGF- β (Bhowmick *et al.* 2004) vermutlich über den Smad-Signalweg (Yu *et al.* 2014). Außerdem wurde gezeigt, dass TAF aufgrund der Expression von Matrix-Metalloproteasen (MMP) und dem gewebsspezifischen Plasminogen-Aktivator ein proteolytisches Potential besitzen (Joyce und Pollard 2009). Durch die damit verbundene Degradierung der ECM können TAF die Adhäsion von Tumorzellen an benachbarte Zellen bzw. ECM verändern und somit den Weg für die invasiven Tumorzellen bereiten (Pietras und Östman 2010).

Weiterhin ist ein für TAF beschriebener Einfluss auf die Evasion vor Apoptose bekannt. TAF-exprimiertes IGF-1 und -2 stellen Überlebenssignale für die Tumorzellen dar (Strnad *et al.* 2010; LeBedis *et al.* 2002). Es wird außerdem diskutiert, dass auch die Rigidität der TAF-sezernierten ECM eine Rolle in Überlebenssignalwegen einnimmt (Levental *et al.* 2009).

1.1.4 Möglicher Ursprung Tumor-assoziiierter Fibroblasten

Neben ihrer komplexen Beteiligung bei der Tumorprogression ist auch die Frage nach dem Ursprung der TAF bislang ungeklärt.

Eine Theorie geht von der Aktivierung ansässiger Fibroblasten zu TAF durch Tumor-sezernierte Faktoren wie TGF- β aus. Es konnte gezeigt werden, dass dadurch in Fibroblasten die Expression bestimmter TAF-Marker wie α -SMA induziert wird (Rønnov-Jessen und Petersen 1993).

Eine zweite Hypothese sieht eine EMT der Tumorzellen als Quelle der TAF an. Bestätigt wird dies durch Analysen im Mammakarzinom-Modell: Ein X-chromosomales Inaktivierungsmuster konnte sowohl in Tumor- als auch in Stromazellen identifiziert werden, was auf einen gemeinsamen Ursprung beider Zelltypen hindeutet (Petersen *et al.* 2003). Andere Studien zeigten jedoch, dass bestimmte Mutationen ausschließlich in den epithelialen Zellen des Tumors, nicht aber in den TAF, vorliegen, sodass der gemeinsame Ursprung der Zelltypen fraglich bleibt (Allinen *et al.* 2004).

Daneben gibt es eine weitere Theorie, die über die Beteiligung von Zellen des Knochenmarks (KM) bei der Differenzierung zu TAF diskutiert. Direkze *et al.* konnten zeigen, dass das KM als Quelle für Myofibroblasten in verletzten Geweben wie Lunge oder Nieren agiert (Direkze *et al.* 2003). Verschiedene experimentelle Arbeiten deuten darauf hin, dass Zellen des KM auch einen Teil der Fibroblasten des Tumorstromas bereitstellen können (Ishii *et al.* 2003; Direkze *et al.* 2004). Zelluläre Bestandteile des KM sind u.a. hämatopoetische (HSC) und mesenchymale Stammzellen (MSC).

1.2 Die Rolle von MSC in der Tumorbiologie

1.2.1 Vorkommen von MSC im humanen Organismus und generelle Eigenschaften

1970 wurden von Friedenstein erstmals multipotente stromale Vorläuferzellen aus KM isoliert. Diese wiesen ein spindelförmiges und klonogenes Wachstum in Kultur auf (Friedenstein *et al.* 1970). Das Differenzierungspotential dieser Zellen in verschiedene mesodermale Linien, wie z.B. Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten veranlasste zur Namensgebung der mesenchymalen Stammzelle – MSC (Caplan 1991). Mittlerweile ist eine Differenzierung von MSC in Hepatozyten (Aurich *et al.* 2007), Neuronen und Astrozyten (Kopen *et al.* 1999; Woodbury *et al.* 2000) sowie in epitheliale Zellen beschrieben (Kotton *et al.* 2001).

Im KM nehmen MSC einen Anteil von deutlich weniger als 1 % aller kernhaltigen Zellen ein (Pittenger *et al.* 1999). Neben dem KM lassen sich MSC aus weiteren Geweben des humanen Organismus isolieren, z.B. aus peripherem Blut, Lungen- und Fettgewebe, dem Herzen, Nabelschnurblut, Fruchtwasser und der Plazenta (Hass *et al.* 2011). Man geht davon aus, dass MSC in den Bindegeweben der meisten Organe existieren (Young *et al.* 1995), wobei sie in vielen Geweben vermutlich als Gefäß-assoziierte Perizyten vorliegen (Crisan *et al.* 2008).

Aufgrund des Fehlens eines unikaten MSC-Markers und der Vielzahl an Isolierungs- und Kultivierungsmöglichkeiten, wurden folgende Konsensus-Kriterien für MSC getroffen (Dominici *et al.* 2006):

1. Plastikadhärenz unter *in vitro*-Standardkulturbedingungen
2. mindestens 95 % der Zellen positiv für die Expression der Oberflächenmarker CD105, CD73 und CD90
3. mindestens 98 % der Zellen negativ für die Expression der Oberflächenmarker CD45, CD34, CD14 oder CD11, CD79a oder CD19, HLA-DR
4. osteogenes, adipogenes und chondrogenes Differenzierungspotential *in vitro*

Durch ihre Beteiligung beim Aufbau einer hämatopoetischen Nische im KM (Muguruma *et al.* 2006) und ihre Fähigkeit, die Proliferation und Differenzierung von HSC zu beeinflussen, wird MSC eine Beteiligung in der Hämatopoese zugesprochen (Valtieri und Sorrentino 2008). Außerdem scheinen MSC eine Rolle in der Wundheilung und Geweberegeneration zu spielen (Sasaki *et al.* 2008). Weiterhin zeichnen sich MSC durch ein immunsuppressives Potential aus (Di Nicola *et al.* 2002; Jiang *et al.* 2005; Spaggiari *et al.* 2006). Aufgrund dieser Eigenschaften besitzen MSC eine enorme klinische Relevanz, beispielsweise in der Behandlung der *Graft-Versus-Host-Disease* (GVHD) nach allogener Stammzelltransplantation (Le Blanc *et al.* 2004). In präklinischen Studien konnte zudem ein positiver Effekt von MSC bei der Behandlung von Myokardinfarkten und Nierenversagen gezeigt werden (Uccelli *et al.* 2008). Ob der therapeutische Effekt von MSC aus deren Differenzierungspotential resultiert, ist durch den fehlenden definitiven Nachweis der MSC im humanen Organismus bislang nicht geklärt. Aus diesem Grund wird im Folgenden unter MSC nicht „mesenchymale Stammzelle“ sondern „multipotente mesenchymale Stromazelle“ verstanden. Es wird vermutet, dass in einigen Fällen die Funktion von MSC nicht auf deren Differenzierung sondern auf von ihnen ausgehenden, parakrinen Effekten beruht (Caplan und Dennis 2006).

1.2.2 MSC als Teil des Tumorstromas

Neben den biologischen Funktionen von MSC im intakten humanen Organismus wird ihnen eine Bedeutung beim Wachstum und der Metastasierung von Tumoren zugeschrieben.

Die Beteiligung von MSC bei der Wundheilung sowie die Analogie zwischen Tumoren und nicht-heilenden Wunden (Dvorak 1986) lassen vermuten, dass MSC eine Rolle während der Tumorbilogie einnehmen können. In experimentellen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass

MSC aktiv zu präformierten Tumoren migrieren, in diese integrieren (Nakamizo *et al.* 2005; Khakoo *et al.* 2006; Komarova *et al.* 2006) und einen Teil des Tumorstromas einnehmen (Studený *et al.* 2002). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass MSC das Potential besitzen, zu TAF zu differenzieren (Mishra *et al.* 2008; Jeon *et al.* 2008). Zudem zeigten diese TAF-differenzierten MSC einen fördernden Einfluss auf das Tumorwachstum im Mammakarzinom-Modell (Mishra *et al.* 2008). Jung *et al.* stützten diese Ergebnisse durch Versuche im Prostatakarzinom-Modell: Tumor-sezernierte Faktoren führten zur Rekrutierung von MSC in den Tumor sowie zur Expression des TAF-Markers SDF-1 in den MSC (Jung *et al.* 2013). Im humanen Organismus liegen indirekte Hinweise für die Tumorintegration von MSC vor. So konnte in präformierten, soliden Tumoren eines Patienten nach allogener Knochenmarktransplantation CD45-negative, nicht-hämatopoetische Zellen des Spenders nachgewiesen werden (Avital *et al.* 2007; Cogle *et al.* 2007).

Der Einfluss Tumor-integrierter MSC auf das Wachstum von Tumoren scheint stark von der Entität und des experimentellen Modells abzuhängen (Übersicht in Klopp *et al.* 2011). In unterschiedlichen Entitäten konnte sowohl eine Hemmung (Khakoo *et al.* 2006) als auch eine Förderung (Djouad *et al.* 2006) des Tumorwachstums nachgewiesen werden. Innerhalb einer Entität scheint der Einfluss von MSC und das Ausmaß dessen Ausprägung abhängig von der verwendeten Zelllinie (Karnoub *et al.* 2007) und auch vom Anteil Tumor-integrierter MSC zu sein (Luetzkendorf *et al.* 2010). Zudem existiert kein allgemeingültiger Mechanismus der Tumorförderung oder -hemmung durch Tumor-integrierte MSC. Es gibt Hinweise auf verschiedene MSC-vermittelte Mechanismen, die Analogien zu denen der TAF aufweisen (siehe 1.1.3): So wurde bereits eine Förderung der Tumorprogression durch MSC-sezernierte pro-angiogene Faktoren und die Induktion der Angiogenese (Suzuki *et al.* 2011; Spaeth *et al.* 2009) sowie durch eine MSC-vermittelte EMT und der damit verbundenen Förderung der Invasion und Metastasierung (Martin *et al.* 2010; Jing *et al.* 2012) beschrieben. Die Rolle von MSC bei der Metastasierung wird durch deren mögliche Präsenz in einer prä-metastatischen Nische, in der sie optimale Bedingungen für die Invasion und Adhäsion metastasierender Tumorzellen vorbereiten, untermauert (Psaila und Lyden 2009).

Die genaue Untersuchung von Tumor-Stroma-Interaktionen könnte die Möglichkeit bieten, gezielt in diese einzugreifen und sie als Therapieziele zu nutzen. Die getroffenen Aussagen hinsichtlich der möglichen Beteiligung in der Tumorbiologie bestätigen, dass MSC ein ideales Stroma-Modell für experimentelle Untersuchungen darstellen, wobei die Ausprägung der MSC-vermittelten Effekte entitätenabhängig betrachtet werden muss. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf Tumor-Stroma-Interaktionen des kolorektalen Karzinoms gelegt, da es als solider Tumor vermutlich vom Stroma im Wachstum beeinflusst wird.

1.3 Das kolorektale Karzinom (CRC) als Modell zur Untersuchung von Tumor-Stroma-Interaktionen

1.3.1 Grundlegendes zum CRC

Das kolorektale Karzinom (CRC) ist weltweit die dritthäufigste maligne Erkrankung bei Männern und die zweithäufigste bei Frauen. Für beide Geschlechter zusammengefasst ergeben sich rund 1,3 Millionen Neuerkrankungen und fast 0,7 Millionen Todesfälle pro Jahr (Ferlay *et al.* 2014). Die Häufigkeit des Auftretens von CRC steigt mit zunehmendem Alter: Zum Zeitpunkt der Diagnose liegt das der männlichen Patienten im Median bei 68 und das der weiblichen bei 72 Jahren (Siegel *et al.* 2012).

Im Gegensatz zu anderen Entitäten liegt beim CRC kein Einzelrisikofaktor vor. Es ist ein Zusammenspiel vieler Faktoren, die letztlich zur Ausbildung von CRC führen, z.B. entzündliche Darmerkrankungen, Rauchen, ein exzessiver Alkoholkonsum, ein übermäßiger Konsum von rotem Fleisch und Fettleibigkeit (Brenner *et al.* 2014). Ein sportlich-aktiver Lebensstil sowie die frühzeitige Vorsorge durch endoskopische Untersuchungen werden als präventive Maßnahmen gegen die Entstehung von CRC diskutiert (Brenner *et al.* 2014).

Die Entwicklung von CRC geht in den meisten Fällen von dysplastischen Adenomen in Form gutartiger, sessiler Polypen der Darmschleimhaut aus. Diese entwickeln sich meist über mehrere Jahrzehnte (Jass 2007), wobei dies bei 70 % aller CRC mit Mutationen korreliert, die zu einer konstitutiven Aktivierung des Wnt-Signalwegs führen, z.B. der sporadischen Mutation im Tumor-Suppressorgen *APC* (Kinzler und Vogelstein 1996). *APC* ist als Teil des Wnt-Signalwegs am Abbau von β -Catenin beteiligt. Ist *APC* mutiert, findet dieser Abbau nicht statt. Die Folgen sind die nukleäre Lokalisation von β -Catenin und die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren LEF1/Tcf, wodurch Wnt-Zielgene (z.B. Regulatoren des Zellzyklus) konstitutiv exprimiert werden (Logan und Nusse 2004). Anschließend führen weitere Mutationen in Proto-Onkogenen wie *KRAS* oder Tumor-Suppressorgen wie *TP53* zur Entwicklung vom Adenom zum Karzinom (Fearon 2011). Daneben scheint auch die Expression von E-Cadherin eine klinische Relevanz im CRC zu besitzen. E-Cadherin reduziert durch die Bindung freien β -Catenins dessen nukleäre Lokalisation und die Expression von Wnt-Zielgenen in CRC-Zellen (Kuphal und Behrens 2006). Außerdem sichern Zell-Zell-Kontakte durch die Bindung von E-Cadherin über α - und β -Catenin an das Zytoskelett die Integrität epithelialer Gewebe. Der Verlust von E-Cadherin geht einher mit einer Dedifferenzierung, Invasion und Metastasierung des CRC (Übersicht in Tsanou *et al.* 2008). Neben sporadisch auftretenden Formen sind 3 - 5 % der CRC-Fälle familiär bedingt. Die familiäre adenomatöse Polyposis ist gekennzeichnet durch eine übermäßige Zahl an Polypen, ausgehend von Keimbahnmutationen im *APC*-Gen (Segditsas und Tomlinson 2006). Eine zweite familiäre Form des CRC, das HNPCC, auch Lynch-Syndrom, weist Mutationen in DNA-*mismatch*-Reparaturgenen (v.a. *hMSH2* und *hMLH1*) auf, wodurch sich die

charakteristische Mikrosatelliteninstabilität (MSI) ausbildet (Jasperson *et al.* 2010; Boland und Goel 2010).

Die Prognose für Patienten mit CRC hängt stark vom Zeitpunkt der Diagnose ab. Befindet sich das CRC in einem lokalen Wachstum, beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate über 90 %. Diese Rate sinkt auf 69 % sobald bereits eine Invasion in benachbarte Gewebe oder Lymphknoten vorliegt. Mit der Metastasierung in entfernte Gewebe wie Leber und Lunge beträgt das 5-Jahres Überleben nur noch 11 % (Siegel *et al.* 2012). Die Behandlung von CRC ist vom Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose abhängig. Liegen bei der Erstdiagnose keine Fernmetastasen vor, ist die operative Entfernung des Tumors und umliegender Lymphknoten Therapie der Wahl. Mit steigender Ausdehnung des Primärtumors sowie dem vermehrten Auftreten regionärer Lymphknotenmetastasen und bestimmter Rezidiv-Risikofaktoren wird zusätzlich mit adjuvanten Medikamenten therapiert, je nach Stadium mit 5-Fluorouracil und/oder Folinsäure. Ein kurativer Nutzen dieser Chemotherapie wird auch bei Patienten mit fortgeschrittenen Stadien des CRC und Fernmetastasierung beschrieben, jedoch ist bei der Mehrzahl dieser Patienten die Therapie rein palliativ. Dabei werden bestimmte Kombinationen von 5-Fluorouracil/Folinsäure, Irinotecan, Oxaliplatin sowie monoklonale Antikörper wie Bevacizumab und Cetuximab eingesetzt (DGHO Leitlinie, www.dgho-onkopedia.de).

1.3.2 Die Bedeutung des Tumorstromas für das Wachstum von CRC

Das Tumorstroma nimmt vermutlich auch im Wachstum und der Progression des CRC eine entscheidende Rolle ein. Einblicke in die genauen Interaktionen zwischen Tumorzelle und Mikroumgebung sowie deren Einfluss auf die Tumorprogression sind für das CRC jedoch sehr begrenzt.

Es ist bekannt, dass prä-maligne Kolon-Adenome durch eine Vielzahl von Immunzellen und eine gesteigerte Entzündungsreaktion gekennzeichnet sind (McLean *et al.* 2011). Die Anwesenheit Tumor-integrierter Memory-T-Zellen korrelierte in einer Studie mit einem besseren klinischen Verlauf und dem Fehlen von Metastasen (Pagès *et al.* 2005). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass der Grad an Malignität mit der Expression inflammatorischer Signale im Tumorstroma einhergeht (Cammarota *et al.* 2010). Weiterhin ist beschrieben, dass Tumorzellen rezeptorvermittelt Apoptose in T-Zellen induzieren und somit dem Immunsystem entgehen können (O'Connell *et al.* 1996).

Neben der Relevanz von Immunzellen konnte weiterhin gezeigt werden, dass auch TAF eine wichtige Rolle im Stroma von CRC einnehmen. Es ist beschrieben, dass Fibroblasten mit CRC-Zellen interagieren und so die Angiogenese fördern (Sundberg *et al.* 1997). *In vitro* konnte bestätigt werden, dass TAF aus metastasierendem CRC einen wachstumsfördernden Einfluss auf CRC-Zellen nehmen, und dass sie bestimmte ECM und ECM-degradierende Proteine exprimieren (Nakagawa *et al.* 2004). Generell scheint ECM im Stroma von CRC eine entscheidende Funktion zu haben. U.a. wurde gezeigt, dass ECM aus Leberzellen die

Proliferation von CRC-Zelllinien durch die Induktion autokriner Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren fördert (Zvibel *et al.* 1998).

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit konnte in einer ersten Studie anderer Autoren ein Einfluss von MSC auf das Wachstum von CRC gezeigt werden. Hier wurde im orthotopen syngenem Mausmodell nachgewiesen, dass MSC zu präformierten Tumoren und Metastasen migrieren, dort TAF-Marker exprimieren und das Tumorwachstum fördern (Shinagawa *et al.* 2010). Allerdings blieb die Frage nach den molekularen Mechanismen und Interaktionspartnern zwischen CRC-Zellen und dem umgebenden Stroma, im speziellen MSC, offen.

Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe gaben im subkutanen Mischxenograftmodell erste Hinweise auf eine Förderung des Tumorwachstums einer CRC-Zelllinie durch Tumorintegrierte MSC (Luetzkendorf *et al.* 2010). Eine Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen erfolgte vor Beginn der vorliegenden Arbeit nicht. Die genaue Analyse der Interaktionspartner zwischen CRC und MSC als Teil des Stromas sowie der molekularen Mechanismen der damit verbundenen Tumorprogression könnte potentielle Ansätze zur effizienten Therapie von CRC, auch fortgeschrittener Stadien, ermöglichen.

1.4 Zielstellung

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren die Daten über den Einfluss von MSC auf das Wachstum von CRC stark begrenzt. Die Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass ein fördernder Einfluss von MSC auf das Wachstum von CRC besteht. Zusammen mit den Publikationen anderer Autoren, die bestätigten, dass MSC zu Tumoren migrieren und am Tumorstroma partizipieren, ergaben sich folgende Hypothesen für die vorliegende Arbeit:

- MSC im Tumorstroma fördern das Wachstum von CRC vermutlich in einer frühen Phase der Tumorentwicklung.
- Diese Förderung beruht auf einer Zell-Zell-Interaktion zwischen MSC und CRC-Zellen, wobei spezifische molekulare Mechanismen in beiden Zelltypen aktiviert werden.
- Die Identifizierung und Blockade der Interaktion führt zu einem Verlust der Wachstumsförderung und kann perspektivisch als Therapieziel eingesetzt werden.

Aus den Hypothesen ergaben sich folgende Arbeitsschritte und Ziele:

Es sollte zunächst der in den Vorversuchen gefundene Einfluss von MSC auf das Xenograftwachstum von CRC bestätigt werden.

Mittels Monolayer- und Sphäroidkulturen sollte *in vitro* der Einfluss von MSC auf die Proliferation und Tumorarchitektur untersucht werden.

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand in der Identifizierung der Interaktionspartner zwischen MSC und CRC im Sphäroidmodell. Diese sollten im Weiteren gezielt ausgeschaltet werden, um deren Relevanz bei der MSC-vermittelten Wachstumsförderung *in vivo* zu untersuchen.

Zur Analyse der Funktionalität der identifizierten Interaktionen sollten die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der MSC-vermittelten Wachstumsförderung von CRC ermittelt werden.

Durch die Untersuchung in verschiedenen CRC-Zelllinien sollte die Allgemeingültigkeit dieser molekularen Mechanismen der Interaktion zwischen MSC und CRC beurteilt werden.

2. MATERIALIEN

2.1 Zellen

Die während der Arbeit verwendeten Zellen mit Ursprung und Referenz bzw. *American Type Culture Collection* (ATCC)-Nummer sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tab. 2.1: Verwendete Zellen

Zelle	Ursprung	Referenz
MSC	humane primäre MSC, isoliert aus KM-Aspiraten	Mueller <i>et al.</i> 2006
CCD18Co	humane Fibroblasten der gesunden Kolonschleimhaut	ATCC CRL-1459
HEK293T	immortalisierte humane Nierenzelllinie	DuBridge <i>et al.</i> 1987
HCT8	humane CRC-Zelllinie	ATCC Nr. CCL-244
DLD1	humane CRC-Zelllinie	ATCC Nr. CCL-221
Colo320DM	humane CRC-Zelllinie	ATCC Nr. CCL-220
HT29	humane CRC-Zelllinie	ATCC Nr. HTB-38
T84	humane CRC-Zelllinie (aus Lungenmetastase)	ATCC Nr. CCL-248
HCT116	humane CRC-Zelllinie	ATCC Nr. CCL-247

Von den CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 wurden die zu Beginn der Arbeit vorliegenden lentiviral transduzierten DsRed-exprimierenden Klone eingesetzt. Von der CRC-Zelllinie HCT8 wurde im Rahmen dieser Arbeit ein DsRed-exprimierender Klon generiert. Dabei wurde ein Klon gewählt, der in wichtigen Charakteristika dem Wildtyp (WT) entsprach (Wachstumskinetiken, Zytotoxizitätsanalysen, Wachstum im Soft-Agar-Assay; Anhang Abb. A1, S.102). Alle weiteren CRC-Zelllinien wurden als WT eingesetzt. MSC und CCD18Co wurden jeweils als lentiviral transduzierte eGFP-exprimierende Mischpopulation für die Experimente verwendet (aus Gründen der Übersichtlichkeit in der vorliegenden Arbeit als GFP bezeichnet). Da in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe mehrfach gezeigt wurde, dass die GFP-Markierung von MSC keinen Einfluss auf deren Konsensus-Kriterien genommen hatte (Daten nicht gezeigt), wurde auf weitere Analysen im Rahmen dieser Arbeit verzichtet. Sofern es zum Verständnis der Methode nicht notwendig ist, wird im Folgenden bei der Darstellung der Zellen auf den Zusatz des Transgens verzichtet.

2.2 Chemikalien und Materialien

2.2.1 Allgemeine Chemikalien

Alle üblichen Chemikalien und Biochemikalien wurden von Carl Roth (Karlsruhe; DE) bzw. Sigma Aldrich (München; DE) bezogen. Methodenspezifische Reagenzien oder Kits sind gesondert im Abschnitt 3 unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

2.2.2 Antikörper

Die in der Arbeit verwendeten primären (Tab. 2.2) und sekundären (Tab. 2.3) Antikörper sind mit Angabe des Herstellers, ihrer Applikation und der eingesetzten Konzentration bzw. Verdünnung den folgenden Tabellen zu entnehmen.

Tab. 2.2: Verwendete primäre Antikörper

Antikörper (Spezies)	Klon	Hersteller	Applikation	Konzentration
anti Aktin (goat)	C-11	Santa Cruz Biotechnologies (Heidelberg; DE)	WB	0,05 µg/mL
anti AKT (rabbit)	#9272	Cell Signaling (Boston; US)	WB	1/1000
anti Phospho-AKT (rabbit)	#9271	Cell Signaling	WB	1/1000
anti β 1-Integrin (mouse)	P5D2	Abcam (Cambridge; GB)	Blockierung <i>in vitro</i>	10µg/mL
anti β 1-Integrin (rabbit)	EP1041Y	Abcam	WB	1/500
anti α -Catenin (mouse)	5/a-Catenin	BD Biosciences (Heidelberg; DE)	WB	0,25 µg/mL
anti CD45 FITC (mouse)	2D1	BD Biosciences	FC	1/1
anti CD13 FITC (mouse)	WM-47	Dako (Hamburg; DE)	FC	1/1
anti CD73 PE (mouse)	AD2	BD Biosciences	FC	1/1
anti CD90 PE (mouse)	5E10	BD Biosciences	FC	1/1
anti CD105 FITC (mouse)	SN6	AbD Serotec (Düsseldorf; DE)	FC	1/1
Simultest Control γ 1/ γ 1 FITC/PE	X40	BD Biosciences	FC	1/1
anti E-Cadherin (mouse)	HECD-1	Invitrogen (Karlsruhe; DE)	Blockierung <i>in vitro</i>	10 µg/mL
anti E-Cadherin (mouse)	36/ E-Cadherin	BD Biosciences	WB	0,025 µg/mL
anti FAK (mouse)	77/FAK	BD Biosciences	WB	0,5 µg/mL
anti Phospho FAK (mouse)	18/FAK (pY397)	BD Biosciences	WB	0,5 µg/mL
anti GFP (rabbit)	AB3080	Merck Millipore (Darmstadt; DE)	IHC	1/250
anti p38 MAPK (rabbit)	#9212	Cell Signaling	WB	1/1000
anti Phospho-p38 MAPK (rabbit)	36	BD Biosciences	WB	1/1000
anti p44/42 MAPK (rabbit)	#9102	Cell Signaling	WB	1/1000
anti Phospho-p44/42 MAPK (rabbit)	#9101	Cell Signaling	WB	1/1000
anti α -Tubulin (rabbit)	11H10	Cell Signaling	WB	1/1000
anti VCAM-1 (mouse)	B-K9	Abcam	Blockierung <i>in vitro</i>	10 µg/mL

Tab. 2.3: Verwendete sekundäre Antikörper

Antikörper (Spezies)	Hersteller	Applikation	Konzentration
anti-rabbit IgG-Biotin (goat)	Santa Cruz Biotechnologies	IHC	0,5 µg/mL
Streptavidin-HRP	Dako	IHC	0,5 µg/mL
anti-goat IgG-HRP (donkey)	Santa Cruz Biotechnologies	WB	0,8 µg/mL
anti-mouse IgG-HRP (goat)	Santa Cruz Biotechnologies	WB	0,8 µg/mL
anti-rabbit IgG-HRP (goat)	Santa Cruz Biotechnologies	WB	0,8 µg/mL

2.2.3 Oligonukleotide

Die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden kommerziell synthetisiert (Invitrogen, Karlsruhe; DE bzw. Biolegio, Nijmegen; NL) oder lagen der Arbeitsgruppe durch bestehende Kooperationsprojekte vor. Die Sequenzen wurden anhand der mRNA-Sequenzeinträge (Referenz) der *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) Datenbank „Entrez Nucleotide“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>) generiert und sind unter Angabe der Basenpaarlänge des entstehenden Produkts (bp) Tab. 2.4 zu entnehmen.

Tab. 2.4: Verwendete Oligonukleotide

Gen	Sequenz	Referenz	bp
<i>Alas-1</i>	5'-CTGCAAAGATCTGACCCCTC-3' 5'-CCTCATCCACGAAGGTGATT-3'	NM_000688	136
<i>β1-Integrin</i>	5'-GCCGCGCGGAAAAGATGAAT-3' 5'-TGCTGTTCTTTGCTACGGT-3'	NM_002211	323
<i>E-Cadherin</i>	5'-TGCCCAGAAAATGAAAAGG-3' 5'-GTGTATGTGGCAATGCGTTC-3'	NM_004360	200
<i>GAPDH</i>	5'-AATGAAGGGGTCATTGATGG-3' 5'-AAGGTGAAGGTCCGAGTCAA-3'	NM_002046	108
<i>Kollagen I α1</i>	5'-CGATGGATTCCAGTTCGAGTAT-3 5'-GACAGTGACGCTGTAGGTGAAG-3'	NM_000088	244
<i>Snail-1</i>	5'-ACTGCAACAAGGAATACCTCAG-3' 5'-GCACTGGTACTTCTTGACATCTG-3'	NM_005985	242
<i>TBP</i>	5'-CCACTCACAGACTCTCACAAC-3' 5'-CTGCGGTACAATCCCAGAACT-3'	NM_003194	127
<i>Vimentin</i>	5'- CCCTCACCTGTGAAGTGGAT -3' 5'- TCCAGCAGCTTCCTGTAGGT -3'	NM_003380	241

2.2.4 Plasmide

Zur stabilen Fluoreszenzmarkierung von Zellen kam ein lentivirales Expressionssystem, bestehend aus lentiviralem Vektor mit selbst-inaktivierender 3'-LTR und einem Verpackungssystem der 3. Generation, zum Einsatz. Es wurden die Expressionsplasmide pFUGW (Lois *et al.* 2002), die Verpackungsplasmide pMDLg/pRRE und pRSV-Rev (Dull *et al.* 1998) sowie das Hüllproteinplasmid pVSVG (Lois *et al.* 2002) verwendet. Die Plasmide wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Dr. Thomas Braun, Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim, zur Verfügung gestellt. Das Expressionsplasmid pFUDW wurde auf der Grundlage von pFUGW durch Austausch der Sequenz von GFP gegen DsRed im Vorfeld der vorliegenden Arbeit kloniert (Luetzkendorf *et al.* 2010).

2.2.5 Lentivirale shRNA-Partikel

Für das Einführen stabiler knock-downs (kd) in Tumorzellen bzw. MSC wurden lentivirale Partikel des Systems Mission® shRNA Lentiviral Particels von Sigma Aldrich genutzt. Es wurde je Gen ein Set aus 5 shRNA-Sequenzen sowie eine Kontroll-Sequenz (*non-target* im Säuger genom) getestet. In Tab. 2.5 bzw. 2.6 sind die Bestellnummern (TRCN) sowie die Sequenz der Bindestelle auf der mRNA für einen kd von $\beta 1$ -Integrin bzw. Kollagen I $\alpha 1$ (*Kol I $\alpha 1$*) angegeben.

Tab. 2.5: Verwendete lentivirale shRNA-Sequenzen für einen kd von $\beta 1$ -Integrin

Klon/TRCN-Nr.	Sequenz	Vektor
275082	CCGGCCAAATCATGTGGAGAATGTACTCGAGTACATTCTCCACATGATTTGGTTTTG	TRC2-pLKO-puro
275083	CCGGCCTTGCATTACTGCTGATATCTCGAGATATCAGCAGTAATGCAAGCCTTTTTG	
275133	CCGGTAGGTAGCTTTAGGGCAATATCTCGAGATATTGCCCTAAAGCTACCTATTTTTG	
275134	CCGGTTTGTAGGAAGAGGGATAATACTCGAGTATTATCCCTCTCCTACAAATTTTTG	
275135	CCGGGCCCTCCAGATGACATAGAAACTCGAGTTTCTATGTCATCTGGAGGGCTTTTTG	
Kontrolle	<i>scrambled shRNA, non-mammalian</i>	

Tab. 2.6: Verwendete lentivirale shRNA-Sequenzen für einen kd von *Kol I $\alpha 1$*

Klon/TRCN-Nr.	Sequenz	Vektor
62558	CCGGCCTGGAAAGAATGGAGATGATCTCGAGATCATCTCCATTCTTTCCAGGTTTTTG	TRC1-pLKO-puro
62559	CCGGCGATGGATTCCAGTTCGAGTACTCGAGTACTCGAACTGGAATCCATCGTTTTTG	
62560	CCGGCAAAGGAGACACTGGTGCTAACTCGAGTTAGCACCAGTGTCTCCTTTGTTTTTG	
62561	CCGGCCCATTGGTAATGTTGGTGTCTCGAGAGCACCAACATTACCAATGGGTTTTTG	
62562	CCGGTGAGAAATCAACCGGAGGAATCTCGAGATTCTCCGGTTGATTTCTCATTTTTTG	
Kontrolle	<i>scrambled shRNA, non-mammalian</i>	

2.3 Medien, Puffer und Lösungen

2.3.1 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Wachstumsmedium für CRC-Zelllinien

RPMI-1640 (Sigma Aldrich), 10 % FKS (Biochrom AG, Berlin; DE), 1 % Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG)

Wachstumsmedium für MSC

DMEM + Glutamaxx (1 g/L D-Glucose, + Pyruvat; Gibco über Life Technologies, Darmstadt; DE), 15 % FKS (PAN-Biotech, Aidenbach; DE), 1 % Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG)

Wachstumsmedium für CCD18Co

MEM (Sigma Aldrich), 15 % FKS (Biochrom AG), 1 % Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG), 1 % MEM nicht essentielle Amino-säuren (PAA Laboratories, Pasching; AT), 1 % Natrium Pyruvat (100 mM Stocklösung; PAA Laboratories)

Wachstumsmedium für HEK293T-Zellen

DMEM (low Glucose; PAA Laboratories), 10 % FKS (PAN-Biotech), 1 % Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG), 1 % L-Glutamin (200 mM Stammlösung; PAA Laboratories)

Differenzierungsmedien für MSC

osteogen

DMEM (Gibco), 15 % FKS (PAN-Biotech), 1 % Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG), 50 μ M Dexamethason, 10 μ g/mL Insulin (bovin), 5 μ M Rosiglitazon (Axxora über Enzo Life Science, Lörrach; DE), 500 μ M Isobutylmethylxanthin, 100 μ M Indomethazin

adipogen

DMEM (Gibco), 15 % FKS (PAN), 1 % Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG), 50 μ M Dexamethason, 10 mM β -Glycerolphosphat, 200 μ M L-Ascorbat

Zytostatika

Irionotecan

Irinotecan-Hydrochlorid, 20 mM in DMF (Sigma Aldrich)

5-Fluorouracil

50 mM in DMF (Sigma Aldrich)

Oxaliplatin

Eloxatin, 5 mg/mL-Stammlösung (Sanofi Aventis, Frankfurt; DE)

Weitere Medien, Puffer und Lösungen für die Zellkultur

Ficoll	Pancoll human, Dichte 1,077 g/L (Pan-Biotech)
PBS	10x Stammlösung w/o Ca ²⁺ und Mg ²⁺ (Sigma Aldrich)
Trypsin-EDTA	0,5 g/L porcines Trypsin + 0,2 g/L EDTA (Sigma Aldrich)
Polybrene	8 mg/mL Stammlösung in dest. H ₂ O (Sigma Aldrich)
Puromycin	Puromycin-Dihydrochlorid, 10 mg/mL Stammlösung (Gibco)
Cycloheximid	100 mg/mL Stammlösung (Sigma Aldrich)

2.3.2 Medien und Puffer

LB-Medium	10 g/L NaCl, 10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt (jeweils Carl Roth); mit Zusatz von 50 µg/mL Ampicillin (Sigma Aldrich)
TCA	Trichloressigsäure (Carl Roth), 10 % w/v in dest. H ₂ O
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ *12 H ₂ O, 1,76 mM KH ₂ PO ₄ , pH 6,8 (jeweils Carl Roth)
PBST	PBS + 0,1 % TWEEN-20 (Sigma Aldrich)
Aph-Substratpuffer	0,1 M Natrium-Azetat (Carl Roth), 0,1 % Triton-X-100, 5 mM p-Nitrophenylphosphat (beides Sigma Aldrich)
2 x HBS	283 mM NaCl, 23 mM HEPES, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,05; sterilfiltriert (jeweils Carl Roth)
dest. H ₂ O	„Aqua B. Braun“, steril (B. Braun, Melsungen; DE)
RIPA-Lysepuffer	100 mM NaCl, 50mM Tris, 0,5 % Desoxycholat, 0,5 % SDS, 0,5 % Igepal; (jeweils Carl Roth) vor Gebrauch zugeben: 0,1 mM Dithiothreitol (Carl Roth), 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (Carl Roth), 0,4 U Protease-Inhibitor (Sigma Aldrich), 1x Phosphatase-Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific, Dreieich; DE)
Protein-Ladepuffer	10 % Glycerol, 2 % SDS; 5 % β-Mercaptoethanol, 0,005 % Bromphenolblau in 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 (jeweils Carl Roth)
Western-Blot-Laufpuffer	1x Rotiphorese SDS Page (10x Stammlösung; Carl Roth)
Western-Blot Transferpuffer	1x Rotiphorese SDS Page, 20 % Methanol (Sigma Aldrich)

2.3.3 Färbelösungen

Alizarin S	2 % Alizarin S in dest. H ₂ O; pH 4,2 (Sigma Aldrich)
Öl-Rot	7 mg/mL in 50 % Ethanol, filtriert (Sigma Aldrich)
SRB	Sulforhodamin B; 0,4 % w/v in 1 % Essigsäure (Sigma Aldrich)
essigsäure Eosin G-Lösung	0,1 % w/v in dest. H ₂ O, 1 Tropfen Essigsäure/100 mL (Merck Millipore)
AZAN-Färbelösungen	Anilinalkohol, Azokarmin, 1 % essigsaurer Alkohol, 5 % Phosphorwolframsäure, Anilinblau-Orange G (Baacklab; Armin Baack, Schwerin; DE)

2.4 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Die Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Carl Roth, Eppendorf (Hamburg; DE) und VWR International (Darmstadt; DE) bezogen. Methodenspezifische Ausnahmen sind im jeweiligen Abschnitt unter Punkt 3 aufgeführt.

Zellkulturmaterialien wie Kulturgefäße (Zellkulturflaschen und Petrischalen verschiedener Größen, 6- bis 96-well-Platten), serologische Pipetten und Zentrifugenröhrchen wurden von den Firmen TPP (Trasadingen; CH) und Greiner Bio-one (Frickenhausen; DE) bezogen.

Die eingesetzten Geräte (u.a. Zentrifugen, Laminar-Flow-Werkbänke, Inkubatoren) entsprachen den allgemeinen Standards und sind nicht weiter aufgelistet. Methodenspezifische Ausnahmen sind im jeweiligen Abschnitt unter Punkt 3 aufgeführt.

3. METHODEN

3.1 Kultivierung von Zelllinien

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter steriler Atmosphäre an Laminar-Flow-Werkbänken durchgeführt. Die Kultivierung der verwendeten Zellen (vgl. Tab. 2.1) erfolgte im jeweiligen Wachstumsmedium (vgl. 2.3.1) unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂, Luftfeuchtigkeit ≥ 95 %). Der Mediumwechsel erfolgte im Abstand von 2 d. Bei Erreichen einer Konfluenz von 90 - 100 % erfolgte die Passagierung durch milde enzymatische Ablösung der Zellen mittels Trypsin-EDTA.

3.2 Isolierung und Kultivierung von MSC

Die Isolierung humaner MSC erfolgte aus KM-Aspiraten freiwilliger Spender der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV des Universitätsklinikums Halle/Saale. Die Punktion des Beckenkamms erfolgte durch einen Arzt nach vorheriger Aufklärung und schriftlichem Einverständnis des Spenders. Ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg lag vor („Untersuchung humaner adulter mesenchymaler Stammzellen *in vitro* und im Tiermodell II“ Antragsfassung vom 03.12.2006; Version Nr. 2; Amendement 1; Stand: 18.03.2010).

Die Isolierung erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation der mononukleären Zellen (Böyum 1968) und anschließender Selektion mittels Plastikadhärenz. Die aus der Punktion vorliegenden 40 mL KM-Aspirat wurden zunächst 10 min bei 1300 rpm zentrifugiert. Die zelluläre Fraktion wurde mit dem 2-fachen Volumen PBS verdünnt und auf Ficoll überschichtet. Anschließend wurde 30 min bei 1300 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Die aus mononukleären Zellen bestehende Interphase wurde isoliert, gewaschen und in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/cm² in Zellkulturgefäße überführt. 24 h nach dem Ausplattieren wurden nicht adhärenz Zellen durch Waschen mit PBS abgespült. Der Mediumwechsel erfolgte anschließend in einem Intervall von 3 d. Das Wachstum der Kolonien wurde regelmäßig lichtmikroskopisch kontrolliert. Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 50 % innerhalb der Kolonien erfolgte die Passagierung mittels Trypsin-EDTA. Die gewonnenen Zellen wurden kryokonserviert oder für weitere Experimente in einer Dichte von 200 - 500 Zellen/cm² gesetzt. Jede weitere Passagierung erfolgte bei Erreichen einer maximalen Konfluenz von 70 %.

3.3 Gewinnung konditionierten Mediums von MSC und CCD18Co

Zur Gewinnung zellfreien, konditionierten Mediums (cM) von MSC (MSC-cM) sowie CCD18Co (CCD18Co-cM) wurden die Zellen in einer initial hohen Dichte (1×10^5 Zellen/cm²) in 6-well-Platten kultiviert und mit 3 mL Wachstumsmedium für CRC-Zelllinien überschichtet. Über einen Zeitraum von 14 d wurde der Überstand im Intervall von 3 d geerntet, vereint und durch frisches Medium ersetzt. Abschließend wurden die vereinten Überstände zentrifugiert (5 min, 1300 rpm) und mittels 0,45 µm PVDF-Filter filtriert (Carl Roth). Die zellfreien cM wurden in Aliquots bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

3.4 Generierung stabil fluoreszenzmarkierter Zellen

3.4.1 Grundlegende Methodik

Die stabile Fluoreszenzmarkierung von Zellen wurde durch den Transfer des Fluoreszenzgens (*DsRed* oder *GFP*) in das Genom der Zielzelle mittels lentiviraler Partikel erreicht. Durch die Verwendung lentiviraler Systeme wird das zu transferierende Gen stabil in das Genom – selbst ruhender Zellen – eingebaut. Damit konnte ein effizienter Einbau in wenig proliferierende Zellen wie MSC gewährleistet werden. Zur Gewinnung lentiviraler Partikel wurde eine Kalzium-Phosphat-Transfektion (Chen und Okayama 1987) der Helferzelllinie HEK293T (Mochizuki *et al.* 1998) mittels 4-Plasmid-Expressionssystem durchgeführt. Die genutzten Plasmide lagen dem Labor als Bakterien-Glycerolstocks vor und sind unter 2.2.4 aufgeführt. Die Gewinnung der Plasmide erfolgte nach Anzucht der Bakterien in LB-Medium mit Ampicillin mittels kommerziell erhältlichem Plasmidisolierungskit nach Angaben des Herstellers (Qiagen Plasmid Maxi Kit, Qiagen, Hilden; DE). Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch am DU® 640 Spectrophotometer (Beckman Coulter GmbH, Krefeld; DE).

3.4.2 Gewinnung und Titerbestimmung lentiviraler Partikel

HEK293T-Zellen wurden in einer Dichte von 6×10^4 Zellen/cm² in 10 mL Wachstumsmedium für HEK293T-Zellen in 10-cm-Petrischalen ausplattiert. Nach 24 h wurde folgender Transfektionsansatz (berechnet für eine 10-cm-Petrischale) hergestellt: 10 µg Expressionsplasmid (pFUGW, pFUDW), je 5 µg Verpackungsplasmide pRSV-Rev und pMDLg/pRRE und 5 µg Hüllproteinplasmid pVSVG in 800 µL dest. H₂O. Dazu wurde tropfenweise eine Mischung aus 200 µL 1,25 M CaCl₂ in 1 mL 2 × PBS zugegeben, gründlich gemischt, 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und vorsichtig auf die HEK293T-Zellen gegeben. Nach 4 h erfolgte ein Mediumwechsel. Der Überstand mit den viralen Partikeln wurde nach 48 h geerntet, 5 min bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert und mittels 0,45 µm PVDF-Filter filtriert. Zur Aufkonzentrierung der viralen Partikel erfolgte eine Ultrazentrifugation des Filtrats für 2 h bei $1,15 \times 10^5$ g und 4 °C (Sorvall Discovery 100SE mit Rotor TH-641; Thermo Scientific). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet über Nacht bei 4 °C mit PBS überschichtet. Abschließend wurden die viralen Partikel aliquotiert, in Flüssigstickstoff gefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Bestimmung der Virustiter von FUGW und FUDW erfolgte durch die Transduktion von HEK293T-Zellen mit verschiedenen Verdünnungsstufen des Virus. Die jeweilige Verdünnung wurde mit 8 µg/mL Polybrene den Zellen zugesetzt. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel. Nach weiteren 24 h wurden die HEK293T-Zellen mittels durchflusszytometrischer Analyse von GFP bzw. DsRed untersucht. Über die Formel

$$\frac{\text{virale Partikel}}{\mu\text{L}} = (\% \text{ GFP- bzw. DsRed-positive Zellen}) * (\text{initial gesetzte Zellzahl}) * VF$$

– mit VF = Verdünnungsfaktor – konnte die Konzentration der Virusstammlösung ermittelt werden.

3.4.3 Transduktion adhärenter Zellen und Gewinnung stabil fluoreszenzmarkierter Klone

Die Transduktion adhärenter Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 60 %. Die Zellen wurden für 24 h mit 5×10^5 viralen Partikeln/mL und 8 $\mu\text{g/mL}$ Polybrene im jeweiligen Wachstumsmedium inkubiert. Die erfolgreiche Transduktion wurde nach 48 - 72 h durch fluoreszenzmikroskopische Analyse von GFP bzw. DsRed untersucht.

MSC und CCD18Co wurden expandiert und bei Erreichen einer ausreichenden Zellzahl durchflusszytometrisch hinsichtlich GFP-positiver Zellen analysiert. Für alle anschließenden Versuche wurden Chargen mit einer Transduktionseffizienz ≥ 90 % verwendet.

Zur Generierung einer klonalen Population wurden die transduzierten CRC-Zellen mittels limitierter Verdünnung (1 Zelle/well einer 96-well-Platte) ausplattiert. Nach 14 d Kultivierung wurden Einzelklone anhand ihrer Fluoreszenz durch die fluoreszenzmikroskopische Begutachtung ausgewählt und expandiert. Es wurden mindestens fünf Klone hinsichtlich WT-Charakteristika untersucht. Für weitere Versuche wurde ein Klon ausgewählt, der WT-ähnliche Wachstumskinetiken (vgl. 3.6.1), Zytotoxizitätsverhalten (vgl. 3.6.2) sowie Wachstum im Tumorigenitätsassay mittels Soft-Agar (vgl. 3.7) zeigte.

3.5 Generierung stabiler knock-down Zellen

CRC-Zellen und MSC mit einem kd von $\beta 1$ -Integrin bzw. MSC mit einem kd von *Kol I $\alpha 1$* wurden mittels kommerziell erhältlicher lentiviraler Partikel (Sigma Aldrich, Vgl. 2.2.5) hergestellt. Diese verfügten neben der shRNA gegen das Zielgen eine Resistenz gegen Puromycin, sodass transduzierte Zellen selektiert werden konnten. Sowohl für $\beta 1$ -Integrin als auch für *Kol I $\alpha 1$* wurden jeweils 5 shRNA-Sequenzen und eine Kontroll-Sequenz kommerziell erworben (Tab. 2.5 und 2.6).

3.5.1 Herstellung von $\beta 1$ -Integrin knock-down CRC-Zellen

DsRed-HCT8, *DsRed*-DLD1 bzw. WT-Colo320DM wurden bis zu einer Konfluenz von 50 % in 48-well-Platten kultiviert. Danach erfolgte die Transduktion mit 5×10^5 viralen Partikeln/mL und 8 $\mu\text{g/mL}$ Polybrene in Wachstumsmedium für CRC-Zelllinien. Es wurde für jede vorhandene shRNA-Sequenz eine separate Transduktion durchgeführt. Nach 24 h wurde das Transduktionsmedium durch frisches Wachstumsmedium ersetzt und die Zellen bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Nach zweimaligen Passagieren in Wachstumsmedium erfolgte die Selektion der transduzierten Zellen durch Zugabe von 10 $\mu\text{g/mL}$ Puromycin. Die Mischpopulationen wurden expandiert und mittels Western-Blot auf die kd-Effizienz getestet. Die Mischpopulation mit dem effizientesten kd wurde anschließend für die Klonierung mittels limitierter Verdünnung (vgl. 3.4.3) eingesetzt. Die gewonnenen Klone der CRC-Zellen mit einem kd an $\beta 1$ -Integrin (im Folgenden als $\beta 1$ -I kd CRC bezeichnet) wurden expandiert,

mittels Western-Blot und qPCR auf die Expression von $\beta 1$ -Integrin analysiert sowie hinsichtlich wichtiger WT-Charakteristika untersucht (vgl. 3.6 und 3.7). Als Kontrollen dienten für alle Versuche zum einen die unbehandelten CRC-Zellen, die als Grundlage der Transduktion dienten (im Folgenden als WT-CRC bezeichnet), sowie ein Klon, der aus der Transduktion der CRC-Zellen mit lentiviralen Partikeln einer *scrambled* shRNA-Sequenz stammte (im Folgenden als mock-CRC bezeichnet). Je CRC-Zelllinie wurden zwei $\beta 1$ -kd Klone für die Versuche eingesetzt. Da sich die Resultate ähnelten, wird in der vorliegenden Arbeit ein repräsentatives Beispiel gezeigt.

3.5.2 Herstellung von $\beta 1$ -Integrin knock-down MSC

Da MSC aufgrund ihrer langsamen Proliferation nicht kloniert werden können, muss sichergestellt werden, dass eine effiziente Transduktion erfolgt. In Vorversuchen wurde ermittelt, dass ein Gemisch der lentiviralen Partikel aller fünf vorliegenden shRNA-Sequenzen zu einem nahezu vollständigen kd führte (Daten nicht gezeigt).

MSC wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % in 10-cm-Petrischalen kultiviert. Die Transduktion erfolgte mit 5×10^5 viralen Partikeln/mL des shRNA-Sequenz-Gemisches und 8 $\mu\text{g/mL}$ Polybrene in Wachstumsmedium für MSC. Nach 24 h wurde das Medium durch frisches Wachstumsmedium ersetzt. 4 d nach Transduktion erfolgte die Selektion der transduzierten Zellen durch Zugabe von 0,5 $\mu\text{g/mL}$ Puromycin. Die MSC wurden mittels Western-Blot und qPCR auf die Expression von $\beta 1$ -Integrin sowie hinsichtlich wichtiger Konsensus-Kriterien (Vgl. 3.8 und 3.9) untersucht und für weitere Versuche expandiert. MSC mit einem kd von $\beta 1$ -Integrin werden im Folgenden als $\beta 1$ -kd MSC bezeichnet. Als Kontrollen dienten für alle Versuche zum einen die untransduzierten MSC (im Folgenden als WT-MSC bezeichnet) sowie MSC, die aus der Transduktion mit lentiviralen Partikeln einer *scrambled* shRNA-Sequenz stammten (im Folgenden als mock-MSC bezeichnet).

3.5.3 Herstellung von Kollagen I $\alpha 1$ knock-down MSC

Kollagen I ist eine Tripelhelix aus zwei Ketten Kollagen I $\alpha 1$ und einer Kette Kollagen I $\alpha 2$. Es wurden fünf lentivirale Partikel mit unterschiedlichen shRNA-Sequenzen gegen das Gen der Kette Kollagen I $\alpha 1$ (*Kol I $\alpha 1$*) getestet. Von diesen erwies sich Sequenz 62559 als besonders effizient (Tab 2.6). Die Transduktion und Selektion erfolgte entsprechend 3.5.2 im *6-well*-Format. Aufgrund der stark eingeschränkten Proliferation von MSC mit einem kd von *Kol I $\alpha 1$* (im Folgenden als *Kol I $\alpha 1$ kd MSC* bezeichnet) wurde auf einen Test hinsichtlich Konsensus-Kriterien verzichtet. Die MSC wurden mittels qPCR auf die Expression von *Kol I $\alpha 1$* untersucht und direkt für *in vitro*-Analysen eingesetzt. Die Versuche wurden vergleichend gegenüber den entsprechenden Kontrollen (WT-MSC, mock-MSC) durchgeführt (vgl. 3.5.2).

3.6 Wachstums- und Zytotoxizitätsanalysen mittels Sulforhodamin B-Assay

Um zu gewährleisten, dass die mittels limitierter Verdünnung gewonnenen CRC-Klone ein WT-ähnliches Verhalten aufweisen, wurden Wachstumskinetiken und Zytotoxizitätsanalysen

mittels Sulforhodamin B-Assay (SRB-Assay) durchgeführt (Skehan *et al.* 1990). Der Assay beruht auf der stabilen Bindung des Farbstoffs SRB an Proteine bei saurem pH-Wert. Ungebundener Farbstoff wird unter sauren Bedingungen ausgewaschen, wobei der gebundene Farbstoff anschließend unter basischem pH-Wert freigesetzt und photometrisch ermittelt werden kann. Die optische Dichte (OD) des freigesetzten Farbstoffs korreliert innerhalb eines bestimmten Bereichs linear mit der Proteinmenge und Zellzahl im *well*.

3.6.1 Wachstumsanalysen mittels Sulforhodamin B-Assay

Genetisch veränderten CRC-Zellen wurden in fünf identischen 96-*well*-Platten mit pro Spalte ansteigenden Zelldichten gesetzt (250 - 4000 Zellen/*well*; eine Spalte pro Zellzahl = 8-fach Bestimmung pro Zellzahl). Nach 24, 48, 72, 96 und 120 h wurde jeweils eine Platte mit 10 % Trichloressigsäure (TCA) abgestoppt und für mindestens 2 h fixiert. Die Platten wurden 5 x mit dest. H₂O gewaschen (Plate Washer 96 PW; Tecan, Männedorf, Schweiz) und mit 0,4 % SRB für 45 min bei RT gefärbt. Überschüssiges SRB wurde mit 1 % Essigsäure in dest. H₂O entfernt und die Platten wurden bei RT über Nacht getrocknet. Anschließend wurde das gebundene SRB mit 10 mM Tris (100 µL pro *well*) für mindestens 30 min gelöst und die OD bei 570 nm am Mikroplatten-Reader (SpectraFluor Plus; Tecan) ermittelt. Als Hintergrundwert diente eine Spalte ohne Zellen, die der gesamten Färbeprozedur unterzogen war. Es wurde der Mittelwert (MW) der OD-Werte einer Spalte abzüglich Hintergrundwert gebildet. Je Klon wurden für die unterschiedlichen Zellzahlen diese MW gegen die Zeit aufgetragen und mit den Ergebnissen der Kontrollen (WT-CRC, mock-CRC) verglichen. Für Zytotoxizitätsanalysen (3.6.2) erfolgte gleichzeitig die Bestimmung der optimalen Zellzahlen, die ein exponentielles Wachstum über die gesamte Versuchsdauer gewährleisten.

3.6.2 Zytotoxizitätsanalysen mittels Sulforhodamin B-Assay

An d 1 wurden die Zellen in der ermittelten optimalen Zelldichte in 100 µL Wachstumsmedium pro *well* einer 96-*well*-Platte gesetzt. An d 2 erfolgte die Zugabe der Zytostatika in folgenden, pro Spalte aufsteigenden Endkonzentrationen: Oxaliplatin (0,001 - 100 µM), Irinotecan (0,001 - 100 µM) und 5-Fluorouracil (0,01 - 1000 µM). Somit erfolgte pro Verdünnungsstufe jedes Zytostatikums eine 8-fach Bestimmung. An d 6 wurden die Platten mit 10 % TCA abgestoppt und entsprechend 3.6.1 weiter verarbeitet. Es wurde der MW der OD-Werte jeder Spalte berechnet und die Werte der unbehandelten Kontrollen auf 100 % gesetzt. Anschließend erfolgten die semilogarithmische Auftragung des Anteils der überlebenden Zellen in Relation zur Kontrolle gegenüber den Zytostatikakonzentrationen und der Vergleich der Kurvenverläufe der Klone gegenüber den Kontrollen (WT-CRC, mock-CRC).

3.7 Tumorigenitätsassay mittels Soft-Agar

Der Soft-Agar-Assay wurde 1977 von Hamburger und Salmon zur Untersuchung des kontaktunabhängigen Wachstums von Tumorzellen nach Behandlung mit verschiedenen Zytostatika bzw. Bestrahlung entwickelt (Hamburger und Salmon 1977). Das Koloniewachstum in einer

halbfesten Matrix, dem Soft-Agar, ist ein Charakteristikum transformierter Zellen. Ein positives Wachstum im Soft-Agar-Assay liefert Anhaltspunkte für eine Malignität *in vivo*.

Um zu gewährleisten, dass die mittels limitierter Verdünnung gewonnenen CRC-Klone ein WT-ähnliches tumorigenes Potential aufweisen, wurde ein Soft-Agar-Assay wie folgt durchgeführt. Je Zelllinie wurde eine 3-fach Bestimmung im 6-well-Format analysiert. Es wurde eine Stammlösung von 2 % Agarose (Seakem GTG in PBS, Lonza, Basel; CH) in PBS autoklaviert, die für die weiteren Schritte mit temperiertem Wachstumsmedium für CRC-Zelllinien auf die jeweils nötige Konzentration verdünnt wurde. Pro well wurde mit 1,5 mL 0,5 % Agarose beschichtet (Base-Agar) und anschließend mit 3000 CRC-Zellen in 1,5 mL 0,36 % Agarose überschichtet (Top-Agar). Abschließend wurden 3 mL Wachstumsmedium zugesetzt und unter Standardbedingungen für 21 d kultiviert. Im Abstand von 2 - 3 d wurde das Wachstumsmedium erneuert. Die Auswertung hinsichtlich Qualität und Quantität des Koloniewachstums der Klone gegenüber den Kontrollen (WT-CRC, mock-CRC) erfolgte lichtmikroskopisch mit Bildgebung.

3.8 Analyse des Differenzierungspotentials von MSC

Zur Untersuchung, ob $\beta 1-I$ kd MSC unverändert entsprechend den Konsensus-Kriterien osteogen und adipogen differenzieren, wurde das Differenzierungspotential wie folgt analysiert.

MSC wurden bis zur vollständigen Konfluenz in 6-well-Platten in Wachstumsmedium kultiviert. Danach wurden die Zellen in osteogenem (ODM) bzw. adipogenem Differenzierungsmedium (ADM) inkubiert. Über einen Zeitraum von 14 d erfolgte alle 3 d ein Mediumwechsel.

Der Nachweis der Differenzierung erfolgte mittels chemischer Färbungen. Die Zellen wurden mit PBS gespült, mit 2 % Formalin bei RT fixiert und erneut mit PBS gespült. Die für die osteogene Differenzierung typischen Kalziumhydroxylapatit-Ablagerungen wurden mit Alizarin S gefärbt: Die fixierten Zellen wurden mit dest. H₂O gespült und mit Alizarin S-Färbelösung für 5 min bei RT inkubiert. Überschüssiges Alizarin S wurde mit dest. H₂O ausgespült. Der Nachweis der für die adipogene Differenzierung typischen Fettvakuolen erfolgte durch eine Öl-Rot-Färbung: Die fixierten Zellen wurden mit 50 % Ethanol gespült und bei RT für 10 min mit Öl-Rot-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 50 % Ethanol und PBS gewaschen. Als Kontrolle dienten die Färbungen von MSC, die über den gesamten Zeitraum im Wachstumsmedium kultiviert wurden. Es erfolgte die vergleichende Analyse des Differenzierungspotentials von $\beta 1-I$ kd MSC gegenüber den Kontrollen (WT-MSC, mock-MSC). Die gefärbten Zellen wurden anschließend lichtmikroskopisch beurteilt und fotodokumentiert.

3.9 Durchflusszytometrische Untersuchung von Oberflächenmarkern des Immunphänotyps von MSC

Um zu gewährleisten, dass $\beta 1$ -I kd MSC unverändert die Expression ausgewählter Oberflächenantigene entsprechend der Konsensus-Kriterien aufweisen (Minimalkriterien nach Wuchter *et al.* 2015), wurden durchflusszytometrische Analysen wie folgt durchgeführt.

Die Zellen wurden mit Trypsin-EDTA gelöst und in Rundboden-Röhrchen (BD Bioscience) überführt. Nach 2 x Waschen mit PBS wurde das Pellet mit 10 μ L des jeweiligen FITC- oder PE-markierten Antikörpers (Tab. 2.2) resuspendiert und für 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 x mit PBS gewaschen, 5 min bei 1300 rpm zentrifugiert und das Pellet in PBS gelöst. Die Analyse der Zellen erfolgte am Durchflusszytometer (FACSCalibur) mit der Software CellQuest (beides BD Bioscience). Anhand der Isotypkontrolle (Simultest, Tab 2.2) wurden die gerätespezifischen Parameter eingestellt und für die gesamte Messreihe beibehalten. Es erfolgte die vergleichende Analyse der Oberflächenmarker für $\beta 1$ -I kd MSC gegenüber den Kontrollen (WT-MSC, mock-MSC).

3.10 *In vitro*-Analyse der Proliferation von CRC-Zellen in Abhängigkeit von MSC

3.10.1 Proliferation von CRC-Zellen in direkter Kokultur mit MSC

Zur Untersuchung des Einflusses von MSC auf die Proliferation von CRC-Zellen wurden direkte Kokulturen im 6-well-Format durchgeführt. *DsRed*-HCT8 bzw. *DsRed*-DLD1 wurden mit *GFP*-MSC im Verhältnis 5:1 (8000 CRC-Zellen:2000 MSC pro cm^2) in 5 mL Wachstumsmedium für CRC-Zelllinien kokultiviert. Als Kontrollen dienten ungemischte sowie mit *GFP*-CCD18Co gemischte CRC-Kulturen. Es wurden pro Kulturtyp 4 *wells* angesetzt und nach 24, 48, 72 und 96 h mittels Trypsin-EDTA geerntet. Die Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen und die Gesamtzellzahl pro *well* mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Anzahl *DsRed*-positiver Zellen aus MSC-gemischten Kokulturen vergleichend gegenüber ungemischten bzw. mit CCD18Co-gemischten Kokulturen und die Auftragung dieser Werte gegen die Zeit.

Aus der initial gesetzten Zellzahl von $7,2 \times 10^4$ *DsRed*-positiven Zellen/*well* wurden mit den ermittelten Anzahlen *DsRed*-positiver Zellen nach 96 h Kokultivierung mit MSC die Populationsverdopplung (PD) und die Populationsverdopplungszeit (PDT) über folgende Formeln berechnet (Baxter *et al.* 2004):

$$PD = \frac{\log\left(\frac{\text{Gesamtzellzahl am Tag der Passage}}{\text{initial gesetzte Zellzahl}}\right)}{\lg 2} \quad PDT = \frac{\text{Tage zwischen Passagen}}{\text{zugehörige PD}}$$

Für Western-Blot-Analysen wurden o.g. Kulturen 48 h nach dem Setzen entsprechend 3.13 weiterverarbeitet.

3.10.2 Proliferation von CRC-Zellen bei Präsenz von konditioniertem Medium von MSC

Die Bestimmung des Einflusses von MSC-cM auf die Proliferation von CRC-Zellen wurde mittels Wachstumskinetiken im *96-well*-Format durchgeführt. Je eine Spalte wurde mit HCT8- bzw. DLD1-Zellen in einer Dichte von 8000 Zellen/cm² in 200 µL MSC-cM gesetzt (8-fach Bestimmung). Als Kontrollen dienten CRC-Zellen im Wachstumsmedium bzw. in CCD18Co-cM. Nach 48, 72 und 96 h wurde der Ansatz mit 10 % TCA abgestoppt und mittels SRB-Assay entsprechend 3.6.1 weiterverarbeitet. Es erfolgte der Vergleich der OD-Werte der Kulturen in MSC-cM gegenüber Kulturen im Wachstumsmedium bzw. in CCD18Co-cM.

Für Western-Blot- und quantitative PCR-Analysen wurden o.g. Kulturen im *6-well*-Format für 48 h kultiviert und anschließend entsprechend 3.13 bzw. 3.14 weiterverarbeitet.

3.11 Kultivierung von CRC-Zellen im 3D-Kulturmodell

3.11.1 Etablierung des 3D-Kulturmodells mittels Acid-Phosphatase-Assay

Für die Herstellung von 3D-Kulturen wurde die *Liquid-Overlay*-Methode angewendet (Yuhas *et al.* 1977). Um mittels 3D-Kultivierung der Zellen Einzelsphäroide reproduzierbarer Größe zu generieren, wurde im *96-well*-Format gearbeitet. Die Platten wurden mit 0,7 % Agarose (Seakem GTG in PBS, Lonza) beschichtet und direkt für die Versuche eingesetzt. Eine Lagerung der Platten erwies sich als nicht geeignet. Die Zellen wurden in einem Volumen von 200 µL Wachstumsmedium für CRC-Zelllinien pro *well* in die beschichteten Platten gesetzt und unter Standardbedingungen kultiviert.

Für einige Versuche wurden 3D-Kulturen über 5 d kultiviert. Es sollte eine Zellzahl eingesetzt werden, die über diesen Zeitraum ein Wachstum der Zellen ohne stationäre Phase gewährleistet. Da sich der bereits beschriebene SRB-Assay (3.6.1) spezifisch für adhärente Zellen eignete, wurde für die 3D-Kulturen der Acid-Phosphatase-Assay (Aph-Assay) eingesetzt. Prinzip dieses Assays ist die Dephosphorylierung von para-Nitrophenylphosphat zu para-Nitrophenol durch – in lebenden Zellen vorhandene – saure Phosphatasen. In einem zweiten Schritt wird das farblose para-Nitrophenol unter basischen Bedingungen zum gelben, photometrisch bestimmbaren para-Nitrophenolat umgewandelt. Es wurde gezeigt, dass die OD-Werte des para-Nitrophenolats linear mit der Anzahl lebender Zellen in 3D-Kulturen korrelieren (Friedrich *et al.* 2007 b).

Es wurde zunächst geprüft, ob in den untersuchten CRC-Zelllinien das Signal der Aph-Reaktion proportional zur eingesetzten Zellzahl ist. In *96-well*-Platten wurden 3D-Kulturen mit aufsteigender Zellzahl pro Spalte (50 - 5000 Zellen/*well*; 8-fach Bestimmung pro Zellzahl) gesetzt und für 48 h kultiviert. Die 3D-Kulturen und das gesamte umgebene Medium (200 µL) wurden mittels Multikanalpipette in eine unbeschichtete *96-well*-Platte überführt und 10 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Es wurden 160 µL Überstand abgezogen, mit 160 µL PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach wurden 100 µL Überstand abgezogen und durch 100 µL Aph-Substratpuffer ersetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37 °C für 90 min.

Abschließend wurde der Assay durch Zugabe von 30 μL 0,36 N NaOH gestoppt und die OD bei 405 nm am Mikroplatten-Reader (SpectraFluor Plus; Tecan) gemessen. Als Hintergrundwert diente eine zellfreie Spalte mit PBS und APh-Substratpuffer. Es wurde der MW der OD-Werte einer Spalte abzüglich Hintergrundwert gebildet und gegen die jeweilige Zellzahl aufgetragen.

In einer zweiten Analyse wurden verschiedene Zelldichten über eine Zeitspanne von 5 d untersucht, um zu prüfen, ob das Wachstum in eine stationäre Phase übergeht. Es wurden fünf Platten mit pro Spalte aufsteigender Zellzahl (1000/2000/3000/4000 Zellen/*well*) angesetzt. 24, 48, 72, 96 und 120 h nach dem Setzen der Zellen wurde der APh-Assay wie beschrieben durchgeführt. Die OD-Werte der jeweiligen Zellzahl wurden gegen die Zeit aufgetragen.

3.11.2 Generierung von 3D-Mischkulturen

Um den Einfluss von MSC auf die Ausbildung und Architektur der 3D-Kulturen von CRC-Zellen zu untersuchen, wurden 3D-Mischkulturen von CRC-Zellen und MSC im Verhältnis 5:1 wie folgt generiert: 3000 CRC-Zellen wurden mit 750 MSC gemischt und in 200 μL Wachstumsmedium für CRC-Zelllinien pro *well* gesetzt. Als Kontrollen dienten ungemischte sowie mit CCD18Co gemischte CRC-Zellen. Zur Analyse der Relevanz bestimmter Gene auf die Ausbildung und Architektur der 3D-Kulturen wurden genetisch veränderte CRC-Zellen bzw. MSC eingesetzt. Als Kontrollen dienten die jeweiligen WT- und mock-Zellen. Die 3D-Kulturen wurden 48 h nach dem Setzen lichtmikroskopisch beurteilt und fotodokumentiert bzw. für Western-Blot-Analysen entsprechend 3.13 weiterverarbeitet.

3.11.3 Zusätze für die 3D-Kultur

Um den Einfluss bestimmter Faktoren auf die Bildung von 3D-Kulturen von CRC-Zellen zu untersuchen, wurden diese 24 h nach dem Setzen der Zellen dem Wachstumsmedium zugesetzt oder die Zellen wurden, wie im Fall des cM, direkt darin kultiviert. Die Hersteller und eingesetzten Konzentrationen sind Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Tab. 3.1: Zusätze für die 3D-Kultur

Zusatz	Hersteller	Konzentration
Cycloheximid	Sigma Aldrich	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Kollagen I	Sigma Aldrich	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Kollagen IV	Sigma Aldrich	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Laminin	Sigma Aldrich	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Fibronektin	Sigma Aldrich	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Matrigel	BD Biosciences	1,7 %
MSC-/CCD18Co-cM	vgl. 3.3	100 %
anti E-Cadherin HECD1 (mouse)	Zymed (vgl. Tab. 2.2)	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Tab. 3.1: Zusätze für die 3D-Kultur (Fortsetzung)

Zusatz	Hersteller	Konzentration
anti β 1-Integrin P5D2 (mouse)	Abcam (vgl. Tab. 2.2)	10 μ g/mL
anti VCAM-1 B-K9 (mouse)	Abcam (vgl. Tab. 2.2)	10, 50 und 100 μ g/mL

3.12 *In vitro*-2D-Assay zur Analyse der Adhäsion von CRC-Zellen an MSC

Zur Analyse der β 1-Integrin-abhängigen Adhäsion von CRC-Zellen an Matrizes wurde ein 2D-Adhäsionsassay etabliert, in dem ein vorgelegter Monolayer aus MSC im Sinne einer prämetastatischen Nische agierte und CRC-Zellen nachträglich zugegeben wurden. Es sollte untersucht werden, ob die Anzahl der an MSC adhärennten CRC-Zellen von deren β 1-Integrin-Expression abhängig ist.

An d 1 wurden 3×10^5 GFP-MSC in 2 mL Wachstumsmedium für CRC-Zelllinien pro *well* einer 6-*well*-Platte gesetzt. An d 2 wurde das Medium entfernt und durch $1,4 \times 10^4$ β 1-I kd CRC-Zellen in 1 mL Wachstumsmedium ersetzt. Als Kontrollen dienten WT- sowie mock-CRC-Zellen. Die Platten wurden für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde vorsichtig mit PBS gespült und die Zellen mittels Trypsin-EDTA abgelöst. Es erfolgte die Bestimmung der Gesamtzellzahl pro *well* mittels Neubauer-Zählkammer sowie die durchflusszytometrische Analyse der adhärennten CRC-Zellen, bei der HCT8 und DLD1 durch ihre *DsRed*-Expression von den GFP-MSC unterschieden werden konnten. Im Fall der Zelllinie Colo320DM wurden die Zellen nach Bestimmung der Gesamtzellzahl entsprechend 3.9 mit CD13-FITC gefärbt, um schwach GFP-positive GFP-MSC weiter von den WT-Colo320DM zu diskriminieren. Die Anzahl der adhärennten β 1-I kd- und mock-CRC-Zellen wurde relativ zu denen der WT-CRC-Zellen bestimmt und aufgetragen.

3.13 Western-Blot-Analysen

Proteinisolierung

Sphäroide (vgl. 3.11) wurden geerntet, 2 x mit PBS gewaschen und in RIPA-Lysepuffer aufgenommen. Adhärennte Zellen bzw. Kokulturen (vgl. 3.10) wurden für die jeweiligen Untersuchungen im 6-*well*-Format für 48 h kultiviert, 2 x mit PBS gespült und anschließend direkt mit RIPA-Lysepuffer aus dem *well* geerntet. Die Lysate wurden mittels 27G Kanüle (BD Biosciences) homogenisiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die unlöslichen Zellbestandteile durch eine Zentrifugation für 15 min bei 13000 rpm und 4 °C pelletiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford mittels kommerziell erhältlicher Färbelösung (Bio-Rad Protein Assay; Bio-Rad Laboratories, München) nach Angaben des Herstellers bei 595 nm am Gerät BioSpec-1601 E (Shimadzu, Duisburg; DE).

Gelelektrophorese und Western-Blot

Je 10 µg Protein wurden mit Proteinladepuffer bei 95 °C denaturiert und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli aufgetrennt (System: Mini Protean Tetra Cell; BioRad) (Laemmli 1970). Der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (0,45 µm; GE Healthcare über A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg; DE) erfolgte mittels Tank-Blot bei 4 °C über Nacht nach Angaben des Herstellers (Mini Trans Blot Cell; Biorad). Die Membran wurde anschließend mit Wasser gespült und mit Ponceau S (*ready to use*; BioRad) zur Beurteilung der gleichmäßigen Beladung des Gels und des optimalen Transfers gefärbt. Zur Blockierung unspezifischer Bindestellen erfolgte die Inkubation der Membran in 5 % Trockenmilch in PBST bei RT. Danach wurde die Membran 2 h bei RT mit primärem Antikörper in 5 % Trockenmilch in PBST (Tab. 2.2) bzw. über Nacht bei 4 °C in 5 % BSA (Carl Roth) in PBST (Antikörper von Cell Signaling, Tab. 2.2) inkubiert. Weiterhin wurde die Membran 3 x 5 und 2 x 10 min mit PBST gewaschen. Die Inkubation mit sekundärem Antikörper (Tab. 2.3) erfolgte in PBST für 1 h bei RT. Abschließend wurde die Membran 3 x 5 min mit PBST gewaschen. Die Detektion der Immunkomplexe erfolgte mittels Chemilumineszenz (RotiLumin, Carl Roth) nach Angaben des Herstellers auf Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, GB) am Gerät „Hyperprocessor“ (Amersham Pharmacia Biotech).

3.14 Quantitative *real-time* PCR

Die quantitative *real-time* PCR (qPCR) ist eine Methode zur Quantifizierung der Genexpression auf mRNA-Ebene. Dabei wird Gesamt-mRNA aus Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben (reverse Transkription). Diese cDNA wird anschließend mit Primern für das zu analysierende Gen über eine quantitative PCR amplifiziert (qPCR). Nach jedem Zyklus erfolgt die Quantifizierung der amplifizierten DNA mit Hilfe eines Farbstoffs, der in die doppelsträngige DNA (dsDNA) interkaliert und dadurch zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Die Intensität des Fluoreszenzsignals steigt proportional zur vorhandenen dsDNA nach jedem Zyklus. Je mehr mRNA eines Gens ursprünglich vorhanden war, desto mehr cDNA liegt nach reverser Transkription vor und desto zeitiger wird in der anschließenden qPCR ein Fluoreszenzsignal messbar.

Isolierung von RNA und reverse Transkription

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte mittels Trizol (Invitrogen) mit anschließendem DNase I Verdau (DNase I, RNase free; Thermo Scientific) jeweils nach Angaben des Herstellers. Die Quantifizierung der RNA erfolgte photometrisch am Gerät Tecan infinite M200 Pro mit der Software i.Control 1.7 (beides Tecan).

Die reverse Transkription von mRNA in cDNA erfolgte mittels kommerziell erhältlichem Kit (GeneAmp® RNA PCR Kit; Applied Biosystems über Life Technologies). Es wurden 200 ng RNA, je 1 mM dNTP, 2,5 µM Oligo d(T)₁₆ Primer, 1 U/µL RNase-Inhibitor und 2,5 U/µL MuLV-Reverse Transkriptase (MuLV-RT) in einem Endvolumen von 10 µL

eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten Ansätze ohne Zugabe von MuLV-RT (-RT-Kontrolle). Die Reaktion verlief in einem Thermoblock (T-Gradient; Biometra, Göttingen; DE) bei folgendem Programm: (1) initiale Extension 5 min bei 25 °C, (2) reverse Transkription 30 min bei 42 °C und (3) Denaturierung 5 min bei 99 °C.

Quantitative real-time PCR

Der qPCR-Ansatz für die anschließende Amplifizierung wurde unter Verwendung der jeweiligen Primer (Tab. 2.4) mittels kommerziell erhältlichem Sybr-Green I Mastermix Kit nach Angaben des Herstellers generiert (GoTaq® qPCR Mastermix, Promega, Mannheim; DE). Es wurden 2 µL cDNA in einem Endvolumen von 15 µL mit je 0,5 µM Primer eingesetzt. Als *no-template*-Kontrollen dienten Ansätze mit H₂O (Test auf Kontamination in den Reagenzien) bzw. der -RT-Kontrolle anstelle cDNA (Test auf genomische DNA in den Proben).

Die qPCR erfolgte mit dem System Rotor-Gene 3000 unter Verwendung der Software Rotor-Gene 6 (beides Qiagen) mit folgendem Programm: (1) initiale Denaturierung 5 min bei 95 °C, (2) Denaturierung 60 s bei 95 °C, (3) Primer-*annealing* 45 s bei 60 °C, (4) Synthese 80 s bei 72 °C, (5) 40-fache Wiederholung der Schritte (2) - (4), (6) finale Synthese 5 min bei 72 °C, (7) Aufnahme einer Schmelzkurve im Temperaturbereich 72 - 99 °C.

Auswertung der Ergebnisse der qPCR mittels „comparative quantitation“

Zur Analyse der Rohdaten wurde die softwarespezifische Methode „*comparative quantitation*“ eingesetzt (Rotor-Gene 6). Hierbei wurde auf mRNA-Level die Genexpression einer Probe im Vergleich zu einer Referenzprobe berechnet (z. B. Expression von $\beta 1$ -*Integrin* in $\beta 1$ -I kd CRC-Zellen gegenüber WT-CRC-Zellen). Um Konzentrationsunterschiede in der eingesetzten cDNA zwischen den Proben auszugleichen, erfolgte die interne Normierung auf mindestens zwei nicht-regulierte Gene (*housekeeping*-Gene). Als *housekeeping*-Gene wurden *GAPDH* und *Alas-1* für MSC und *TBP* und *Alas-1* für CRC-Zellen eingesetzt.

Die dargestellten Ergebnisse sind MW aus zwei unabhängigen Experimenten. Für jedes Einzelerperiment wurde zusätzlich eine interne Wiederholung der reversen Transkription und qPCR durchgeführt.

3.15 Tierversuche

Für die Tierversuche wurden sechs Wochen alte Nacktmäuse (Hsd:Athymic Nude-*Foxn1*^{nu}; Harlan Winkelmann bzw. Eigenzucht des ZMG, Universitätsklinikum Halle/Saale) eingesetzt. Für ausgewählte Versuche wurden stringent immunsupprimierte NOD/SCID/IL-2R γ ^{Null}- (NOG-) Mäuse (CIEA, Japan über Taconic Europe, Lille Skensved; DK) verwendet. Die Versuche wurden gemäß institutioneller Bestimmungen durchgeführt. Für alle tierexperimentellen Arbeiten lagen Genehmigungen vor („Untersuchung der Tumorinvasion und Anti-Tumor-Aktivität transgener humaner mesenchymaler Stammzellen im Nacktmausmodell“ Nr. 42502-2-773-MLU; „Spezifischer Einfluss multipotenter Stromazellen (MSC) auf die

Tumorarchitektur und das frühe Wachstum kolorektaler Karzinome (CRC)“ Nr. 42502-2-1139-MLU; „Untersuchung des tumorigenen Potentials humaner mesenchymaler Stammzellen und deren Einfluss auf das Wachstum von Xenograften kolorektaler Karzinomzelllinien im NOG-Mausmodell“ Nr. 42502-2-1006-MLU).

3.15.1 Generierung subkutaner Xenografte

Um den Einfluss von MSC auf das Wachstum von CRC zu untersuchen, wurden 3×10^6 CRC-Zellen gemischt mit $0,75 \times 10^6$ MSC (Verhältnis 5:1) in 150 μ L RPMI-1640 ohne Zusätze subkutan (s.c., im Folgenden wird im Zusammenhang mit dem Begriff „Xenograft“ auf den Zusatz s.c. verzichtet) in die Flanken einer Nackt- bzw. NOG-Maus injiziert. Als Kontrollen dienten ungemischte bzw. mit CCD18Co gemischte CRC-Zellen. Zur Analyse der Relevanz bestimmter Gene auf das Wachstum von CRC wurden genetisch veränderte CRC-Zellen bzw. MSC eingesetzt. Als Kontrollen dienten die jeweiligen WT- und mock-Zellen. Es erfolgte die Injektion der Kontrolle in die kontralaterale Flanke einer Maus. Das Ausnutzen beider Flanken der Maus zur Generierung unterschiedlicher Xenografte bot zwei entscheidende Vorteile: Zum einen wurden interindividuelle Unterschiede, die das Tumorstadium beeinflussen können, eliminiert, da sie gleichermaßen zum Wachstum von Probe und Kontrolle beitragen und zum anderen konnte die Anzahl benötigter Tiere minimiert werden. Als Parameter für die Tumormasse diente das nicht-invasive *in vivo* multispektral-Fluoreszenz Imaging (msFI; 3.15.3) sowie die Bestimmung des Tumorstadiums (V) aus der mittels Schiebelehre ermittelten Tumorbreite (b) und Tumorstadium (l) über folgende Formel (Tomayko und Reynolds 1989):

$$V = b^2 * l * \frac{\pi}{6}$$

25 d nach s.c. Injektion wurden die Versuche beendet. Die Mäuse wurden mit einer Überdosis CO₂ getötet und die Xenografte wurden exzidiert, gewogen sowie entsprechend 3.16.1 weiterverarbeitet.

3.15.2 Analyse der β 1-Integrin-abhängigen Lungenmetastasierung von CRC-Zellen an MSC

Für die Analyse einer möglichen β 1-Integrin-abhängigen metastatischen Absiedlung von CRC-Zellen der Linie HCT8 an MSC wurde als Modell die Lungenmetastasierung gewählt. Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe war bekannt, dass MSC nach i.v. Applikation vermutlich aufgrund ihrer Größe und adhäsiven Eigenschaften einen Lungentropismus aufweisen und einige Stunden im Lungengewebe arretiert sind. Dies sollte ausgenutzt werden, um eine prä-metastatische Nische zu simulieren.

Zunächst wurden $0,5 \times 10^5$ MSC i.v. in Nacktmäuse appliziert. Nach 6 h erfolgte die i.v. Injektion von $0,5 \times 10^5$ β 1-Knockout HCT8-Zellen. Als Kontrollen dienten die Injektionen von WT- sowie mock-HCT8-Zellen. Je HCT8-Zelltyp wurde eine 3-fach Bestimmung (je drei Tiere) durchgeführt. Die i.v. Injektionen wurden freundlicherweise von Mitarbeitern des Hämatologisch-onkologischen Forschungslabors der Universitätsklinik und Poliklinik für

Innere Medizin IV, Universitätsklinikum Halle/Saale, realisiert. Die Mäuse wurden bei Eintreten von Abbruchkriterien, spätestens aber 91 d nach i.v. Injektion mit einer Überdosis CO₂ getötet. Die Lungen wurden exzidiert und entsprechend 3.16.1 weiterverarbeitet.

3.15.3 Nicht-invasives *in vivo* multispektral-Fluoreszenzimaging

Messmethode

Das nicht-invasive *in vivo* multispektral-Fluoreszenzimaging (msFI) kann als *read-out* für das Tumorwachstum s.c. DsRed-markierter Xenografte genutzt werden (Caysa *et al.* 2012). Es kam das Maestro™ *in vivo* Fluorescence Imaging System (Cri) mit der Maestro™ Software Version 2p22 bzw. den Updates 2.4.3 und 2.10.0 zum Einsatz.

Die Messung erfolgte beginnend ab 3 h nach Injektion der DsRed-markierten CRC-Zellen in einem Abstand von 3 - 4 d unter Narkotisierung der Tiere mit Isofluran (Isofluran-Narkosesystem; Drägerwerk AG, Lübeck; DE). Es wurde ein Sauerstoff-Strom von 2 - 3 L/min zugeführt. Die Narkotisierung wurde durch 4 % Isofluran eingeleitet und mit 1 % Isofluran über den Zeitraum der Messung aufrecht gehalten. Dabei wurde auf interindividuelle Unterschiede geachtet. Um ein Auskühlen der narkotisierten Mäuse zu vermeiden, erfolgte die Messung auf einer 35 °C-beheizten Wärmeplatte.

Zur Messung des DsRed-Signals wurde der grüne Filtersatz (Anregungsfilter: 503 - 555 nm; Emissionsfilter 580 nm LP) gewählt. Die Tischhöhe im Gerät wurde auf 1C gestellt, die Lampenhöhe auf 2. In der Software wurde die interne Signalverstärkung (*binning*) auf 2 x 2 gesetzt. Zur Erstellung der sog. *cubes* wurden mit grünem Filtersatz im Bereich von 550 - 800 nm seriell im Abstand von 10 nm Bilder bei automatischer Belichtungszeit unter Anregungslicht (zur Vermeidung von Überbelichtungen auf die nächst größte Ganzzahl abgerundet) aufgenommen und zu einem *cube* zusammengesetzt.

Bestimmung der DsRed-Intensität

Der erste Schritt zur Ermittlung der Fluoreszenzintensität (FI) der Xenografte bestand im „*unmixing*“. Die *cubes* wurden unter Verwendung der jeweiligen Fluoreszenzspektren in Graustufenbilder der Fluoreszenz-Einzelkomponenten aufgetrennt. Dabei wurde zwischen Hintergrundfluoreszenz, Autofluoreszenz der Maus und DsRed-Signal unterschieden. Die spezifischen Spektren lagen aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe vor (Caysa *et al.* 2012).

Die Quantifizierung des DsRed-Signals erfolgte für eine ROI (*Region Of Interest*), die manuell in das entsprechende Graustufenbild nach „*unmixing*“ gelegt wurde. Die Quantifizierung über eine manuelle ROI war geeignet, da es sich um deutlich sichtbare s.c. Xenografte handelte und exakt deren FI ermittelt werden sollte. Die Quantifizierung der FI innerhalb einer Studie erfolgte retrospektiv mit einer gleichbleibenden ROI, die anhand des größten Tumors festgelegt wurde. Die ermittelte FI wurde anschließend auf die Belichtungszeit des jeweiligen

cubes normiert, auf den Kontrollwert (normierte FI des jeweiligen Xenografts 3 h nach s.c. Injektion) skaliert und gegen die Zeit aufgetragen.

3.16 Histologische Untersuchungen von 3D-Kulturen, Xenograften und Lungen

3.16.1 Paraffin-Einbettung von 3D-Kulturen, Lungen und Xenograften

3D-Kulturen

Für die histologische Untersuchung wurden Sphäroide der 3D-Kulturen aus 96-*well*-Platten geerntet und in 15 mL Röhrchen gesammelt. Zwischen den folgenden Schritten wurden die Sphäroide durch die Schwerkraft sedimentiert, da eine Zentrifugation ihre Struktur zerstört hätte. Die Sphäroide wurden 2 x mit PBS gewaschen und über Nacht in 5 % Formalin fixiert. Das Formalin wurde für 30 min mit 50 % Ethanol ausgewaschen. Anschließend wurden die Sphäroide in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (50 % - 70 % - 80 % - 96 % Ethanol, Isopropanol, Xylol; jeweils 2 x 10 min). Dem 96 % Ethanol wurde 0,1 % Eosin G zugesetzt, um die Sphäroide anzufärben und die weitere Verarbeitung zu erleichtern. Mit der letzten Xylolstufe wurden die Sphäroide in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt, mit drei Paraffinpellets (Carl Roth) versetzt und über Nacht inkubiert. Anschließend wurde das Xylol-Paraffin-Gemisch durch pures Paraffin ersetzt und für 2 h bei 60 °C inkubiert. Abschließend wurden die Sphäroide im Paraffin in Formen gegossen, ausgehärtet und bei RT bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3D-Kulturen, die keine Sphäroide bildeten, wurden nach dem Ernten einmalig durch Zentrifugation (5 min 1300 rpm) pelletiert. Das feste Pellet wurde anschließend wie beschrieben in Paraffin eingebettet.

Lungen und Xenografte

Für histologische Analysen wurden die Lungen und Xenografte nach der Tötung der Tiere exzidiert und mindestens 2 d in Formalin fixiert. Die Entwässerung der Gewebe erfolgte automatisiert am Gerät Microm STP 120. Die Einbettung in Paraffin erfolgte halbautomatisch am Gerät Microm EC350-1 (beides Thermo Scientific).

3.16.2 Anfertigung von Gewebedünnschnitten

Von Paraffin-eingebetteten 3D-Kulturen und Xenograften wurden mittels Rotationsmikrotom (RM 2245; Leica, Wetzlar; DE) 4 µm-Schnitte vom größten Querschnitt der Probe hergestellt. Für die Identifizierung eventueller Lungenmetastasen, die in unterschiedlichen Ebenen der Lunge vorliegen könnten, wurden Serienschnitte im Abstand von 50 µm angefertigt. Die Schnitte wurden im Wasserbad gestreckt, auf Objektträger (Menzel-Gläser Superfrost; Thermo Scientific) gezogen und bei RT aufbewahrt.

3.16.3 Hämatoxylin- & Eosin-Färbung

Für die Hämatoxylin- & Eosin-Färbung (HE) wurden die Paraffin-Schnitte 1 h bei 50 °C angeschmolzen und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x Xylol - Isopropanol - 96 % - 80 % - 70 % - 50 % Ethanol - dest. H₂O; jeweils 5 min) entparaffiniert und gewässert. Anschließend erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin für 30 s (Dako REAL™ Hematoxylin *ready to use*; Dako), gefolgt von 10 min Bläuen unter fließendem Leitungswasser. Die Schnitte wurden kurz mit dest. H₂O gespült und 5 min in essigsaurer 0,1 % Eosin G-Lösung (Merck Millipore) gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (dest. H₂O - 50 % - 70 % - 80 % - 96 % Ethanol - Isopropanol - 2 x Xylol) entwässert. Um Entfärbungen zu vermeiden, wurden die Stufen bis zum Isopropanol schnell (je 10 s) und alle folgenden Alkoholstufen jeweils für die Dauer von 5 min durchlaufen. Die Objektträger wurden abschließend mit Histokitt eingedeckt (Carl Roth).

3.16.4 Immunhistochemische Färbung

Für die immunhistochemische Färbung (IHC) wurden die Paraffin-Schnitte entsprechend 3.16.3 entparaffiniert und gewässert. Anschließend erfolgte die Demaskierung der Antigene in Antigen-Retrieval (*ready to use*, pH 6,1; Dako) bei 95 °C. Alle weiteren Schritte wurden bei RT in feuchter Atmosphäre durchgeführt. Die abgekühlten Schnitte wurden in PBS gespült und einer Blockierung endogener Peroxidasen nach Angaben des Herstellers unterzogen (Dual Endogenous Enzyme Block; Dako). Nach kurzem Spülen in PBS wurden unspezifische Bindestellen mit 3 % BSA in PBS für 20 min blockiert. Es erfolgte anschließend die Inkubation der Schnitte mit primärem Antikörper (Tab. 2.2) in 1 % BSA in PBS für 3 h. Nach 3 x 10 min Spülen mit PBS erfolgte die Inkubation mit sekundärem Antikörper (Tab. 2.3) in PBS für 1 h. Nach erneutem Spülen mit PBS (3 x 10 min) wurden die Schnitte für 30 min mit Streptavidin-HRP-Konjugat in PBS (Tab. 2.3) inkubiert. Die Detektion der Immunkomplexe erfolgte nach erneutem Spülen mit PBS (3 x 10 min) mittels Dako Liquid DAB + Substrat Chromogen System nach Angaben des Herstellers (Dako). Nachdem überschüssiges Chromogen mit dest. H₂O abgespült wurde, erfolgte die Färbung der Zellkerne mit Hämatoxylin (Dako) für 5 min mit anschließendem 10 min Bläuen unter fließendem Leitungswasser. Zur Entwässerung wurden die Schnitte einer aufsteigenden Alkoholreihe (dest. H₂O - 50 % - 70 % - 80 % - 96 % Ethanol - Isopropanol - 2 x Xylol; je 5 min) unterzogen. Abschließend wurden die Objektträger mit Histokitt eingedeckt (Carl Roth).

Ki67-Färbungen ausgewählter Xenografte wurden freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Claudia Wickenhauser am Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

3.16.5 AZAN-Färbung

Die AZAN-Färbung nach Heidenhain wird zur Differenzierung extrazellulären Bindegewebes von zellulären Bestandteilen eingesetzt. Kollagene und retikuläre Fasern werden blau gefärbt,

elastine Fasern bleiben farblos. Zellkerne, Zytoplasma und Muskelgewebe erscheinen rot. Die Färbung erfolgte mittels kommerziell erhältlichem Kit nach Angaben des Herstellers, jedoch mit folgenden Modifikationen (Kit „AZAN nach Heidenhain“; Baacklab): Die Paraffin-Schnitte wurden 1 h bei 50 °C angeschmolzen und je 2 x 5 min in Xylol und 96 % Ethanol entparaffiniert. Anschließend erfolgte die Vorbehandlung der Schnitte für 5 min mit Anilinalkohol. Nach kurzem Spülen in dest. H₂O wurde für 30 min mit Azokarmin gefärbt. Nach erneutem kurzen Spülen in dest. H₂O wurde mit Anilinalkohol unter mikroskopischer Kontrolle ca. 5 min differenziert, bis nur noch die Zellkerne rot erschienen. Die Differenzierung wurde mittels 1 % essigsauerm Alkohol (3 x 1 min) gestoppt. Anschließend wurde mit dest. H₂O gespült, 45 min mit 5 % Phosphorwolframsäure gebeizt und mit dest. H₂O gespült. Die Färbung des Bindegewebes erfolgte mittels Anilinblau-Orange G für 30 min. Nach kurzem Spülen in dest. H₂O wurden die Schnitte über folgende aufsteigende Alkoholreihe entwässert: 96 % Ethanol 2 x 5 min, Isopropanol 1 x 5 min sowie Xylol 2 x 5 min. Abschließend wurden die Objektträger mit Histokitt eingedeckt (Carl Roth).

3.17 Mikroskopische Untersuchung und Bildgebung

3.17.1 Fotodokumentation von 2D- und 3D-Kulturen sowie Lungen

Die in der Arbeit gezeigten Bilder von *in vitro* kultivierten Zellen (2D-, 3D-Kultur, Soft-Agar-Assay) wurden am Mikroskop Axiovert-25 mit der Kamera AxioCam (beides Zeiss, Jena; DE) aufgenommen. Die mikroskopische Aufnahme histologischer Färbungen von Sphäroiden und Lungen erfolgte am Mikroskop AxioLab mit der o.g. Kamera. In beiden Fällen kam die Software AxioVision 3.1 (Zeiss) zum Einsatz. Die in der Arbeit gezeigten Bilder zeigen repräsentative Beispiele aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

3.17.2 Analyse von Mitosen in Xenograften

Die HE-Färbungen ausgewählter Xenografte wurden in Kooperation mit Frau Prof. Dr. med. Claudia Wickenhauser (Institut für Pathologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) begutachtet. Bildaufnahmen wurden am Mikroskop AxioScope A1 (Zeiss) mit der Kamera HD MKC-210HD (Ikegami, Öta; JP) unter 63-facher Vergrößerung durchgeführt. Als Software wurde das Programm HD doku Version 2.1 (Horn Imaging GmbH, Aalen; DE) verwendet. Es wurden Aufnahmen von sechs unterschiedlichen Blickfeldern pro Xenograft angefertigt und hinsichtlich der Anzahl sichtbarer Mitosen manuell ausgezählt.

3.18 Statistische Analysen

3.18.1 Gemischt-lineares Modell zur Bestimmung der MSC-vermittelten Wachstumsförderung von CRC-Xenograften

Alle statistischen Auswertungen erfolgten mit der Software SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago; US). Für einen ersten Überblick hinsichtlich Ausmaß und Verteilung der Daten wurden die Xenograftgewichte als Boxplots dargestellt.

Von Frau Dr. Susanne Unverzagt (Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) wurde aus den Xenograftgewichten ein generalisiertes Modell zur Bestimmung der MSC-vermittelten Wachstumsförderung von CRC berechnet. Aufgrund der experimentellen Konstellationen (zwei verschiedene Xenografte pro Maus, MSC von verschiedenen Spendern, unterschiedliche Zeitpunkte der experimentellen Durchführung) wurde ein gemischt-lineares Modell berechnet. Wegen der fehlenden Normalverteilung der Xenograftgewichte wurden die logarithmierten Werte für die Berechnung des Modells eingesetzt. Für nicht angewachsene Xenografte, die 0 mg entsprächen und damit keine Logarithmierung erlaubten, wurden 0,1 mg angenommen. Das gemischt-lineare Modell berechnet MW, MW-Differenzen und deren 95 %-Konfidenzintervalle (obere und untere Grenze) zur Beschreibung des Einflusses verschiedener Parameter auf die Xenograftgewichte. Diese berechneten Werte wurden anschließend exponiert, um die Logarithmierung umzukehren.

Für die Berechnung wurden in der Software folgende Parameter gewählt: Als Subjekt wurde die Maus und als Wiederholung die Flanke eingestellt. Der Kovarianztyp bei Messwiederholung wurde als zusammengesetzte Symmetrie angegeben. Die logarithmierten Xenograftgewichte wurden als abhängige Variable gewählt. Die Art der Zellinjektion (z.B. CRC-Zellen ungemischt, gemischt mit MSC, gemischt mit CCD18Co) wurde als Faktor und als fester Effekt angegeben. Daraus konnten Aussagen zur Höhe und statistischen Signifikanz des Einflusses der Art der Zellinjektion und Zelllinie auf die Xenograftgewichte ermittelt werden. Statistisch signifikante Unterschiede wurden bei einem p-Wert $\leq 0,05$ angenommen.

3.18.2 Weitere statistische Analysen

Für die statistische Auswertung des 2D-Assays (vgl. 3.12) erfolgte zunächst eine Untersuchung auf Normalverteilung der Daten mittels Shapiro-Wilk-Test. Bei vorhandener Normalverteilung erfolgte die Berechnung einer einfaktoriellen ANOVA, wobei statistisch signifikante Unterschiede bei einem p-Wert $\leq 0,05$ angenommen wurden. Die Messwerte wurden mittels Levene-Test auf Varianzhomogenität getestet. In den vorliegenden Fällen lag keine Varianzhomogenität vor, sodass Post-Hoc zur Bestimmung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen der Dunnett T3 Test durchgeführt wurde.

Für die statistische Auswertung der Anzahl an Mitosen in HE-Färbungen der jeweiligen Xenografte mit bzw. ohne MSC wurden die Daten zunächst mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. In den untersuchten Gruppen konnte eine Normalverteilung bestätigt werden, sodass zur Bestimmung eventueller statistischer Unterschiede zwischen den Gruppen ein t-Test durchgeführt wurde, wobei statistisch signifikante Unterschiede bei einem p-Wert $\leq 0,05$ angenommen wurden.

4. ERGEBNISSE

4.1 Der Einfluss von MSC auf das Wachstum von CRC-Xenograften *in vivo*

4.1.1 MSC vermitteln eine Wachstumsförderung von CRC im Nacktmausmodell

Zur Analyse des Einflusses von MSC auf das Wachstum von CRC *in vivo* wurden s.c. Xenografte aus CRC-Zellen gemischt mit MSC vergleichend gegenüber ungemischten CRC-Zellen in Nacktmäusen untersucht. Um eine mögliche Spezifität von MSC gegenüber anderen Stromazellen zu detektieren, wurden Xenografte aus CRC-Zellen gemischt mit CCD18Co als Kontroll-Stromakomponente generiert. Als Endpunktmessung dienten die Gewichte der exzidierten Xenografte 25 d nach Injektion. Die Xenograftgewichte für HCT8 und DLD1 sind als Boxplots in Abb. 4.1 dargestellt. Die aus den Rohdaten ermittelten MW der Xenograftgewichte mit Standardabweichung (Stabw) sind Tab. 4.1 zu entnehmen.

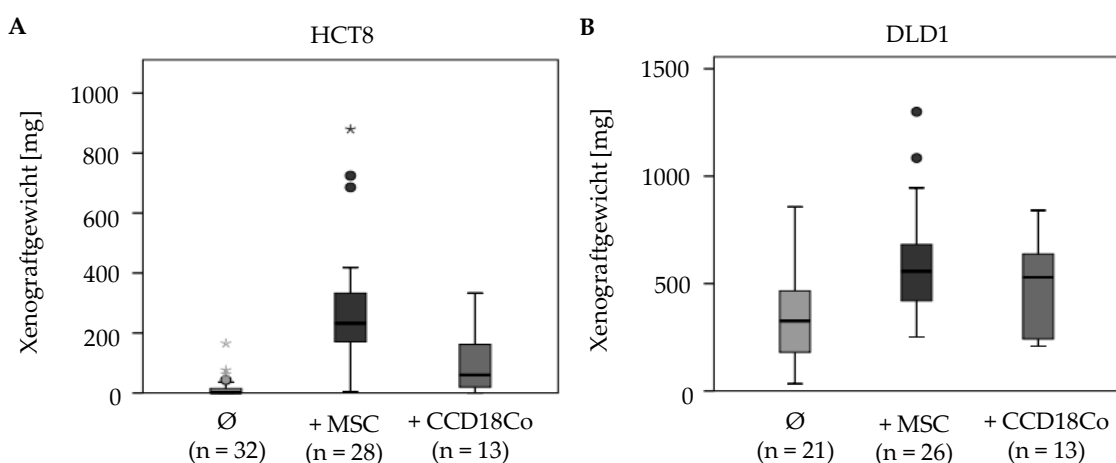


Abb. 4.1: MSC-vermittelte Wachstumsförderung von CRC-Xenograften im Nacktmausmodell. Boxplotdarstellung der Gewichte MSC-gemischter (+MSC), ungemischter (Ø) sowie CCD18Co-gemischter (+CCD18Co) Xenografte der CRC-Zelllinien HCT8 (A) und DLD1 (B) 25 d nach s.c. Injektion. Kreise – Ausreißer; Sterne – extreme Ausreißer.

Tab. 4.1: MW und Stabw von Gewichten s.c. CRC-Xenografte im Nacktmausmodell an d 25 nach Injektion

	HCT8			DLD1		
	Ø	+ MSC	+ CCD18Co	Ø	+ MSC	+ CCD18Co
MW [mg]	16	279	106	344	598	501
± Stabw [mg]	33	204	108	210	257	230

Anhand der Boxplots (Abb. 4.1) und Tab. 4.1 ist zu erkennen, dass MSC einen deutlich fördernden Einfluss auf das Xenograftwachstum von HCT8 ausübten. Die Gewichte MSC-gemischter Xenografte stiegen auf das 17-Fache von denen der ungemischten Xenografte an. Diese MSC-vermittelte Wachstumsförderung schien weiterhin spezifisch gegenüber CCD18Co zu sein. Bei Präsenz von MSC wurden Gewichte von mehr als dem 2,5-Fachen im

Vergleich zu CCD18Co-gemischten Xenograften gemessen. Die Unterschiede in der CRC-Zelllinie DLD1 waren nicht so deutlich ausgeprägt, dennoch zeigte sich auch hier ein MSC-vermittelter Wachstumsvorteil: MSC bewirkten im Vergleich zu ungemischten Xenograften einen nahezu 2-fachen Anstieg des Xenograftgewichts. Auch im Vergleich zu CCD18Co-gemischten Xenograften lag bei Präsenz von MSC ein leicht höheres Gewicht vor.

Da in MSC-gemischten CRC-Xenograften an d 25 nach Injektion keine MSC mehr nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt), wurde für die vorliegende Arbeit der Anteil initial zugegebener MSC am Xenograftgewicht an d 25 nach Injektion vernachlässigt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in beiden CRC-Zelllinien eine MSC-vermittelte Wachstumsförderung der Xenografte detektiert werden konnte, deren Ausmaß in der Linie HCT8 deutlich größer war als in DLD1. Die vermittelte Wachstumsförderung war in beiden untersuchten CRC-Zelllinien durch MSC stärker ausgeprägt als durch CCD18Co, wobei sich auch dieser Effekt prominent in HCT8 gegenüber DLD1 äußerte.

4.1.2 Gemischt-lineares Modell zur MSC-vermittelten Wachstumsförderung von CRC im Nacktmausmodell

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde aus den Rohdaten (4.1.1) ein statistisches Modell zur Bestimmung der MSC-vermittelten Wachstumsförderung von CRC-Xenograften in Nacktmäusen berechnet (vgl. 3.18.1). Zunächst wurde geprüft, ob die erhobenen Xenograftgewichte eine Normalverteilung aufwiesen. Die Ergebnisse für HCT8 und DLD1 sind den Abb. A2 A und A3 A im Anhang zu entnehmen (S. 103).

Die Gewichte der ungemischten HCT8-Xenografte zeigten eine schiefe Verteilung zu einer großen Anzahl sehr kleiner Xenografte (Anhang Abb. A2 A). Viele ungemischte HCT8-Xenografte konnten aufgrund eines mangelnden Anwachsens nicht exzidiert werden. Für die Logarithmierung wurde hier ein Gewicht von 0,1 mg angenommen. Es zeigte sich, dass durch die Logarithmierung in ungemischten HCT8-Xenograften eine ausgeglichene Verteilung erzielt werden konnte (Anhang Abb. A2 B). Im Fall der Xenograftgewichte der CRC-Zelllinie DLD1 konnte ebenfalls mittels Logarithmierung eine Verteilung erzielt werden, die sich einer Normalverteilung annäherte (Anhang Abb. A3 A und B).

Da mittels Logarithmierung eine annähernde Normalverteilung erreicht werden konnte, wurden für die Berechnung des Modells die logarithmierten Xenograftgewichte eingesetzt. In Abb. 4.2 und Tab. 4.2 sind die berechneten MW der Xenograftgewichte sowie obere und untere Grenzen des 95 %-Konfidenzintervalls dargestellt. Signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen (ungemischte, MSC-gemischte oder CCD18Co-gemischte Xenografte) wurden bei einem p-Wert $\leq 0,05$ angenommen.

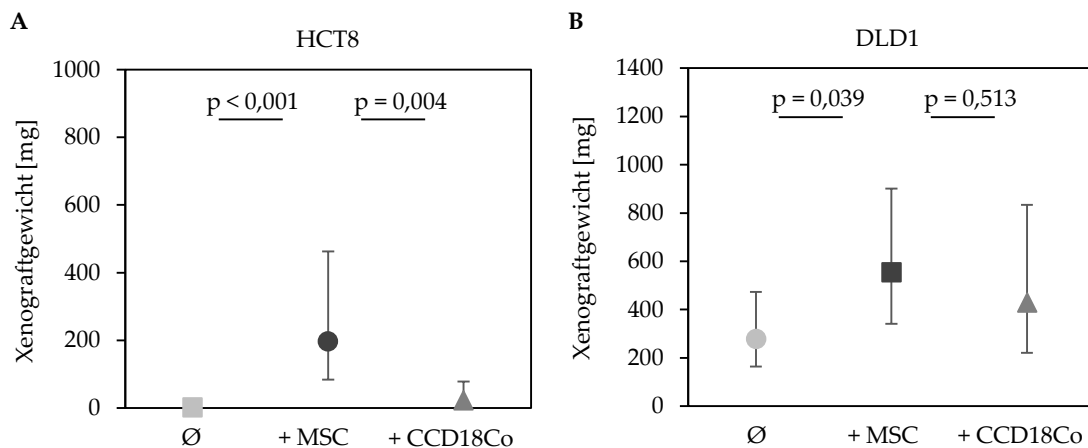


Abb. 4.2: Gemischt-lineares Modell zur Bestimmung der MSC-vermittelten Wachstumsförderung von CRC-Xenograften im Nacktmausmodell. Mittels gemischt-linearem Modell berechnete MW sowie obere und untere Grenzen der Gewichte MSC-gemischter (+MSC), ungemischter (Ø) sowie CCD18Co-gemischter (+CCD18Co) s.c. Xenografte der CRC-Zelllinien HCT8 (A) und DLD1 (B).

Tab. 4.2: MW sowie obere und untere Grenzen des gemischt-linearen Modells zur MSC-vermittelten Wachstumsförderung s.c. CRC-Xenograften im Nacktmausmodell

	HCT8			DLD1		
	Ø	+ MSC	+ CCD18Co	Ø	+ MSC	+ CCD18Co
MW [mg]	1,3	197	23	279	555	429
untere Grenze	0,6	84	6	165	342	220
obere Grenze	2,9	463	79	474	901	834

Für die CRC-Zelllinie HCT8 wurden mittels gemischt-linearem Modell signifikant höhere Gewichte in MSC-gemischten Xenograften sowohl gegenüber ungemischten als auch gegenüber CCD18Co-gemischten Xenograften ermittelt (Abb. 4.2 A).

Das gemischt-lineare Modell der CRC-Zelllinie DLD1 zeigte einen signifikanten Einfluss von MSC auf das Xenograftwachstum im Vergleich zu ungemischten Xenograften. Der fördernde Einfluss von MSC auf das Gewicht der Xenograften war gegenüber dem von CCD18Co nicht signifikant (Abb. 4.2 B).

Mittels gemischt-linearen Modells konnten die aus den Rohdaten getroffenen Aussagen hinsichtlich einer MSC-vermittelten Wachstumsförderung von CRC-Xenograften bestätigt werden. MSC zeigten in beiden untersuchten CRC-Zelllinien einen signifikanten Einfluss auf die Xenograftgewichte. Weiterhin war der Einfluss von MSC auf die Xenograftgewichte der Linie HCT8 signifikant höher gegenüber dem von CCD18Co.

4.1.3 MSC vermitteln die Wachstumsförderung von CRC während einer frühen Phase des Xenograftwachstums

Der ermittelte fördernde Einfluss von MSC auf die Gewichte von CRC-Xenograften stellte eine Endpunktmessung an d 25 nach Injektion dar und lieferte kaum Informationen über einen

eventuellen Einfluss von MSC auf die Wachstumskinetik der Xenografte. Dies sollte mittels nicht-invasivem *in vivo* multispektral-Fluoreszenzimagining (msFI) MSC-gemischter Xenografte DsRed-markierter CRC-Zellen vergleichend gegenüber ungemischter und CCD18Co-gemischter Xenografte untersucht werden (3.15.3). Das msFI eignet sich für die Untersuchung von Wachstumskinetiken, da für s.c. Xenografte fluoreszenzmarkierter Zellen eine Korrelation zwischen Fluoreszenzintensität (FI) und Tumolvolumen beschrieben ist (Caysa *et al.* 2012). Über einen Zeitraum von 25 d wurden regelmäßig die Fluoreszenzsignale der Xenografte quantifiziert und als normierte FI gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 4.3). Die MW und Stabw der FI an d 25 nach Injektion sind Tab. A1 im Anhang zu entnehmen (S. 113).

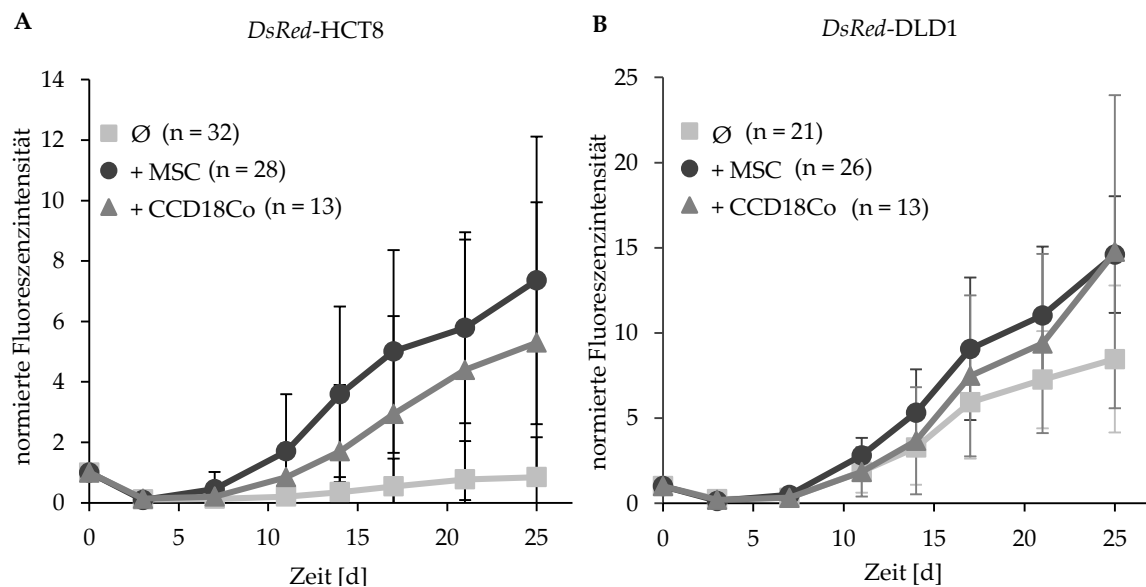


Abb. 4.3: MSC-vermittelter Einfluss auf die Wachstumskinetik DsRed-markierter CRC-Xenografte im Nacktmausmodell. Mittels msFI ermittelte normierte FI MSC-gemischter (+MSC), ungemischter (Ø) sowie CCD18Co-gemischter (+CCD18Co) s.c. Xenografte der CRC-Zelllinien *DsRed-HCT8* (A) und *DsRed-DLD1* (B). Dargestellt als MW mit Stabw.

Bei dem msFI handelt es sich um eine sensitive Methode. Das gewählte s.c. Xenograftmodell unterlag durch den Stromaanteil, der Injektionstiefe und der Form des entstehenden Xenografts zahlreichen Variablen. Die spektralen Eigenschaften des gewählten Fluoreszenzproteins DsRed trugen maßgeblich zur Steigerung der Fehleranfälligkeit bei der Bildgebung bei (siehe Stabw in Abb. 4.3). Aufgrund dieser Fehleranfälligkeit wurde auf die statistische Auswertung dieser Daten verzichtet. Das msFI eignete sich jedoch besonders zur Messung der frühen Wachstumskinetik der Xenografte, da sich die Fehler insbesondere erst im späteren Verlauf manifestierten. Aus diesem Grund lag der Fokus der Auswertung des msFI auf frühen Zeitpunkten. Die MW und Stabw der normierten FI an d 14 sind Tab. 4.3 zu entnehmen.

Tab. 4.3: Normierte DsRed-FI s.c. CRC-Xenografte im Nacktmausmodell an d 14 nach Injektion

	<i>DsRed-HCT8</i>			<i>DsRed-DLD1</i>		
	Ø	+ MSC	+ CCD18Co	Ø	+ MSC	+ CCD18Co
MW	0,35	3,59	1,7	4,3	5,77	2,95
± Stabw	0,5	2,91	2,2	2,56	2,83	2,55

Es konnte gezeigt werden, dass durch Präsenz von MSC ein im Vergleich zu den Kontrollen früherer Wachstumsbeginn, insbesondere in Xenograften von HCT8 aber auch von DLD1, eingetreten war. In beiden CRC-Zelllinien konnte ab d 7 nach Injektion ein höherer Anstieg der normierten FI in MSC-gemischten Xenograften im Vergleich zu den ungemischten bzw. CCD18Co-gemischten Xenograften gemessen werden (Abb. 4.3). Die Werte der normierten FI an d 14 nach Injektion verdeutlichen dies (Tab. 4.3): Die normierte FI für ungemischte HCT8-Xenografte war auf das 0,3-Fache des Ausgangswerts gesunken, wohingegen MSC-gemischte Xenografte bereits einen Anstieg der FI um das 3,5-Fache des Ausgangswertes zeigten. Außerdem betragen die Werte der normierten FI MSC-gemischter Xenografte mehr als das Doppelte von denen der CCD18Co-gemischten Xenografte. Dieser MSC-spezifische Effekt auf das Xenograftwachstum an d 14 zeigte sich ähnlich, jedoch nicht so stark ausgeprägt, für die CRC-Zelllinie DLD1: Während die normierten FI ungemischter Xenografte an d 14 um Faktor 4 angestiegen war, betrug das Wachstum der normierten FI MSC-gemischter Xenografte annähernd das 6-Fache. Auch hier entsprach der Anstieg der normierten FI bei Präsenz von MSC dem Doppelten der CCD18Co-gemischten Xenografte.

Um das Xenograftwachstum zu späteren Zeitpunkten der Versuche mit einer weiteren Methode zu bewerten, wurden Volumenberechnungen der CRC-Xenografte entsprechend 3.15.1 durchgeführt (Abb. A4, S. 104). Es wurde für beide untersuchte CRC-Zelllinien bis d 25 nach Injektion ein im Vergleich zu den Kontrollen größeres Xenograftvolumen bei Präsenz von MSC festgestellt. Weiterhin wurde ermittelt, dass in der Linie HCT8 die Volumenzuwächse zwischen den Messpunkten bei Präsenz von MSC bis d 25 nach Injektion deutlich stärker anstiegen als in den Kontrollen, wodurch die MSC-Spezifität der Wachstumsförderung bestätigt werden konnte. Für die Linie DLD1 hingegen schien der Wachstumsvorteil durch MSC vor allem in der mittels msFI bestätigten frühen Phase relevant zu sein: Zu späteren Zeitpunkten unterschieden sich die Anstiege der Volumina zwischen den Messpunkten kaum noch von denen der ungemischten Xenografte. Auch konnte im Gegensatz zu HCT8 keine MSC-Spezifität gegenüber CCD18Co detektiert werden, wobei jedoch die geringe Stichprobe CCD18Co-gemischter DLD1-Xenografte berücksichtigt werden sollte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mittels msFI und Volumenmessung die, anhand der Xenograftgewichte, beobachtete MSC-vermittelte Wachstumsförderung bestätigt werden konnte. Diese zeigte erneut eine prominente Ausprägung in der Linie HCT8 gegenüber DLD1. Die mittels msFI beobachteten früheren Anstiege der FI MSC-gemischter gegenüber

ungemischter Xenografte lassen vermuten, dass dieser MSC-vermittelte Einfluss bereits innerhalb einer frühen Phase des Xenograftwachstums eine Rolle spielte.

4.1.4 Die MSC-vermittelte Wachstumsförderung von CRC beruht nicht ausschließlich auf dem immunregulatorischen Potential von MSC

Hsd:Athymic Nude-*Foxn1^{nu}* Mäuse verfügen über ein residuelles Immunsystem aus B- und NK-Zellen (Silobrcic *et al.* 1990). MSC besitzen ein immunregulatorisches Potential. Um auszuschließen, dass die in 4.1.2 dargestellte MSC-vermittelte Wachstumsförderung von CRC in Nacktmäusen ausschließlich auf immunsuppressiven Effekten von MSC auf B- und NK-Zellen basierte, wurde in orientierenden Studien der Einfluss von MSC auf das Wachstum von CRC im NOG-Mausmodell analysiert. NOG-Mäuse weisen weder B- oder T-Zell-Immunität auf, noch besitzen sie eine aktive NK-Zellpopulation (Ito *et al.* 2002), sodass ein möglicher immunsuppressiver Effekt der MSC-vermittelten Wachstumsförderung von CRC-Xenograften in diesem Modell keine Bedeutung haben sollte. Die Gewichte ungemischter, MSC-gemischter sowie CCD18Co-gemischter Xenografte der Linien HCT8 und DLD1 in NOG-Mäusen sind als Boxplots in Abb. 4.4 dargestellt. Die aus den Rohdaten ermittelten MW der Xenograftgewichte mit Stabw sind Tab. A2 im Anhang zu entnehmen (S. 113).

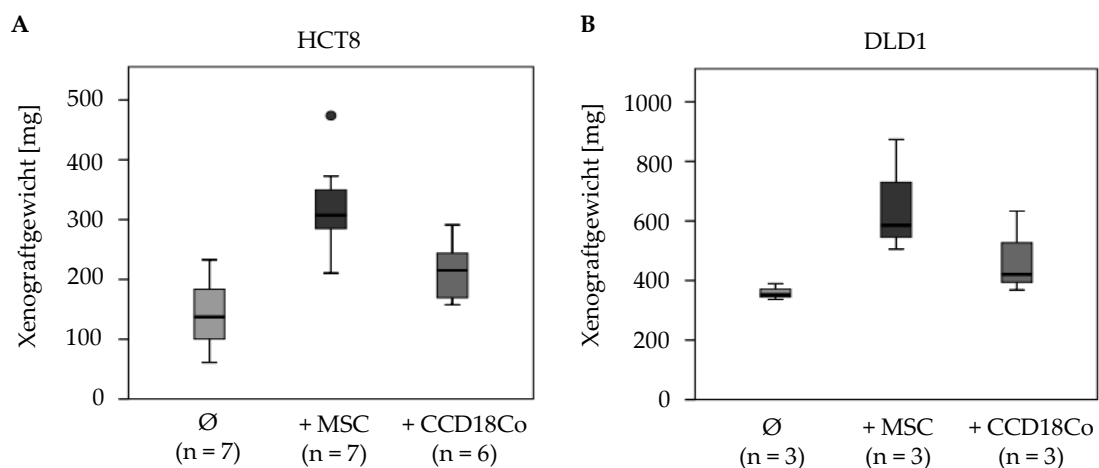


Abb. 4.4: MSC-vermittelte Wachstumsförderung von CRC-Xenograften im NOG-Mausmodell. Boxplotdarstellung der Gewichte MSC-gemischter (+MSC), ungemischter (Ø) sowie CCD18Co-gemischter (+CCD18Co) Xenografte der CRC-Zelllinien HCT8 (A) und DLD1 (B) 25 d nach s.c. Injektion. Kreise – Ausreißer.

Im Vergleich mit Abb. 4.1 ist zu sehen, dass HCT8-Xenografte im NOG-Mausmodell höhere Gewichte erzielten als im Nacktmausmodell. Für die Arbeit war jedoch relevant, dass die im Nacktmausmodell definierte MSC-vermittelte Wachstumsförderung auch im NOG-Mausmodell reproduziert werden konnte: MSC-gemischte HCT8-Xenografte zeigten in NOG-Mäusen vergleichend gegenüber den ungemischten Xenograften einen Anstieg der Gewichte um mehr als das 2-Fache. Weiterhin konnte der im Nacktmausmodell beobachtete, stärkere Einfluss von MSC gegenüber CCD18Co auf das Xenograftgewicht im NOG-Mausmodell bestätigt werden (Abb. 4.4 A). Für die CRC-Zelllinie DLD1 zeigt der Vergleich mit Abb. 4.1, dass die Verhältnisse im NOG-Mausmodell denen des Nacktmausmodells entsprachen. Die

MSC-vermittelte Wachstumsförderung äußerte sich in einem Anstieg der Gewichte MSC-gemischter Xenografte um fast das Doppelte im Vergleich zu ungemischten Xenograften. Auch gegenüber CCD18Co-gemischten Xenograften konnten bei Präsenz von MSC höhere Gewichte gemessen werden (Abb. 4.4 B). Angesichts des orientierenden Charakters der Studie und der Zahl der Versuchsansätze wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

Als Ergebnis ist hervorzuheben, dass im NOG-Mausmodell für beide CRC-Zelllinien eine MSC-vermittelte Wachstumsförderung, die im Ausmaß über die von CCD18Co hinausging, zu detektieren war. Somit konnte die MSC-vermittelte Wachstumsförderung von CRC *in vivo* nicht ausschließlich durch immunsuppressive Mechanismen erklärt werden.

4.2 Der Einfluss von MSC auf die Proliferation von CRC-Zellen *in vitro*

4.2.1 Die direkte Kultivierung mit MSC führt nicht zu einem Proliferationsvorteil von CRC-Zellen

Um die Hypothese zu klären, ob die MSC-vermittelte Wachstumsförderung *in vivo* auf einer MSC-vermittelten Förderung der Proliferation von CRC-Zellen beruhte, wurden *in vitro* im 2D-Modell die Wachstumskinetiken MSC-gemischter Kokulturen von CRC-Zellen gegenüber ungemischten sowie CCD18Co-gemischten CRC-Zellen über einen Zeitraum von 96 h nach Beginn der Kultivierung verglichen. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Ansätzen mit jeweils verschiedenen Spender-MSC sind in Abb. 4.5 dargestellt. Die exakten MW mit Stabw für Kulturen 96 h nach dem Setzen sind Tab. A3 im Anhang zu entnehmen (S. 113).

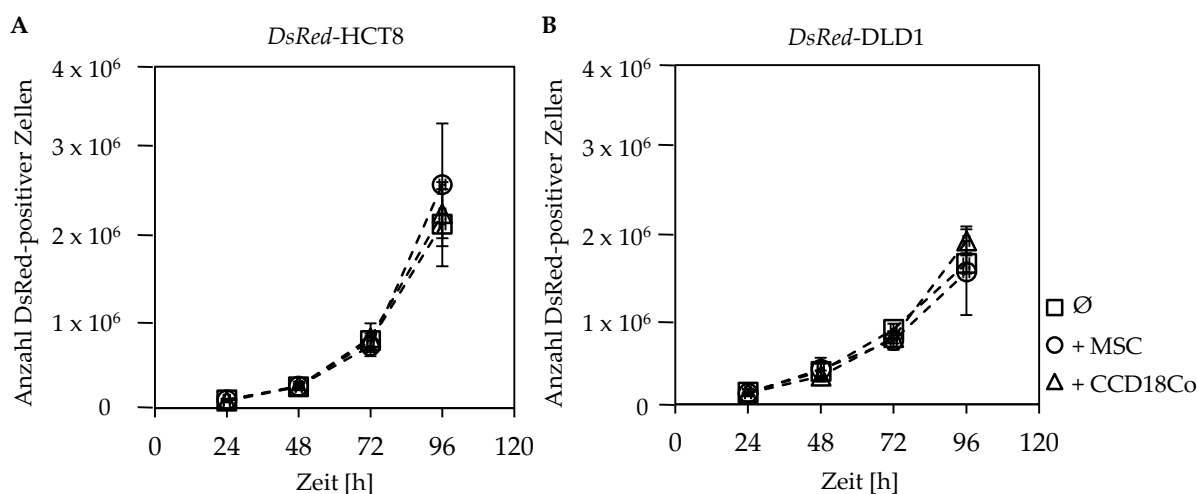


Abb. 4.5: Einfluss von MSC auf die Proliferation von CRC-Zellen *in vitro*. Durchflusszytometrisch ermittelte Anzahl DsRed-positiver CRC-Zellen nach direkter 2D-Kokultivierung mit GFP-MSC (+MSC) vergleichend gegenüber ungemischten (∅) sowie mit GFP-CCD18Co gemischten Kokulturen (+CCD18Co) der CRC-Zelllinien *DsRed-HCT8* (A) und *DsRed-DLD1* (B). Dargestellt als MW mit Stabw aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Kurvenverläufe in Abb. 4.5 zeigen, dass im Vergleich zu ungemischten bzw. CCD18Co-gemischten 2D-Kulturen kein Einfluss von MSC auf die Proliferation von CRC-Zellen der Linien HCT8 und DLD1 *in vitro* vorlag.

Aus der initial gesetzten Zellzahl und den ermittelten Zellzahlen 96 h nach dem Setzen (Anhang Tab. A3, S. 113) wurden entsprechend 3.10.1. die Populationsverdopplungen (PD d 4) sowie Populationsverdopplungszeiten (PDT) ermittelt (Tab. 4.4).

Tab. 4.4: Berechnete PD und PDT 2D-kultivierter CRC-Zellen in Abhängigkeit der Präsenz von MSC

	HCT8			DLD1		
	Ø	+ MSC	+ CCD18Co	Ø	+ MSC	+ CCD18Co
PD d 4	4,9	5,2	5	4,5	4,4	4,7
PDT [d]	0,8	0,8	0,8	0,9	0,9	0,8

MSC zeigten gegenüber ungemischten bzw. CCD18Co-gemischten 2D-Kulturen der CRC-Zelllinien HCT8 und DLD1 keinen Einfluss auf die Werte für PD und PDT.

4.2.2 Weitere Analysen zum Einfluss von MSC auf die Proliferation von CRC-Zellen

Mittels Western-Blot-Analysen von in 4.2.1 genannten Kokulturen 48 h nach dem Setzen wurde untersucht, ob MSC einen Einfluss auf proliferationsrelevante Signalwege (FAK, Akt, Erk1/2 und p38) nehmen. Weder in der Linie HCT8 noch DLD1 konnte eine Aktivierung (Phosphorylierung) dieser Proteine ermittelt werden (Anhang Abb. A5, S. 104).

Es sollte weiterhin geklärt werden, ob sezernierte Faktoren von MSC, die in den direkten Kokulturen eventuell in zu verdünnter Form vorlagen, einen Einfluss auf die Proliferation von CRC-Zellen *in vitro* nehmen. Für diese Analyse kamen Wachstumskinetiken für CRC-Kulturen in MSC-cM vergleichend gegenüber Wachstumsmedium sowie CCD18Co-cM mittels SRB-Assay (vgl. 3.10.2) zum Einsatz. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Ansätzen mit MSC-cM von drei verschiedenen Spender-MSCs sind in Abb. 4.6 dargestellt.

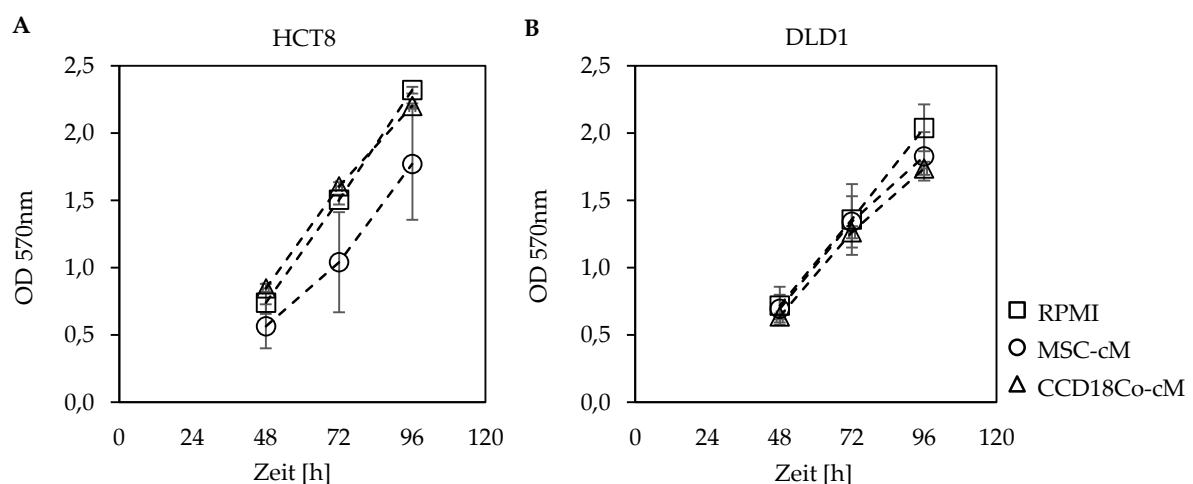


Abb. 4.6 Einfluss von MSC-cM auf die Proliferation von CRC-Zellen *in vitro*. Mittels SRB-Assay ermittelte Wachstumskinetik von CRC-Zellen kultiviert in MSC-cM vergleichend gegenüber der Kultivierung in Wachstumsmedium (RPMI) oder in CCD18Co-cM für die CRC-Zelllinien HCT8 (A) und DLD1 (B). Dargestellt als MW mit Stabw aus drei unabhängigen Experimenten.

Es ist zu erkennen, dass die Kultivierung in MSC-cM keinen Einfluss auf die Proliferation der untersuchten CRC-Zelllinien genommen hat. Der scheinbar proliferationshemmende Effekt von MSC-cM auf Zellen der Linie HCT8 (Abb. 4.6 A) muss unter Einbeziehung der hohen Stabw der OD-Werte betrachtet werden. Diese resultierten vermutlich aus dem unterschiedlich starken Einfluss von MSC-cM unterschiedlicher Spender.

Die Daten lassen vermuten, dass für beide untersuchten CRC-Zelllinien sowohl bei direkter Kokultivierung als auch bei Präsenz von MSC-cM kein MSC-vermittelter Einfluss auf die Proliferation *in vitro* vorlag.

4.3 Der Einfluss von MSC auf die Sphäroidbildung E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen *in vitro*

4.3.1 Etablierung der 3D-Kultur von CRC-Zellen

Aus den Resultaten des msFI wurde abgeleitet, dass MSC während einer frühen Phase des CRC-Xenograftwachstums eine Rolle spielten. Es wurde die Hypothese formuliert, dass MSC einen Einfluss auf die frühe Xenograftarchitektur genommen haben, was letztlich zu einem schnelleren Anwachsen und damit zu höheren Xenograftgewichten *in vivo* führte. Um dies zu analysieren, sollte der Einfluss von MSC auf die Sphäroidbildung von CRC-Zellen als Modell für die Ausbildung einer Xenograftarchitektur untersucht werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dazu das 3D-Kulturmodell etabliert.

In einem ersten Schritt wurden Versuche zur Optimierung der eingesetzten Zellzahl durchgeführt. Die Fotodokumentation der 3D-Kulturen erfolgte 48 h nach dem Setzen. Bei der Etablierung der Methode fiel auf, dass die ausgewählten CRC-Zelllinien ein unterschiedliches Verhalten im 3D-Kulturmodell zeigten. Während die Linie DLD1 Sphäroide ausbildete, war die Linie HCT8 ausschließlich zur Ausbildung lockerer Aggregate fähig (Abb. 4.7).

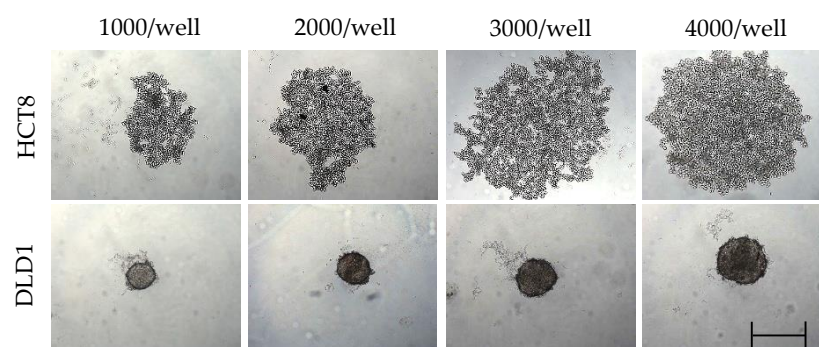


Abb. 4.7 Etablierung der optimalen Zellzahl für die 3D-Kultur von CRC-Zellen *in vitro*. 3D-Kultur der CRC-Zelllinien HCT8 und DLD1 mit unterschiedlichen Zellzahlen (1000/2000/3000/4000 pro well). Mikroskopische Aufnahme 48 h nach dem Setzen, Balken – 500µm.

Da einige Versuche über einen Zeitraum von 120 h durchgeführt werden sollten, wurde mittels APh-Assay geprüft, welche der gewählten Zellzahlen über diesen Zeitraum eine Proliferation der Zellen innerhalb der 3D-Kultur gewährleistete.

Zunächst wurde gezeigt, dass das Signal der APh-Reaktion 48 h nach dem Setzen der 3D-Kulturen mit der initial gesetzten Zellzahl korrelierte (Anhang Abb. A6, S. 105). Eine anschließende Wachstumskinetik der o.g. Zellzahlen zeigte ein stetiges Wachstum der 3D-Kulturen beider untersuchter Zelllinien über die Dauer des gesamten Versuchs (Anhang Abb. A7, S. 105). Zu beachten ist, dass die CRC-Zelllinie HCT8 im Vergleich zu DLD1 deutlich höhere OD-Werte lieferte. Dies könnte durch die stärkere Proliferation von Zellen in lockeren, monolayerähnlichen Aggregaten im Vergleich zu Zellen innerhalb eines Sphäroids erklärt werden (Casey *et al.* 2001).

Zusammenfassend deuten die Resultate darauf hin, dass für die ausgewählten Zellzahlen im 3D-Kulturmodell eine kontinuierliche Proliferation der Zellen über den untersuchten Zeitraum gewährleistet war. Für alle weiteren Versuche wurde eine CRC-Zellzahl von 3000 Zellen/*well* ausgewählt.

4.3.2 MSC vermitteln die Sphäroidbildung in per se zur Sphäroidbildung unfähigen CRC-Zellen

Das 3D-Kulturmodell wurde gewählt, um Tumor-Stroma-Interaktionen im CRC zu identifizieren. Zur Analyse eines möglichen spezifischen Einflusses von MSC auf das Wachstum von 3D-Kulturen wurden MSC-gemischte CRC-Zellen vergleichend gegenüber CCD18Co-gemischten CRC-Zellen hinsichtlich der Ausbildung von Sphäroiden untersucht (Abb. 4.8 A).

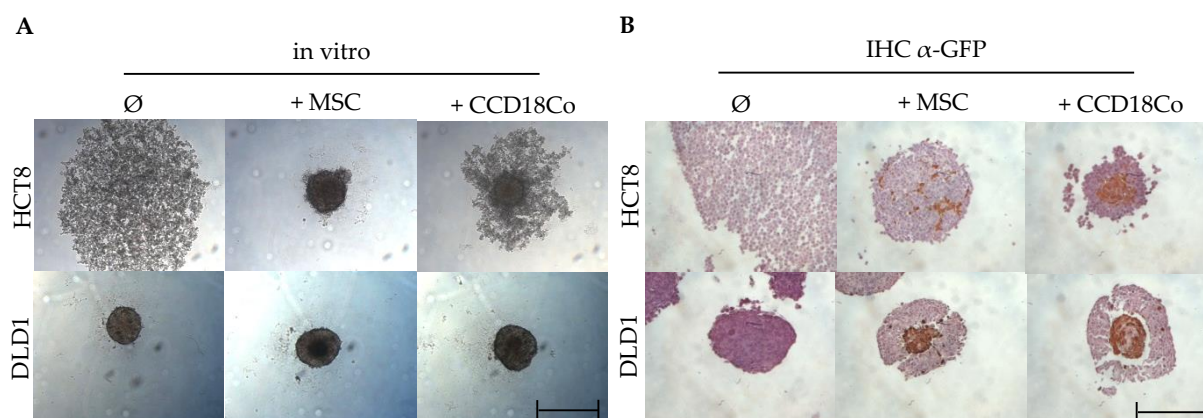


Abb. 4.8: MSC-vermittelte Sphäroidbildung von CRC-Zellen. (A) *In vitro*-3D-Kulturen GFP-MSC-gemischter (+MSC), ungemischter (Ø) sowie GFP-CCD18Co-gemischter (+CCD18Co) Zellen der CRC-Zelllinien HCT8 und DLD1, Balken – 500 µm. (B) Immunhistochemischer Nachweis von GFP der in (A) gezeigten 3D-Kulturen, Balken – 250 µm.

Auffällig war die Beobachtung, dass die CRC-Zelllinie HCT8, die per se nicht zur Sphäroidbildung fähig war, in Anwesenheit von MSC bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Kultivierung (innerhalb 24 h) Sphäroide ausbildete. Durch die Kultivierung mit CCD18Co wurde keine Sphäroidbildung von HCT8-Zellen erreicht. Zwar war im Zentrum der CCD18Co-gemischten HCT8-Kulturen eine Sphäroidbildung zu sehen, doch zeigte die IHC-Färbung, dass es sich hier größtenteils um CCD18Co handelte (vgl. mit Abb. 4.8 B). Im Vergleich zu HCT8 war bei der CRC-Zelllinie DLD1 keinerlei Einfluss von MSC oder CCD18Co auf die Sphäroidbildung zu erkennen (Abb. 4.8 A).

Um die Verteilung der Stromazellen in den Sphäroiden genauer zu untersuchen, wurden 3D-Kulturen aus CRC-Zellen gemischt mit GFP-MSK immunhistochemisch hinsichtlich GFP analysiert (Abb. 4.8 B). Es wurden Unterschiede in der GFP-Verteilung zwischen MSC-gemischten Sphäroiden von HCT8 und DLD1 beobachtet. In der Linie DLD1 zeigte sich ein klar abgegrenzter, GFP-positiver, zentraler Kern. In HCT8 hingegen wurde eine gleichmäßigere Verteilung von MSC im gesamten Sphäroidschnitt beobachtet. In 3D-Kulturen aus CRC-Zellen gemischt mit GFP-CCD18Co zeigten beide Zelllinien stark abgegrenzte, GFP-positive Areale im Zentrum. Im Fall der Linie DLD1 sammelten sich CCD18Co ähnlich wie MSC in einem inneren, separaten Kern an. Bei der Linie HCT8 waren die Verhältnisse ähnlich. Problematisch bei der Darstellung war, dass durch den Einbettvorgang die lockeren Randbereiche des Aggregats (vgl. CCD18Co-gemischte HCT8 in Abb. 4.8 A und B) verloren gingen und nur der innere, stabilere Bereich für die Analyse zur Verfügung stand. In diesem konnte jedoch ebenfalls deutlich gezeigt werden, dass der Großteil dieses zentralen Areals aus GFP-positiven CCD18Co bestand.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass MSC spezifisch die Sphäroidbildung *in per se* zur Sphäroidbildung unfähigen CRC-Zellen vermittelten. Da sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt werden konnte, dass MSC gegenüber CCD18Co einen spezifischen Einfluss auf CRC-Zellen ausübten, wurde im Weiteren auf CCD18Co als Kontroll-Stromakomponente verzichtet.

4.3.3 Das frühe nekrotische Absterben Sphäroid-integrierter MSC bestätigt deren frühen Einfluss auf CRC-Zellen

In weiteren Untersuchungen sollte der Einfluss von MSC auf die Kinetik des 3D-Wachstums von CRC-Zellen untersucht werden. Über lichtmikroskopische Aufnahmen sowie die Bestimmung von Länge und Breite über die Software AxioVision 3.1 (Zeiss) wurden die Volumina von 3D-Kulturen aus CRC-Zellen gemischt mit MSC vergleichend gegenüber ungemischten CRC-Zellen über einen Zeitraum von 96 h entsprechend der Formel für Xenograft (3.15.1) berechnet. Für die Linie HCT8 konnte aufgrund des Unterschieds zwischen lockerem Aggregat (ungemischte Zellen, sehr große Fläche) und festem Sphäroid (gemischt mit MSC, vergleichbar kleine Fläche) keine Aussage über eine MSC-vermittelte Förderung des Sphäroidvolumens getroffen werden. Für die Linie DLD1 konnte gezeigt werden, dass MSC keinen Einfluss auf das Volumen der 3D-Kulturen genommen haben (Anhang Abb. A8, S. 105). Auf Analysen der 3D-Kulturen mittels APh-Assay wurde verzichtet. Aus den in 4.3.1 gezeigten Resultaten konnte geschlussfolgert werden, dass die OD-Werte lockerer Aggregate keinen Vergleich zu denen der Sphäroide zuließen. Auch mittels Western-Blot konnte keine Aktivierung (Phosphorylierung) proliferationsrelevanter Signalwege (FAK, Akt) in MSC-gemischten 3D-Kulturen im Vergleich zu den ungemischten 3D-Kulturen nachgewiesen werden (Anhang Abb. A5, S. 104). Dies sprach insgesamt dafür, dass MSC auch im 3D-Kulturmodell keinen Einfluss auf die Proliferation von CRC-Zellen ausübten.

Um dennoch Einblicke in die Kinetik der MSC-vermittelten Sphäroidbildung von CRC-Zellen zu bekommen, wurden HE- und IHC-Analysen von *GFP*-MSC-gemischten und ungemischten 3D-Kulturen bis zu einem Zeitpunkt von 5 d nach dem Setzen durchgeführt (Abb. 4.9 A und B).

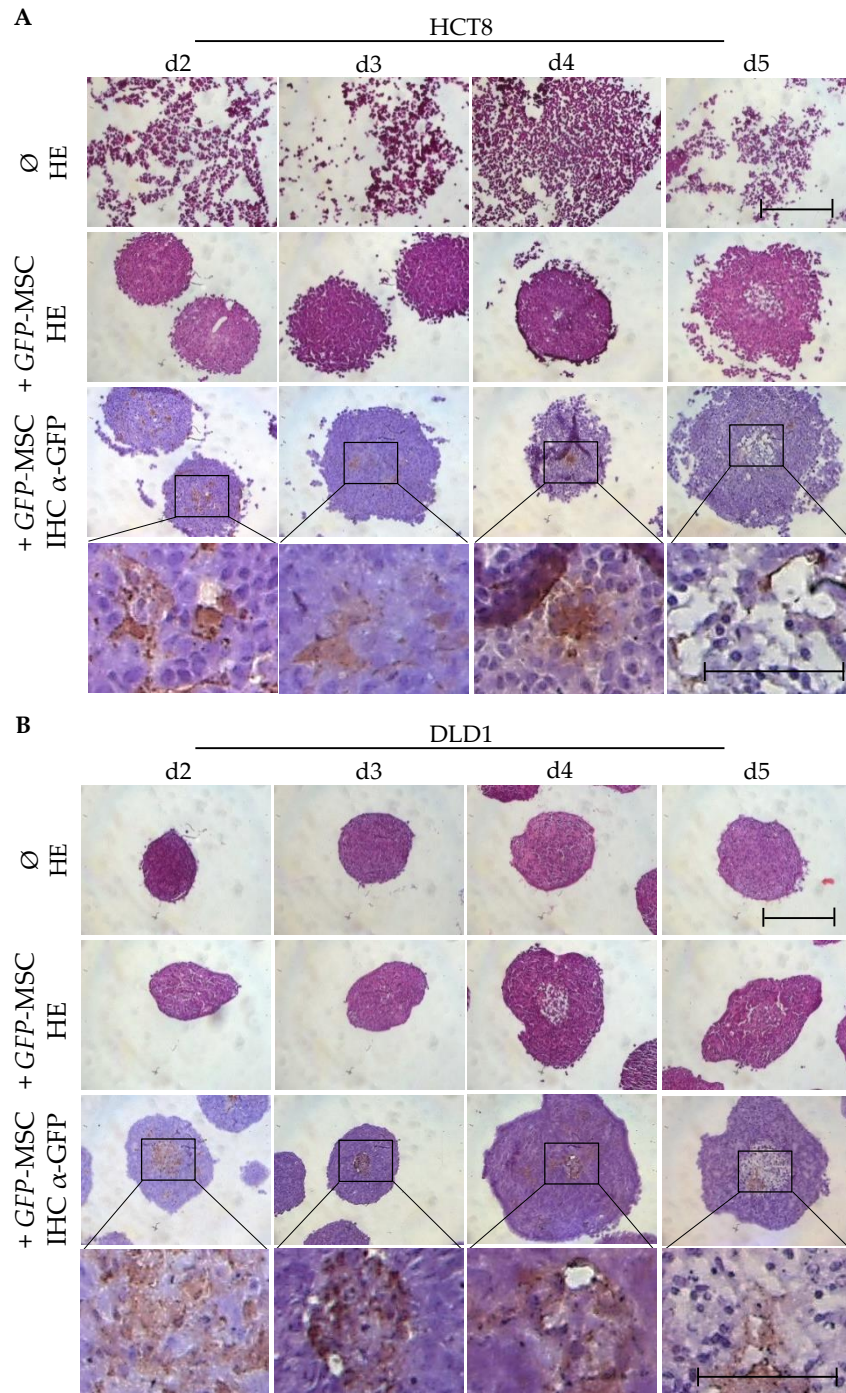


Abb. 4.9: Histologische Untersuchungen der 3D-Kulturen von CRC-Zellen. HE-Färbungen sowie immunhistochemischer Nachweis von GFP (IHC α -GFP) in 3D-Kulturen *GFP*-MSC-gemischter Zellen vergleichend gegenüber HE-Färbungen ungemischter Zellen (\emptyset) der CRC-Zelllinien HCT8 (A) und DLD1 (B) an Tag 2 bis 5 nach dem Setzen. Balken – 250 μ m; Balken in vergrößertem Bildausschnitt – 50 μ m.

In Abb. 4.9 A ist zu sehen, dass in *GFP*-MSC-gemischten HCT8-Kulturen an d 5 eine zentrale Apoptose/Nekrose entstand. Dies zeigte sich anhand einer deutlich helleren Färbung mittels

HE im Schnitt. In Sphäroiden von DLD1 gemischt mit GFP-MSK entwickelte sich im Vergleich zu den ungemischten Kontrollen zu früheren Zeitpunkten (d 4) eine zentrale Apoptose/Nekrose (Abb. 4.9 B). Die immunhistochemische Färbung gegen GFP lässt in beiden Zelllinien vermuten, dass vor allem die zentral ansässigen MSC der Apoptose/Nekrose unterlagen: An d 5 war deutlich weniger GFP in intakten Zellen nachweisbar als zu früheren Zeitpunkten (Abb. 4.9 A und B).

Es ist festzuhalten, dass Sphäroide bis 4 d nach dem Setzen intakt vorlagen. Der Verlust von GFP im Laufe der Kultivierung deutet darauf hin, dass die Sphäroid-integrierten MSC bereits an d 5 der Kultivierung zugrunde gegangen sind. Der Einfluss von MSC zu späteren Zeitpunkten ist daher nicht erfassbar. Zusammen mit der Beobachtung, dass bereits 24 h nach Kokultivierung die MSC-vermittelte Sphäroidbildung in HCT8 abgeschlossen war, wurde ein früher Einfluss von MSC auf CRC-Zellen angenommen.

4.3.4 ECM vermittelt die Sphäroidbildung in per se zur Sphäroidbildung unfähigen CRC-Zellen

Es wurde vermutet, dass Interaktionspartner existierten, die für die MSC-vermittelte Sphäroidbildung von HCT8-Zellen relevant waren. Zur Identifizierung dieser Interaktionspartner wurde zunächst geprüft, ob eine Neusynthese von Proteinen erforderlich war. Cycloheximid hemmt die Proteinbiosynthese durch die Inhibierung der Peptidyl-Transferase. Dies wurde auch in Tumorzellen beschrieben (Alonso und Citoler 1971). Findet trotz Einsatz von Cycloheximid die MSC-vermittelte Sphäroidbildung von HCT8-Zellen statt, sollte keine Neusynthese von Proteinen notwendig sein.

Die Sphäroidbildung MSC-gemischter 3D-Kulturen der Linie HCT8 wurde in Abhängigkeit von Cycloheximid begutachtet (Abb. 4.10). Eine Titration ergab als optimale Konzentration 10 µg/mL Cycloheximid (Daten nicht gezeigt). Durch die Kultivierung mit Cycloheximid wurde die MSC-vermittelte Sphäroidbildung von HCT8 nahezu vollständig aufgehoben. Das Wachstum ungemischter 3D-Kulturen zeigte hingegen keine Abhängigkeit von Cycloheximid (Abb. 4.10).

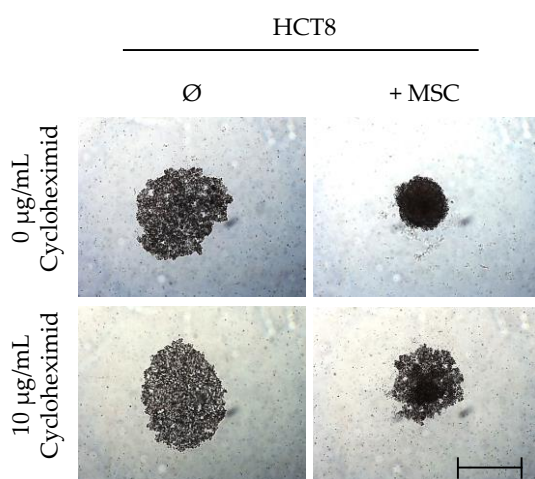


Abb. 4.10: Einfluss von Cycloheximid auf die MSC-vermittelte Sphäroidbildung von HCT8-Zellen *in vitro*. Analyse der Sphäroidbildung in 3D-Kulturen MSC-gemischter (+MSC) und ungemischter Zellen (Ø) der CRC-Zelllinie HCT8 in Abhängigkeit der Präsenz von Cycloheximid, Balken – 500 µm.

Da die MSC-vermittelte Sphäroidbildung der Linie HCT8 durch Cycloheximid vollständig aufgehoben war, wurde vermutet, dass eine Neusynthese von Proteinen relevant war. Da der Zusammenhalt eines Sphäroids auf Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionen zurückzuführen ist, wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Neusynthese MSC-sezernierter Faktoren, insbesondere ECM, bei der MSC-vermittelten Sphäroidbildung von HCT8 eine Funktion hatte. Zur Untersuchung dieser Annahme, wurden HCT8-Zellen zunächst in MSC-cM kultiviert (Abb. 4.11). Hier zeigte sich eine zur Kontrolle veränderte Architektur der 3D-Kultur. Zwar wurde die Sphäroidstruktur verglichen zu MSC-gemischten HCT8-Zellen nicht erreicht, doch zeigte sich ein deutlicher Einfluss von MSC-cM auf die 3D-Anordnung des Zellverbands. Es wurde in Betracht gezogen, dass MSC-sezernierte ECM für diese erhöhte Aggregation relevant war. Um die Relevanz von ECM bei der Sphäroidbildung zu prüfen, wurden HCT8-Zellen in BD Matrigel™, einer nicht standardisierten Basalmembran aus Engelbreth-Holm-Swarm Sarkom, kultiviert (Abb. 4.11). Durch die Kultivierung in 1,7 % Matrigel wurde eine Sphäroidbildung induziert, die der durch MSC entsprach. Weiterhin wurde vermutet, dass für die Sphäroidbildung von HCT8 ein spezifisches ECM-Molekül ausschlaggebend war. Um das Spektrum an ECM-Molekülen einzugrenzen, wurden die Hauptinhaltsstoffe des BD Matrigel™ (Kollagen IV, Laminin, Fibronectin und Kollagen I) einzeln auf ihre Sphäroidfördernden Eigenschaften getestet (Abb. 4.11). In Vorversuchen wurde für jedes ECM-Einzelmolekül eine optimale Konzentration von 10 µg/mL ermittelt (Daten nicht gezeigt). Kollagen IV und Fibronectin zeigten keinerlei Einfluss auf die Sphäroidbildung von HCT8. Durch die Kultivierung mit Laminin wurde eine erhöhte Aggregation der Zellen induziert. Die Kultivierung mit Kollagen I hingegen vermittelte eine Sphäroidbildung von HCT8, die mit der durch MSC und Matrigel vergleichbar war.

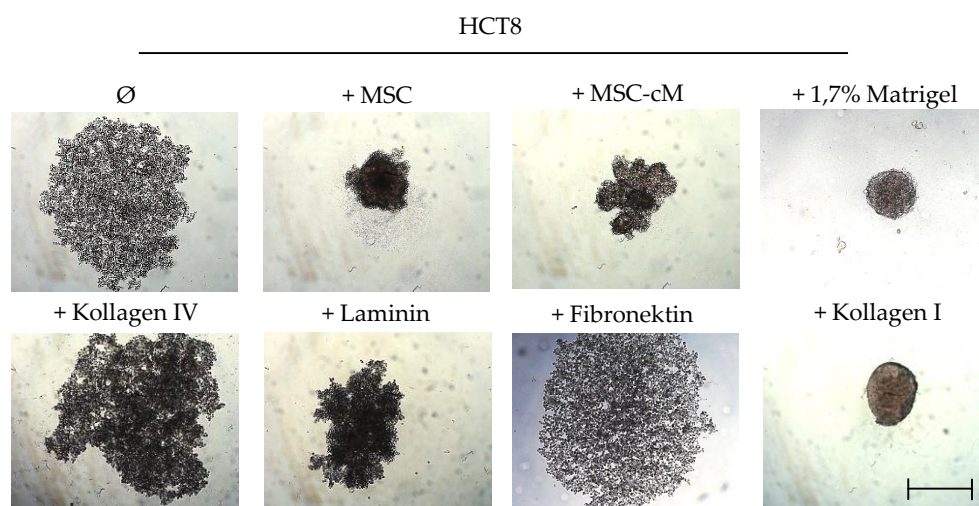


Abb. 4.11: Einfluss verschiedener Zellkulturzusätze auf die Sphäroidbildung von HCT8-Zellen *in vitro*. Analyse der Ausbildung von Sphäroiden in 3D-Kulturen der CRC-Zelllinie HCT8 durch direkte Kultivierung mit MSC oder MSC-cM bzw. durch nachträgliche Zugabe der angegebenen Substanzen 24 h nach dem Setzen. Matrigel in einer Konzentration von 1,7 %, alle Weiteren mit 10 µg/mL, Balken – 500 µm.

Mittels AZAN-Färbung nach Heidenhain wurde abschließend geprüft, ob ECM in den MSC-gemischten 3D-Kulturen der CRC-Zelllinie HCT8 nachweisbar ist. Die mikroskopischen Aufnahmen der Färbung sind in Abb. 4.12 dargestellt. Hierbei ist zu sehen, dass MSC-gemischte 3D-Kulturen der Linie HCT8 kollagene bzw. retikuläre Fasern (blau) aufwiesen. In ungemischten 3D-Kulturen konnte kein extrazelluläres Bindegewebe nachgewiesen werden. Die Größenunterschiede zwischen den Zellen ungemischter und MSC-gemischter 3D-Kulturen sind trotz Aufnahme bei gleicher Vergrößerung vermutlich durch die unterschiedliche Morphologie von locker angeordneten Zellen innerhalb eines Aggregats gegenüber stärker komprimierten Zellen innerhalb eines festen Sphäroids bedingt.

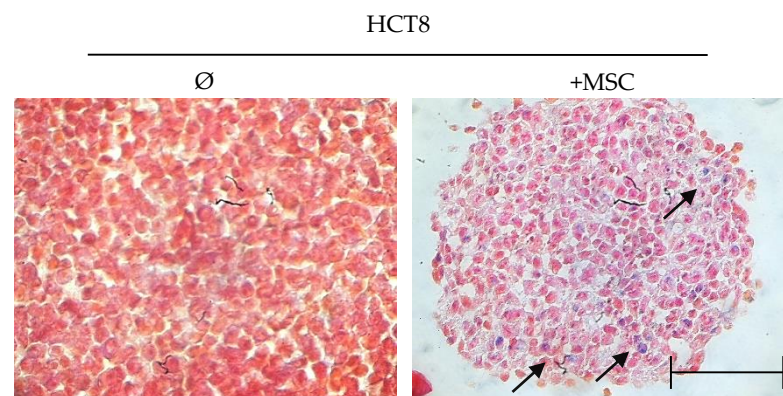


Abb. 4.12: AZAN-Färbung zum Nachweis kollagener und retikulärer Fasern. Mittels AZAN-Färbung nachgewiesene kollagene Fasern (blau, gekennzeichnet durch Pfeile) in 3D-Kulturen MSC-gemischter (+MSC) und ungemischter Zellen (Ø) der CRC-Zelllinie HCT8, Balken – 100 µm.

Insgesamt deuten die Daten darauf hin, dass MSC-sezernierte Faktoren einen Einfluss auf die Struktur der 3D-Kultur von HCT8-Zellen hatten, und dass ECM, im Speziellen Kollagen I, an der Vermittlung der Sphäroidbildung beteiligt war.

4.3.5 MSC-sezerniertes Kollagen I vermittelt die Sphäroidbildung in per se zur Sphäroidbildung unfähigen CRC-Zellen

Zur Verifizierung der Vermutung, dass MSC-sezerniertes Kollagen I bei der MSC-vermittelten Sphäroidbildung in HCT8 relevant war, wurde mittels lentiviraler shRNA-Partikel (Tab. 2.6) ein kd von *Kollagen I α 1* in MSC eingefügt (*Kol I α 1*). Problematisch war, dass MSC mit einem kd von *Kol I α 1* eine gestörte Proliferation aufwiesen. Aufgrund dessen konnten die Versuche ausschließlich mit MSC eines Spenders und ohne Kontrolle wichtiger Konsensus-Kriterien durchgeführt werden. Die Effizienz des kd wurde mittels qPCR nachgewiesen (Abb. 4.13 A). Es ist zu sehen, dass die Expression von *Kol I α 1* in kd MSC im Vergleich zu WT- und mock-MSC gesunken war. Die MSC-vermittelte Sphäroidbildung von HCT8-Zellen nach kd von *Kol I α 1* in MSC ist Abb. 4.13 B zu entnehmen. Hier wird deutlich, dass *Kol α 1* kd MSC im Gegensatz zu WT- und mock-MSC nicht mehr fähig waren, die Sphäroidbildung der Zelllinie HCT8 zu vermitteln.

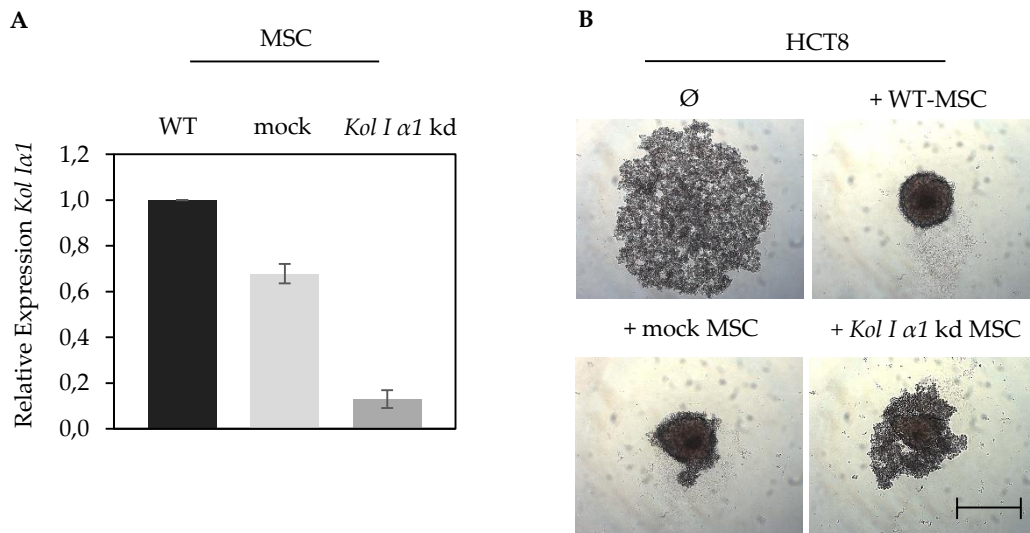


Abb. 4.13: MSC-vermittelte Sphäroidbildung von HCT8-Zellen in Abhängigkeit von MSC-exprimiertem *Kol I α1*. (A) Mittels qPCR ermittelte relative Expression von *Kol I α1* in *Kol I α1* kd MSC vergleichend gegenüber WT- und mock-MSC. (B) *In vitro*-3D-Kulturen *Kol I α1* kd MSC-gemischter, ungemischter (∅) sowie WT- und mock-MSC-gemischter Zellen der CRC-Zelllinie HCT8, Balken – 500 µm.

Die Daten deuten darauf hin, dass MSC-sezerniertes Kollagen I an der MSC-vermittelten Sphäroidbildung von HCT8 beteiligt war. Aufgrund mangelnder Proliferation der *Kol I α1* kd MSC konnte keine Abhängigkeit der MSC-vermittelten Wachstumsförderung von MSC-exprimiertem *Kol I α1* *in vivo* nachgewiesen werden. Es wurde vermutet, dass Kollagen I als *linker* zwischen spezifischen Rezeptoren von MSC und CRC agierte. Diese sollten im Folgenden identifiziert werden.

4.3.6 MSC vermitteln die Sphäroidbildung spezifisch in E-Cadherin-dysfunktionalen CRC-Zellen

Zu den Mediatoren der Zelladhäsion innerhalb fester Sphäroide gehören z. B. E-Cadherin und β 1-Integrin (Ivascu und Kubbies 2007). Es ist beschrieben, dass die CRC-Zelllinie HCT8 über ein mutiertes α -Catenin verfügt, wodurch sich ein dysfunktionales E-Cadherin-System ergibt (Vermeulen *et al.* 1995). Mittels Western-Blot wurde die Expression von E-Cadherin, β 1-Integrin und α -Catenin der CRC-Zelllinien HCT8 und DLD1 in MSC-gemischten und ungemischten 3D-Kulturen untersucht (Abb. 4.14). In beiden Linien konnte die Expression von E-Cadherin und β 1-Integrin nachgewiesen werden. Wie in der Literatur beschrieben, fehlte die Expression von α -Catenin in der Linie HCT8. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Menge an C-terminalem Fragment (CTF) von E-Cadherin durch die Kultivierung mit MSC in 3D-Kulturen beider CRC-Zelllinien gesunken ist.

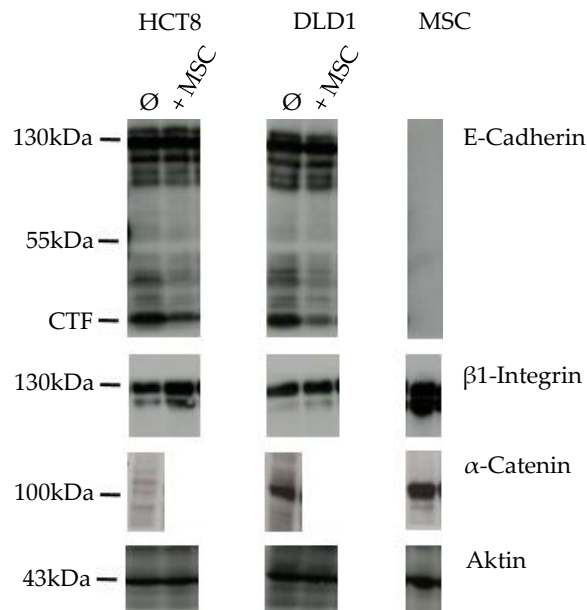


Abb. 4.14: Analyse relevanter Proteine für die Sphäroidbildung von CRC-Zellen. Western-Blot-Analyse von E-Cadherin (120 kDa), β 1-Integrin (aktive Form 130 kDa) und α -Catenin (102 kDa) in 3D-Kulturen MSC-gemischter (+MSC) und ungemischter Zellen (\emptyset) der CRC-Zelllinien HCT8 und DLD1 sowie MSC als Kontrolle. Aktin (42 kDa) als Ladekontrolle, kDa – Kilodalton; CTF – C-terminales Fragment (38 kDa).

Die CRC-Zelllinie HCT8 wies ein dysfunktionales E-Cadherin-System auf und war per se nicht in der Lage, Sphäroide auszubilden. MSC konnten diese Dysfunktion kompensieren und die Sphäroidbildung vermitteln. Es wurde die Hypothese formuliert, dass es sich bei der MSC-vermittelten Sphäroidbildung um einen generellen Mechanismus in E-Cadherin-dysfunktionalen CRC-Zelllinien handelte. Zur Untersuchung dieser Annahme wurden weitere CRC-Zelllinien hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Sphäroidbildung in Abhängigkeit der Expression von E-Cadherin und α -Catenin untersucht (Abb. 4.15 A und B). Es wurde beobachtet, dass die Zelllinien HT29 und T84, die sowohl über E-Cadherin als auch α -Catenin verfügten, per se Sphäroide ausbildeten. MSC hatten in diesen Zellen keinen Einfluss auf die Sphäroidbildung. Im Gegensatz dazu waren die Linien HCT116 und Colo320DM per se nicht zur Sphäroidbildung in der Lage. Beide Linien zeigten im Western-Blot eine fehlende Expression von E-Cadherin. Analog zu HCT8 wurde bei diesen Zelllinien die Sphäroidbildung durch MSC vermittelt.

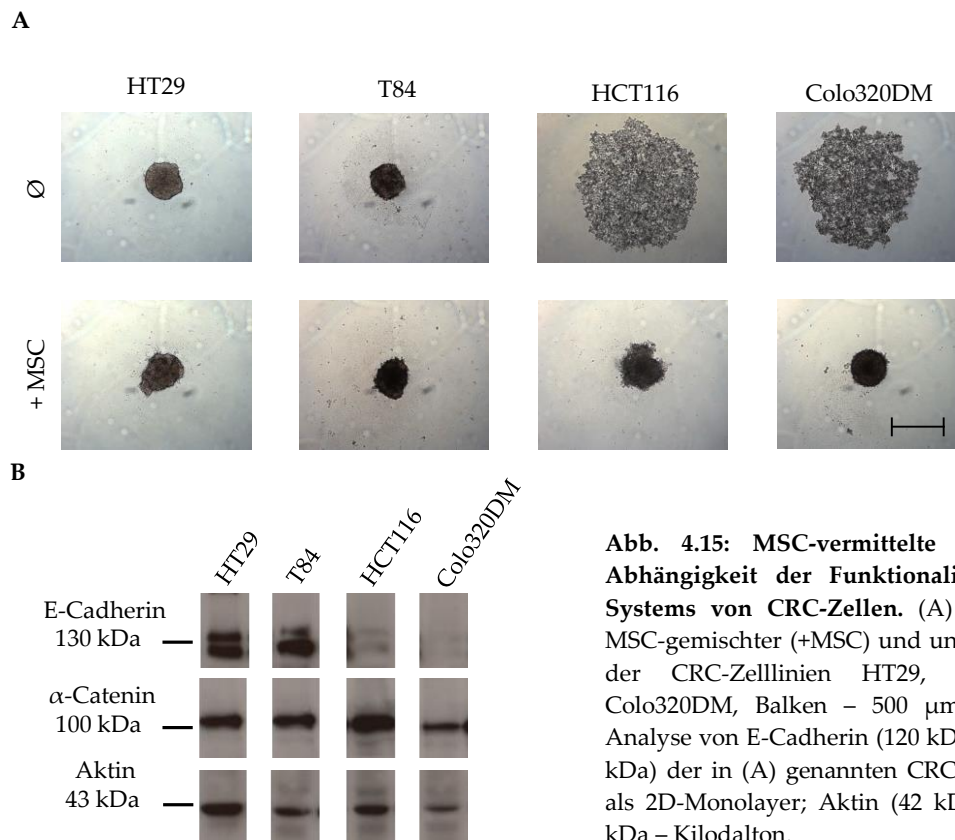


Abb. 4.15: MSC-vermittelte Sphäroidbildung in Abhängigkeit der Funktionalität des E-Cadherin-Systems von CRC-Zellen. (A) *In vitro*-3D-Kulturen MSC-gemischter (+MSC) und ungemischter Zellen (Ø) der CRC-Zelllinien HT29, T84, HCT116 und Colo320DM, Balken – 500 μ m. (B) Western-Blot-Analyse von E-Cadherin (120 kDa) und α -Catenin (102 kDa) der in (A) genannten CRC-Zelllinien gewachsen als 2D-Monolayer; Aktin (42 kDa) als Ladekontrolle, kDa – Kilodalton.

Um in einem zweiten Schritt die Relevanz des E-Cadherin-Systems bei der MSC-vermittelten Sphäroidbildung von CRC-Zellen zu prüfen, wurde die E-Cadherin-funktionelle Zelllinie DLD1 mit einem blockierenden Antikörper gegen E-Cadherin (HECD-1, Tab. 2.2) kultiviert und hinsichtlich der MSC-vermittelten Sphäroidbildung untersucht (Abb. 4.16). In Vorversuchen wurde eine optimale Konzentration des Antikörpers von 10 μ g/mL etabliert (Daten nicht gezeigt).

In der Linie DLD1 konnte mittels blockierendem Antikörper gegen E-Cadherin ein HCT8-ähnlicher Zustand erzeugt werden. Ungemischte DLD1-Zellen waren im 3D-Kulturmodell nicht länger in der Lage, Sphäroide auszubilden. MSC konnten diesen Zustand überwinden: Es war eine MSC-vermittelte Sphäroidbildung von E-Cadherin-blockierten DLD1-Zellen (im Folgenden ebenfalls als E-Cadherin-dysfunktional bezeichnet) zu beobachten (Abb. 4.16).

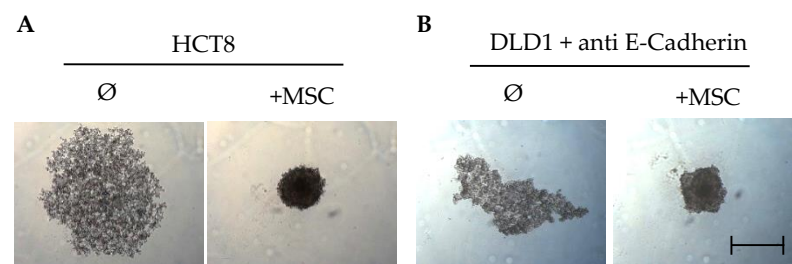


Abb. 4.16: MSC-vermittelte Sphäroidbildung E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen *in vitro*. 3D-Kulturen MSC-gemischter (+MSC) und ungemischter Zellen (Ø) der CRC-Zelllinien HCT8 (A) und DLD1 unter Zusatz eines blockierenden Antikörpers gegen E-Cadherin (anti E-Cadherin) (B). Balken – 500 μ m.

Zusammenfassend ist hervorzuheben, dass MSC die E-Cadherin-Dysfunktionalität in CRC-Zellen überwinden konnten und die Ausbildung von Sphäroiden in diesen Zellen vermitteln. Es wurde vermutet, dass die relevanten Interaktionspartner auch für die Wachstumsförderung *in vivo* verantwortlich waren. Für die weiteren Versuche wurden die zu untersuchenden Zelllinien um die ebenfalls E-Cadherin-dysfunktionale Linie Colo320DM erweitert.

4.4 Der Einfluss von β 1-Integrin auf die MSC-vermittelte Sphäroidbildung E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen *in vitro*

4.4.1 Die Blockade von β 1-Integrin, nicht aber VCAM-1, hebt die MSC-vermittelte Sphäroidbildung E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen auf

Im Folgenden sollten die Interaktionspartner zwischen MSC und per se nicht zur Sphäroidbildung fähiger CRC-Zellen identifiziert werden. Da Kollagen I bei der MSC-vermittelten Sphäroidbildung E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen eine Rolle einzunehmen schien, wurde vermutet, dass Rezeptoren der Zell-Matrix-Adhäsion im untersuchten Modell relevant waren. Eine entscheidende Rolle in der Zell-Matrix-Adhäsion spielen Integrine, im Speziellen β 1-Integrin, da es die meisten Kollagen I Rezeptoren der Integrinfamilie abdeckt. Um die Funktion von β 1-Integrin bei der MSC-vermittelten Sphäroidbildung E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen zu testen, kam ein blockierender Antikörper gegen β 1-Integrin (vgl. Tab. 2.2) zum Einsatz (Abb. 4.17). Die Titration des Antikörpers ergab eine optimale Konzentration von 10 μ g/mL (Daten nicht gezeigt).

Die Blockade von β 1-Integrin hatte keinen Einfluss auf das Verhalten ungemischter 3D-Kulturen von HCT8 und Colo320DM. Jedoch war die MSC-vermittelte Sphäroidbildung in beiden Linien nach Antikörper-vermittelter Blockade von β 1-Integrin völlig aufgehoben. In der Linie DLD1 verursachte die Blockade von E-Cadherin und β 1-Integrin zunächst, dass ungemischte DLD1-Zellen keine Sphäroide mehr ausbildeten. Auch hier konnte trotz Präsenz von MSC keine Sphäroidbildung mehr vermittelt werden (Abb. 4.17).

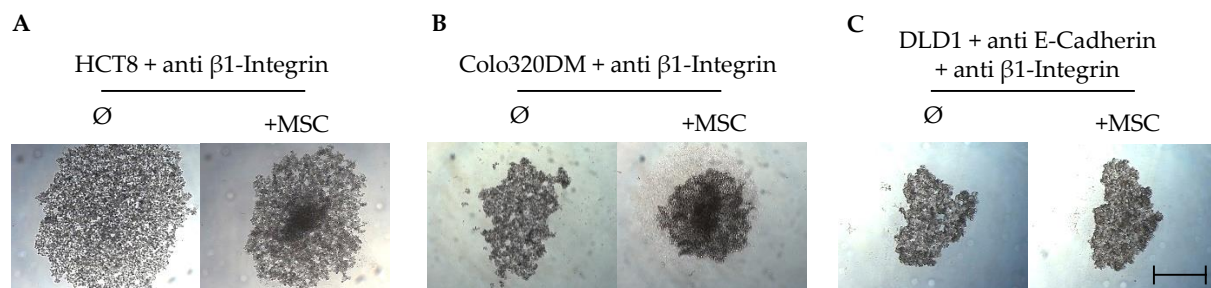


Abb. 4.17: Einfluss von β 1-Integrin auf die MSC-vermittelte Sphäroidbildung E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen *in vitro*. 3D-Kulturen MSC-gemischter (+MSC) und ungemischter Zellen (\emptyset) der CRC-Zelllinien HCT8 (A), Colo320DM (B) sowie DLD1 unter Zusatz eines blockierenden Antikörpers gegen E-Cadherin (C) jeweils in Abhängigkeit der Präsenz eines blockierendes Antikörpers gegen β 1-Integrin (anti β 1-Integrin), Balken – 500 μ m.

Unabhängig von ECM können Integrine auch direkte Zell-Zell-Kontakte ausführen. Für $\beta 1$ -Integrin ist ein direkter Kontakt zu VCAM-1 beschrieben (Taichman *et al.* 1991). Zunächst wurde geprüft, ob VCAM-1 Einfluss auf die MSC-vermittelte Sphäroidbildung hat. Auch für diese Analyse kam ein blockierender Antikörper zum Einsatz (vgl. Tab. 2.2). Da vermutet wurde, dass es sich um einen generellen Mechanismus im CRC-Modell handelte, wurden die Analysen auf die CRC-Zelllinie HCT8 beschränkt. Es ist zu erkennen, dass die MSC-vermittelte Sphäroidbildung von HCT8-Zellen durch die gewählten Konzentrationen an blockierendem Antikörper gegen VCAM-1 nicht aufgehoben wurde (Abb. 4.18).

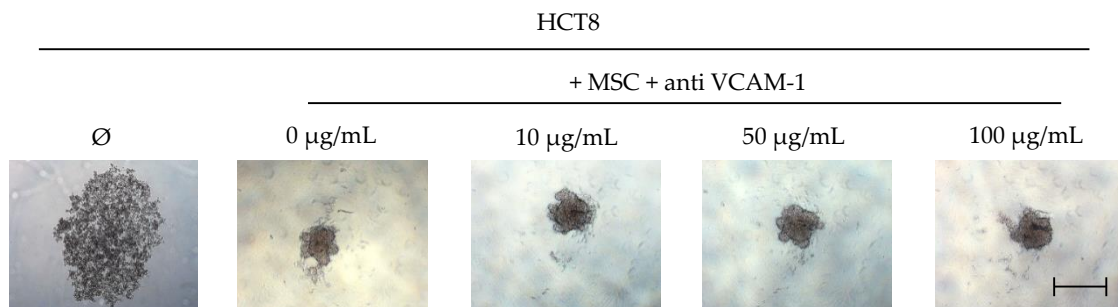


Abb. 4.18: Einfluss von VCAM-1 auf die MSC-vermittelte Sphäroidbildung der CRC-Zelllinie HCT8 *in vitro*. 3D-Kulturen MSC-gemischter (+MSC) und ungemischter Zellen (Ø) der CRC-Zelllinie HCT8 in Abhängigkeit der Präsenz verschiedener Konzentrationen eines blockierenden Antikörpers gegen VCAM-1 (anti VCAM-1). Balken – 500 μm .

Die Daten deuten darauf hin, dass die MSC-vermittelte Sphäroidbildung in E-Cadherin-dysfunktionalen CRC über $\beta 1$ -Integrin verlief. Eine direkte Interaktion von $\beta 1$ -Integrin und VCAM-1 wurde ausgeschlossen.

4.4.2 Die MSC-vermittelte Sphäroidbildung E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen bedingt MSC-exprimiertes $\beta 1$ -Integrin

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass sowohl MSC als auch die untersuchten CRC-Zellen über die Expression von $\beta 1$ -Integrin verfügten (Abb. 4.19 und 4.21). Zunächst sollte untersucht werden, welche Relevanz MSC-exprimiertes $\beta 1$ -Integrin bei der MSC-vermittelten Sphäroidbildung hat. Mittels lentiviraler shRNA-Partikel (Tab. 2.5) wurde ein kd von $\beta 1$ -Integrin in MSC eingeführt ($\beta 1$ -I kd MSC). Es wurden MSC zweier Spender (#1 und #2) transduziert. Die Effizienz des kd wurde mit qPCR und Western-Blot nachgewiesen (Abb. 4.19).

In MSC #1 konnte mittels qPCR ein fast vollständiger kd nachgewiesen werden (Expression relativ zu WT-MSC: 0,03; Abb. 4.19 A). Der kd in MSC #2 war entsprechend qPCR nicht effizient (Abb. 4.19 B), jedoch konnte in beiden $\beta 1$ -I kd MSC-Chargen mittels Western-Blot ein annähernd vollständiger kd des Proteins gegenüber WT- und mock-MSC beobachtet werden.

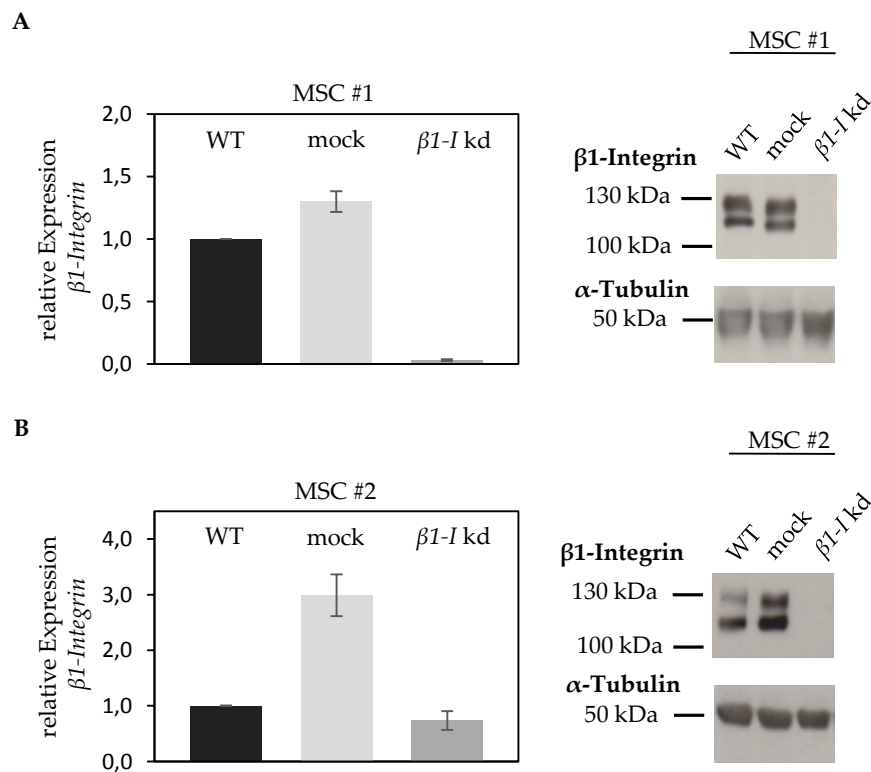


Abb. 4.19: Nachweis des knock-downs von $\beta 1$ -Integrin in MSC. Analyse von $\beta 1$ -Integrin mittels qPCR und Western-Blot (aktive Proteinform: 130 kDa) in $\beta 1$ -I kd MSC vergleichend gegenüber WT- und mock-MSC der MSC-Chargen #1 (A) und #2 (B).

Um zu gewährleisten, dass MSC auch nach Transduktion und Selektion mit Puromycin wichtige Konsensus-Kriterien aufweisen, wurden durchflusszytometrische Analysen bestimmter MSC-Oberflächenmarker (Anhang Abb. A9, S. 106) sowie Analysen hinsichtlich des Differenzierungspotentials durchgeführt (Anhang Abb. A10, S. 106). Die Ergebnisse beider Chargen waren nahezu identisch, sodass im Folgenden exemplarisch die Daten für MSC #1 dargestellt werden. Die Untersuchungen ergaben, dass $\beta 1$ -I kd-, WT- und mock-MSC negativ für CD45, positiv für die Marker CD105, CD73 und CD90 sowie zur osteogenen und adipogenen Differenzierung fähig waren, sodass zusammenfassend festzustellen war, dass $\beta 1$ -I kd MSC ausgewählte Konsensus-Kriterien für MSC erfüllten.

Anschließend wurde die MSC-vermittelte Sphäroidbildung E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen in Abhängigkeit von MSC-exprimiertem $\beta 1$ -Integrin analysiert. Da auch in diesem Fall die Resultate für beide MSC-Chargen vergleichbar waren, sind repräsentativ die Ergebnisse von MSC #1 dargestellt (Abb. 4.20). Es ist zu sehen, dass $\beta 1$ -I kd MSC im Vergleich zu WT- und mock-MSC nicht mehr in der Lage waren, die Sphäroidbildung in den ausgewählten E-Cadherin-dysfunktionalen CRC-Zelllinien – vor allem HCT8 und DLD1 – zu vermitteln. Die Linie Colo320DM zeigte mit $\beta 1$ -I kd MSC eine höhere Aggregation im Vergleich zu ungemischten Zellen, erreichte jedoch nicht das Ausmaß der Sphäroidbildung durch die Präsenz von WT- oder mock-MSC.

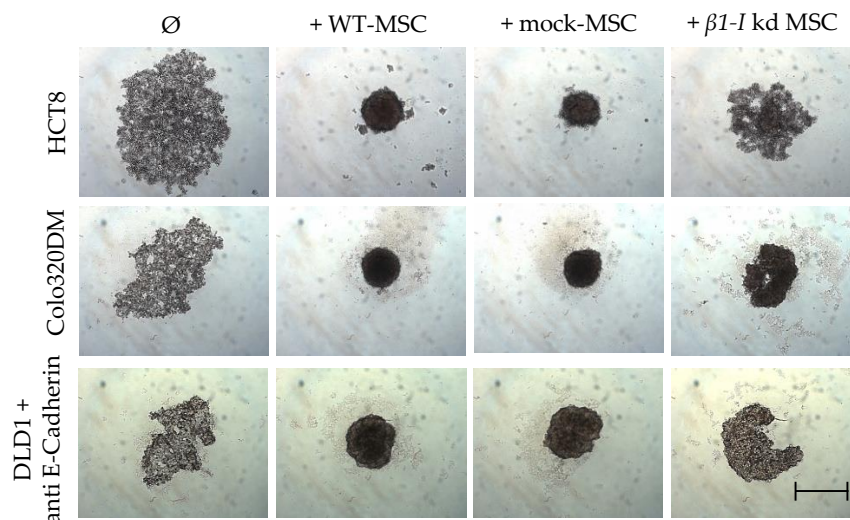


Abb. 4.20: MSC-vermittelte Sphäroidbildung E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen in Abhängigkeit von MSC-exprimiertem $\beta 1$ -Integrin *in vitro*. 3D-Kulturen $\beta 1$ -I kd MSC-gemischter, ungemischter (\emptyset) sowie WT- und mock-MSC-gemischter Zellen der CRC-Zelllinien HCT8, Colo320DM sowie DLD1 unter Zusatz eines blockierenden Antikörpers gegen E-Cadherin (anti E-Cadherin). Balken – 500 μm .

Zusammenfassend lassen die Daten den Schluss zu, dass MSC-exprimiertes $\beta 1$ -Integrin für die Interaktion zwischen MSC und E-Cadherin-dysfunktionalen CRC-Zellen *in vitro* relevant war.

4.4.3 Die MSC-vermittelte Sphäroidbildung E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen bedingt CRC-exprimiertes $\beta 1$ -Integrin

Da auch die untersuchten CRC-Zellen über $\beta 1$ -Integrin verfügten, sollte weiterhin dessen Relevanz bei der Interaktion mit MSC untersucht werden. Dazu wurde erneut mittels lentiviraler shRNA-Partikel (Tab. 2.5) ein kd von $\beta 1$ -Integrin in den CRC-Zellen eingeführt ($\beta 1$ -I kd CRC). Anhand von Analysen hinsichtlich wichtiger WT-Charakteristika wurden je CRC-Zelllinie zwei $\beta 1$ -I kd Klone ausgewählt und für alle weiteren Versuche eingesetzt. Da sich die Ergebnisse beider Klone nahezu glichen, wird im Folgenden das repräsentative Ergebnis eines $\beta 1$ -I kd Klons je CRC-Zelllinie vergleichend gegenüber WT- und mock-Zellen aufgeführt. Die Darstellung der Analysen hinsichtlich WT-Charakteristika sind Abb. A11 – A13 im Anhang zu entnehmen (S. 107 – 109). In 2D-Kulturen wurde für alle $\beta 1$ -I kd CRC-Zellen ein WT-ähnliches Wachstums- und Zytotoxizitätsverhalten nachgewiesen. Das Wachstum im Soft-Agar-Assay war leicht verändert. Der kd von $\beta 1$ -Integrin zeigte keinen Einfluss auf die Anzahl an Kolonien von HCT8 und DLD1, lediglich die Größe der Kolonien beider Linien war im Vergleich zu WT- und mock-Zellen leicht reduziert. Die Linie Colo320DM zeigte generell kein Wachstum im Soft-Agar-Assay. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass nach kd von $\beta 1$ -Integrin in CRC-Zellen wichtige WT-Charakteristika erhalten geblieben sind (Anhang Abb. A11 – A13).

Der Nachweis des kd von $\beta 1$ -Integrin in CRC-Zellen mittels qPCR und Western-Blot ist in Abb. 4.21 dargestellt. Für alle untersuchten CRC-Zelllinien war eine effiziente Herabregulation der $\beta 1$ -Integrin-Expression nach kd im Vergleich zu den WT- sowie mock-Zellen zu beobachten. Im Fall der HCT8 sank die Expression im $\beta 1$ -I kd Klon auf 0,1 relativ zum WT. In

der Linie Colo320DM auf 0,05. Der kd in der Linie DLD1 war mit einer $\beta 1$ -Integrin-Expression von 0,2 relativ zum WT ebenfalls effizient (Abb. 4.21 A). Im Western-Blot wurde der kd in allen drei CRC-Zelllinien bestätigt: Es war nahezu kein $\beta 1$ -Integrin zu detektieren. Die mittels qPCR nachgewiesenen Schwankungen der Expression in mock- im Vergleich zu WT-Zellen, insbesondere der Linie Colo320DM, zeigte sich im Western-Blot nicht, sodass davon ausgegangen wurde, dass diese in den geplanten Versuchen keine Bedeutung hatte (Abb. 4.21 B).

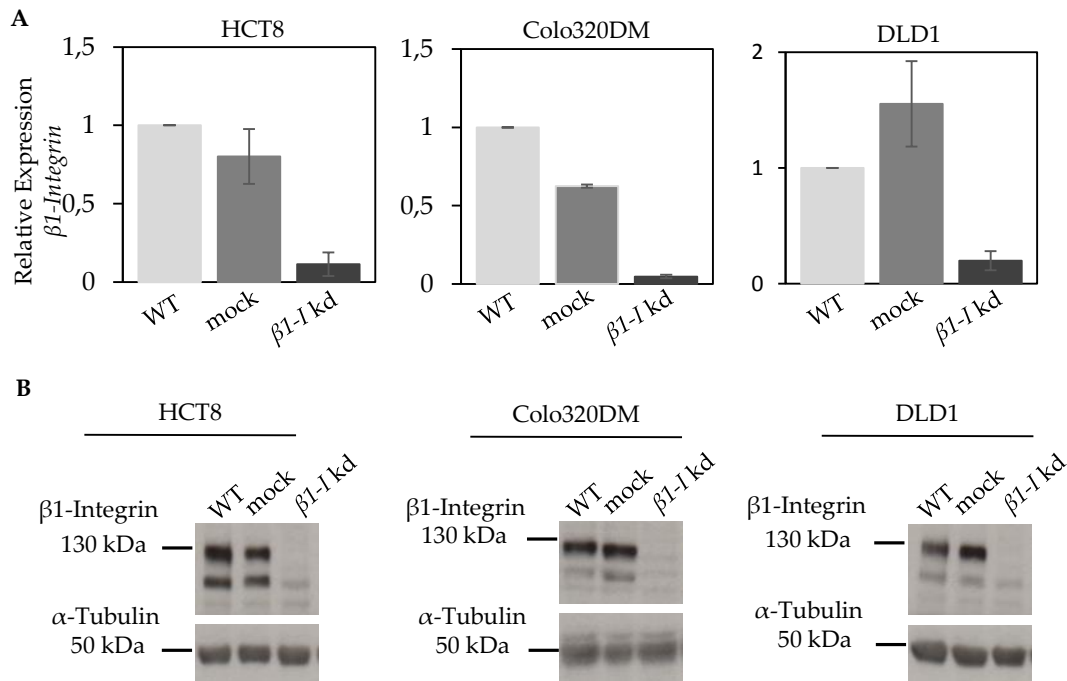


Abb. 4.21: **Nachweis des knock-downs von $\beta 1$ -Integrin in CRC-Zellen.** (A) Mittels qPCR ermittelte Expression von $\beta 1$ -Integrin in $\beta 1$ -I kd Zellen vergleichend gegenüber WT- und mock-Zellen der CRC-Zelllinien HCT8, Colo320DM und DLD1. (B) Western-Blot-Analyse von $\beta 1$ -Integrin (aktive Form: 130 kDa) in $\beta 1$ -I kd Zellen vergleichend gegenüber WT- und mock-Zellen der CRC-Zelllinien HCT8, Colo320DM und DLD1.

Die $\beta 1$ -I kd Klone der E-Cadherin-dysfunktionalen CRC-Zellen wurden anschließend im 3D-Kulturmodell hinsichtlich der MSC-vermittelten Sphäroidbildung untersucht (Abb. 4.22). In allen untersuchten CRC-Zelllinien war das Wachstum ungemischter 3D-Kulturen nach kd von $\beta 1$ -Integrin vergleichbar zu dem der WT- und mock-Zellen. Die MSC-vermittelte Sphäroidbildung war hingegen in $\beta 1$ -I kd Zellen aller analysierten CRC-Zelllinien im Vergleich zu WT- und mock-Zellen komplett aufgehoben.

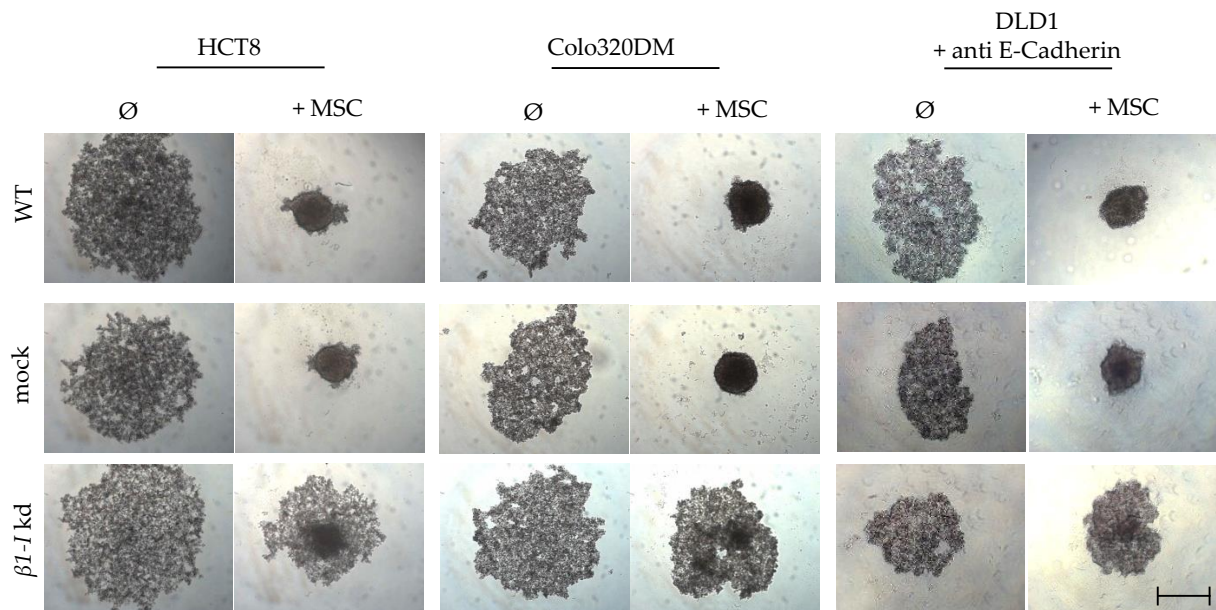


Abb. 4.22: MSC-vermittelte Sphäroidbildung E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen in Abhängigkeit von CRC-exprimiertem $\beta 1$ -Integrin *in vitro*. 3D-Kulturen MSC-gemischter (+MSC) und ungemischter (\emptyset) $\beta 1$ -I kd Zellen vergleichend gegenüber WT- und mock-Zellen der CRC-Zelllinien HCT8, Colo320DM sowie DLD1 mit Zusatz eines blockierenden Antikörpers gegen E-Cadherin (anti E-Cadherin). Balken – 500 μ m.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch $\beta 1$ -Integrin in E-Cadherin-dysfunktionalen CRC-Zellen für die MSC-vermittelte Sphäroidbildung der CRC-Zellen relevant war.

4.5 Der Einfluss von $\beta 1$ -Integrin auf die MSC-vermittelte Wachstumsförderung spezifischer E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen *in vivo*

4.5.1 MSC vermitteln die Wachstumsförderung *in vivo* auch in der weiteren E-Cadherin-dysfunktionalen CRC-Zelllinie Colo320DM

Es wurde gezeigt, dass MSC das Wachstum s.c. CRC-Xenografte *in vivo* förderten, wobei diese Förderung in der E-Cadherin-dysfunktionalen Zelllinie HCT8 stärker ausgeprägt war als in der E-Cadherin-funktionellen Linie DLD1 (siehe 4.1). Zudem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass MSC die Sphäroidbildung E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen über einen $\beta 1$ -Integrin-abhängigen Mechanismus vermittelten (siehe 4.4). Es wurde vermutet, dass die Wachstumsförderung *in vivo* ein, von der *in vitro* identifizierten Interaktion über $\beta 1$ -Integrin abhängiger, genereller Mechanismus für E-Cadherin-dysfunktionale CRC-Zellen war. Um zunächst die Allgemeingültigkeit der MSC-vermittelten Wachstumsförderung E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen zu prüfen, wurden die Gewichte MSC-gemischter Xenografte der weiteren E-Cadherin-dysfunktionalen CRC-Zelllinie Colo320DM vergleichend gegenüber ungemischten Xenograften untersucht (Abb. 4.23).

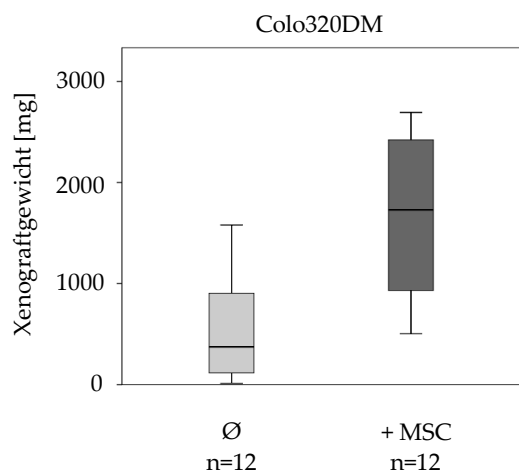


Abb. 4.23: MSC-vermittelte Wachstumsförderung s.c. Xenografte der E-Cadherin-dysfunktionalen CRC-Zelllinie Colo320DM im Nacktmausmodell. Boxplotdarstellung der Gewichte MSC-gemischter (+MSC) und ungemischter (Ø) Xenografte der CRC-Zelllinie Colo320DM 25 d nach s.c. Injektion.

Es ist zu sehen, dass MSC einen deutlich fördernden Einfluss auf das Xenograftwachstum der Linie Colo320DM genommen haben. Die Gewichte MSC-gemischter Xenografte stiegen um das 3-Fache der ungemischten Xenografte an.

Die erhobenen Daten bestätigten einen prominenten Einfluss von MSC auf das Wachstum E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen.

4.5.2 CRC-exprimiertes $\beta 1$ -Integrin ist relevant für die MSC-vermittelte Wachstumsförderung α -Catenin-defizienter CRC-Zellen *in vivo*

Des Weiteren sollte die Frage geklärt werden, ob die *in vitro* identifizierte Interaktion zwischen MSC und CRC-Zellen über $\beta 1$ -Integrin zur Wachstumsförderung *in vivo* führte, und ob dies ein genereller Mechanismus des CRC war. Dazu wurden die Gewichte s.c. Xenografte von $\beta 1$ -I kd CRC-Zellen in Präsenz von MSC vergleichend gegenüber WT- und mock-CRC-Zellen analysiert. Die Ergebnisse sind als MW mit Stabw in Tab. 4.5 dargestellt. Die Auftragung als Boxplot ist im Anhang der Abb. A14 zu entnehmen (S. 110).

Tab. 4.5: MW und Stabw s.c. CRC-Xenografte in Abhängigkeit von CRC-exprimiertem $\beta 1$ -Integrin (d 25 nach Injektion im Nacktmausmodell)

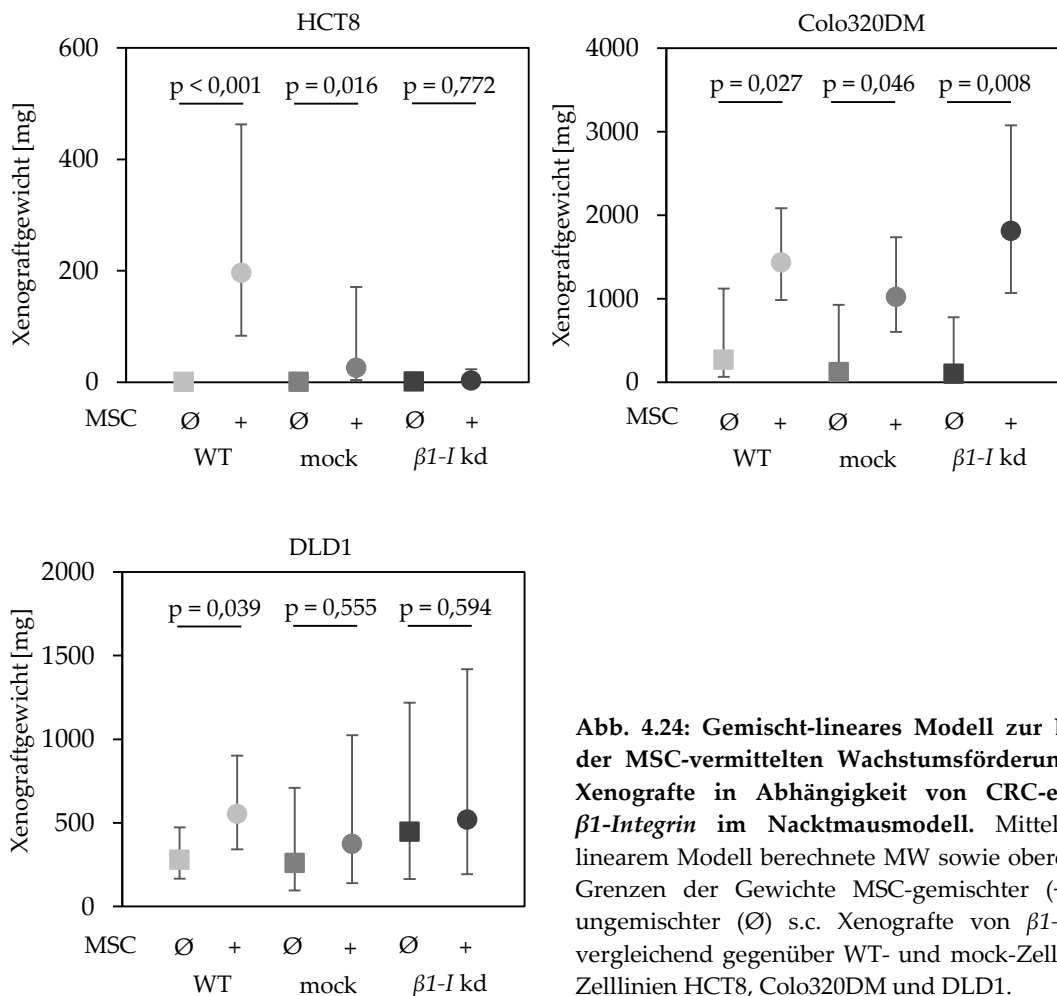
CRC-Zelllinie		WT-CRC		mock-CRC		$\beta 1$ -I kd CRC	
		Ø	+ MSC	Ø	+ MSC	Ø	+ MSC
HCT8	MW [mg]	16	279	44	95	22	21
	± Stabw [mg]	33	204	96	86	33	25
Colo320DM	MW [mg]	727	2012	482	1368	411	2028
	± Stabw [mg]	488	757	292	738	280	800
DLD1	MW [mg]	344	598	299	414	459	537
	± Stabw [mg]	210	257	124	191	95	135

In der Linie HCT8 zeigte sich eine MSC-vermittelte Wachstumsförderung von WT- und mock-Zellen. Die Gewichte MSC-gemischter WT-Xenografte stiegen auf das 17-Fache gegenüber ungemischten Xenograften. Die Gewichte von mock-Xenograften stiegen bei Präsenz von

MSC um das 2-Fache im Vergleich zu den ungemischten Xenograften. Nach kd von $\beta 1$ -Integrin war die MSC-vermittelte Wachstumsförderung von HCT8 komplett aufgehoben: Die Gewichte der MSC-gemischten Xenografte von $\beta 1$ -I kd HCT8 gingen nicht mehr über die der ungemischten Xenografte hinaus. Für die CRC-Zelllinie Colo320DM konnte eine MSC-vermittelte Wachstumsförderung sowohl von WT- und mock- als auch von $\beta 1$ -I kd Zellen nachgewiesen werden. Bei Präsenz von MSC stiegen die Gewichte der WT- bzw. mock-Colo320DM-Xenografte um den Faktor 3 bzw. 4 gegenüber dem der ungemischten Xenografte. In $\beta 1$ -I kd Colo320DM stiegen die Gewichte MSC-gemischter Xenografte sogar um das 5-Fache gegenüber ungemischten Xenograften an. In der Linie DLD1 wurde eine marginale MSC-vermittelte Wachstumsförderung in Xenograften von WT-, mock- sowie $\beta 1$ -I kd Zellen beobachtet (Tab. 4.5).

Aus diesen Rohdaten wurde entsprechend 3.18.1 ein gemischt-lineares Modell zur Bestimmung der MSC-vermittelten Wachstumsförderung von $\beta 1$ -I kd CRC-Xenograften berechnet (Abb. 4.24). Dargestellt sind die errechneten MW der Xenograftgewichte mit oberen und unteren Grenzen des 95 %-Konfidenzintervalls. Signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen wurden mit einem p-Wert $\leq 0,05$ angenommen. Die exakten MW sowie obere und untere Grenzen sind Tab. A4 im Anhang (S. 113) zu entnehmen.

Es zeigte sich ein signifikanter Einfluss von MSC auf die Xenograftgewichte von WT- ($p < 0,001$) und mock-HCT8 ($p = 0,016$). Zwar konnte für mock-HCT8 ein im Vergleich zum WT geringerer wachstumsfördernder Einfluss von MSC detektiert werden, doch konnte dieser als statistisch signifikant gegenüber ungemischten mock-Xenograften berechnet werden, sodass von einer dem WT entsprechenden MSC-vermittelten Wachstumsförderung ausgegangen wurde und im Folgenden auf eine Diskussion dieses Sachverhalts verzichtet wird. Für $\beta 1$ -I kd HCT8 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen MSC-gemischten und ungemischten Xenograften berechnet werden ($p = 0,772$). Dies bestätigte, dass in $\beta 1$ -I kd HCT8 die MSC-vermittelte Wachstumsförderung komplett aufgehoben war. In der CRC-Zelllinie Colo320DM konnten sowohl in MSC-gemischten Xenograften von WT- ($p = 0,027$) und mock- ($p = 0,046$) als auch von $\beta 1$ -I kd Zellen ($p = 0,008$) signifikant höhere Gewichte im Vergleich zu den ungemischten Xenograften berechnet werden. D.h., es lag auch in $\beta 1$ -I kd Zellen der Linie Colo320DM weiterhin eine MSC-vermittelte Wachstumsförderung vor. Der scheinbare Anstieg der Gewichte MSC-gemischter Xenografte von $\beta 1$ -I kd Zellen verglichen zu MSC-gemischten Xenograften von mock-Zellen der Linie Colo320DM war statistisch nicht signifikant ($p = 0,128$). In der CRC-Zelllinie DLD1 konnte lediglich in den WT-Zellen der bereits in 4.1.2 gezeigte signifikante Unterschied der Gewichte MSC-gemischter gegenüber ungemischter Xenografte ermittelt werden. Im Vergleich zu HCT8 und Colo320DM war der Einfluss von MSC auf das Gewicht der Xenografte gering ausgeprägt. Weder für MSC-gemischte Xenograften von mock- noch von $\beta 1$ -I kd DLD1-Zellen konnten signifikante Unterschiede der Gewichte im Vergleich zu den ungemischten Xenograften berechnet werden.



Zusammenfassend ergeben die Daten, dass ausschließlich in der α -Catenin-defizienten Linie HCT8, nicht aber in der E-Cadherin-defizienten Linie Colo320DM oder der E-Cadherin-funktionellen Linie DLD1, die MSC-vermittelte Wachstumsförderung der CRC-Xenografte nach dem kd von $\beta 1$ -Integrin in den CRC-Zellen aufgehoben war. Dies deutete darauf hin, dass die $\beta 1$ -Integrin-abhängige MSC-vermittelte Wachstumsförderung ein Mechanismus für spezifische E-Cadherin-dysfunktionale, und zwar α -Catenin-defiziente CRC-Zellen war. Aus diesem Grund wurde für weitere Analysen der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Wachstumsförderung die Linie HCT8 besonders fokussiert.

4.5.3 MSC-exprimiertes $\beta 1$ -Integrin ist nicht ausschließlich relevant für die Wachstumsförderung α -Catenin-defizienter CRC-Zellen *in vivo*

In vitro konnte gezeigt werden, dass E-Cadherin-dysfunktionale CRC-Zellen und MSC jeweils über $\beta 1$ -Integrin interagierten, was zur MSC-vermittelten Sphäroidbildung führte (siehe 4.4). Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion über CRC-exprimiertes $\beta 1$ -Integrin ausschließlich in der α -Catenin-defizienten CRC-Zelllinie HCT8 für die MSC-vermittelte Wachstumsförderung *in vivo* relevant war (siehe 4.5.2). Es wurde vermutet, dass auch MSC-exprimiertes $\beta 1$ -Integrin bei der Wachstumsförderung von HCT8 *in vivo* eine Funktion hatte. Um dies zu untersuchen, wurden die Xenograftgewichte von HCT8 gemischt mit $\beta 1$ -I kd MSC vergleichend gegenüber denen gemischt mit WT- sowie mock-MSc analysiert. Es wurden

zwei unabhängige Studien mit MSC zweier Spender (vgl. 4.4.2) durchgeführt. Aufgrund der kontroversen Ergebnisse beider Studien erfolgt die Darstellung der Xenograftgewichte als Boxplots getrennt voneinander (Abb. 4.25). Die exakten MW mit Stabw sind der Tab. A5 im Anhang zu entnehmen (S. 114). Die Studie mit MSC #1 zeigte eine deutliche MSC-vermittelte Wachstumsförderung in Xenograften gemischt mit allen MSC-Typen. WT-MSC erzielten 21-fach höhere Gewichte als die ungemischten Kontrollen. Gemischt mit mock-MSC wurden 10-fach höhere Gewichte erreicht. $\beta 1$ -I kd MSC vermittelten einen Anstieg des Xenograftgewichts um das 27-Fache der ungemischten Kontrolle. D.h., die MSC-vermittelte Wachstumsförderung von HCT8 war unabhängig von $\beta 1$ -Integrin in MSC #1. In der Studie mit MSC #2 konnten bei Präsenz von WT- und mock-MSC 4-fach höhere Gewichte im Vergleich zu den ungemischten HCT8-Xenograften erzielt werden. Die Gewichte von HCT8-Xenograften gemischt mit $\beta 1$ -I kd MSC unterschieden sich hingegen nicht von denen der ungemischten Xenograften. D.h., die MSC-vermittelte Wachstumsförderung von HCT8 war abhängig von $\beta 1$ -Integrin in MSC #2. Da es sich um präliminäre Versuche mit geringen Stichproben handelte, wurde auf die statistische Auswertung verzichtet.

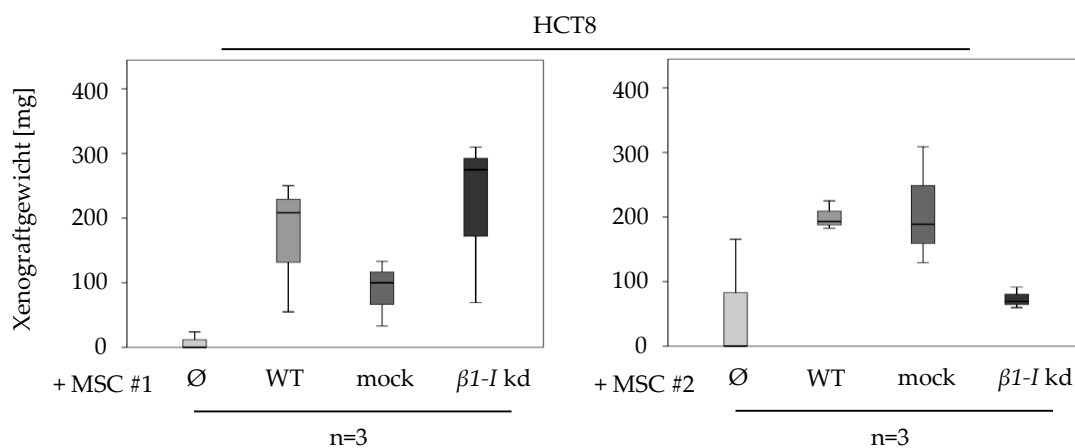


Abb. 4.25: MSC-vermittelte Wachstumsförderung s.c. Xenografte der CRC-Zelllinie HCT8 in Abhängigkeit von MSC-exprimiertem $\beta 1$ -Integrin im Nacktmausmodell. Boxplotdarstellung der Gewichte $\beta 1$ -I kd MSC-gemischter, ungemischter (\emptyset) sowie WT- und mock-MSC-gemischter Xenografte der CRC-Zelllinie HCT8 25 d nach s.c. Injektion. Dargestellt sind zwei unabhängige Studien mit MSC zweier verschiedener Spender #1 und #2.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Analyse der MSC-vermittelten Wachstumsförderung von HCT8 in Abhängigkeit von MSC-exprimiertem $\beta 1$ -Integrin kontroverse Ergebnisse lieferte und keine klare Aussage zu dessen Relevanz bei der MSC-vermittelten Wachstumsförderung von HCT8-Xenograften zuließ.

4.5.4 CRC-exprimiertes $\beta 1$ -Integrin ist relevant für die frühe Adhäsion α -Catenindefizienter CRC-Zellen an MSC

Tumor-Stroma-Interaktionen können jede Phase des Tumorwachstums beeinflussen: Initiation, Progression des Primärtumors, Invasion und Metastasierung in entfernte Gewebe. Es wurde untersucht, ob die Interaktion zwischen MSC und HCT8-Zellen eine Bedeutung während der Invasion hatte. Ein Kriterium invasierender Zellen ist deren vorherige Ablösung

vom Primärtumor. Dies zeigt sich durch EMT-assoziierte Veränderungen im Phänotyp der Zellen sowie die Expression von EMT-Genen. Zur Untersuchung einer möglichen Relevanz der Interaktion zwischen MSC und HCT8-exprimiertem $\beta 1$ -Integrin während der beginnenden Metastasierung wurden MSC-gemischte Kokulturen angefertigt (vgl. 3.10.1). Lichtmikroskopische Aufnahmen dieser Kulturen sind in Abb. 4.26 zu sehen. Die Darstellung zeigt, dass WT-, mock- und $\beta 1$ -I kd HCT8-Zellen in ungemischter Kultur eine runde Morphologie aufwiesen. In MSC-gemischten Kokulturen zeigten WT- und mock-, nicht aber $\beta 1$ -I kd Zellen, ein erhöhtes Zell-scattering im Vergleich zu den ungemischten Kulturen. Die Zellen von WT- und mock-HCT8 wurden bei Präsenz von MSC spindelförmiger und spreiteten sich auseinander. Dieses scattering konnte weiterhin durch MSC-cM ausschließlich in WT- und mock-, nicht aber in $\beta 1$ -I kd HCT8-Zellen, ausgelöst werden (Daten nicht gezeigt).

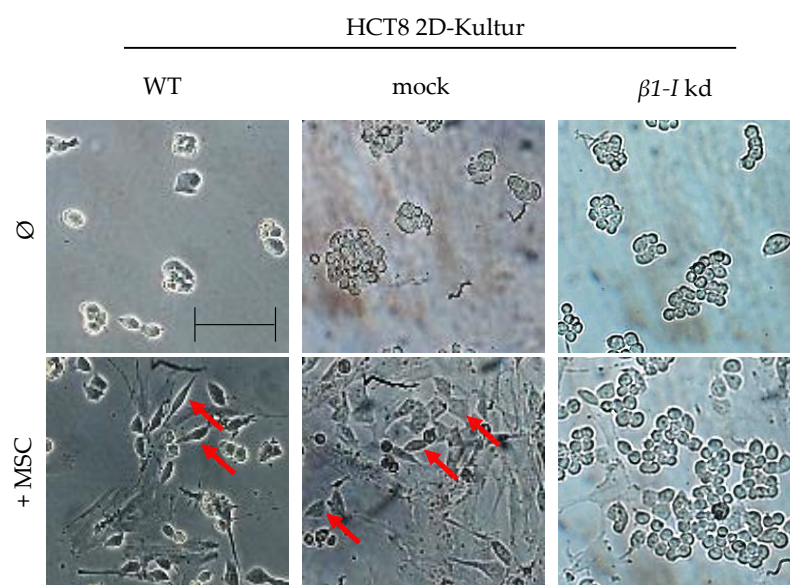


Abb. 4.26: MSC-vermittelter Einfluss auf das Zell-scattering der CRC-Zelllinie HCT8 in Abhängigkeit von HCT8-exprimiertem $\beta 1$ -Integrin *in vitro*. Lichtmikroskopische Aufnahmen der 2D-Kultur MSC-gemischter und ungemischter (Ø) $\beta 1$ -I kd CRC-Zellen vergleichend gegenüber WT- und mock-CRC-Zellen der CRC-Zelllinien HCT8. Pfeile deuten auf Zell-scattering, Balken – 100 μ m.

In der Literatur ist beschrieben, dass das scattering von Zellen den Zustand der EMT und des invasiven Wachstums darstellt (Rooij *et al.* 2005). Daher wurde vermutet, dass in WT- und mock-HCT8-Zellen durch MSC bzw. MSC-cM eine EMT induziert wurde, die durch den kd von $\beta 1$ -Integrin in HCT8 blockiert war. Aufgrund dessen wurde die Expression von EMT-Genen in $\beta 1$ -I kd HCT8-Zellen kultiviert in MSC-cM im Vergleich zu WT- und mock-Zellen untersucht. Als Kontrolle diente die Kultivierung in Wachstumsmedium. Mittels qPCR und Western-Blot wurde die Expression typischer EMT-Marker (z.B. E-Cadherin, Snail, Vimentin) analysiert, jedoch konnte mit keinem der beiden Nachweisverfahren eine durch MSC-cM veränderte Expression dieser Marker in HCT8 nachgewiesen werden. Auch durch den kd von $\beta 1$ -Integrin in HCT8 gab es keine Expressionsunterschiede der EMT-Marker bei Präsenz von MSC-cM (Anhang Abb. A15, S. 111).

Das beobachtete *scattering* könnte auch auf ein erhöhtes Adhäsionsvermögen deuten. Daher wurde *in vitro* weiterhin getestet, ob CRC-Zellen in Abhängigkeit von $\beta 1$ -Integrin eine veränderte Adhäsion auf MSC-Monolayern im Sinne eines metastatischen Absiedelns aufwiesen. Damit sollten Erkenntnisse gewonnen werden, ob die $\beta 1$ -Integrin-abhängige MSC-vermittelte Wachstumsförderung von CRC-Xenograften, insbesondere der Linie HCT8, während des metastatischen Anwachsens relevant war. Hierzu wurde zunächst ein 2D-Adhäsionsassay etabliert. Das Prinzip war, dass ein Monolayer aus MSC im Sinne einer prä-metastatische Nische agierte. Es wurde untersucht, ob die Anzahl daran adhätierender CRC-Zellen von deren $\beta 1$ -Integrin-Expression abhängig war. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.27 A dargestellt. Es ist zu erkennen, dass durch den kd von $\beta 1$ -Integrin in HCT8 die Adhäsion im Vergleich zum WT- und mock-Klon reduziert war. Die Zahl der adhären Zellen lag bei 60 % von denen der WT-Kontrolle. Mittels statistischer Verfahren konnten signifikante Unterschiede in der Adhäsion von $\beta 1$ -I kd HCT8-Zellen im Vergleich zu WT- und mock-Zellen ermittelt werden. Die Linie Colo320DM wies nach kd von $\beta 1$ -Integrin eine erhöhte Adhäsion an MSC im Vergleich zu WT- und mock-Zellen auf (Abb. 4.27 B): Die Zahl adhätierter Zellen von $\beta 1$ -I kd Colo320DM stieg verglichen zu WT- und mock-Zellen um 60 % an. Aufgrund der geringen Stichprobenmenge wurde auf die statistische Auswertung verzichtet. In der Linie DLD1 wurde eine von $\beta 1$ -Integrin unabhängige Adhäsion an MSC-Monolayer beobachtet (Abb. 4.27 C). Die Adhäsion von WT-, mock- und $\beta 1$ -I kd DLD1 verlief in nahezu identischem Ausmaß, sodass auf eine statistische Auswertung dieser Daten verzichtet wurde.

In einer ersten orientierenden Studie sollte die Relevanz der verminderten Adhäsion von $\beta 1$ -I kd HCT8 an MSC *in vivo* untersucht werden. Als Modell wurde die metastatische Absiedlung in Lungen gewählt. Es erfolgte die i.v. Injektion von MSC, gefolgt von der i.v. Applikation von $\beta 1$ -I kd HCT8-Zellen. Als Kontrollen dienten die i.v. Injektionen von WT- bzw. mock-HCT8-Zellen. Nach Anzeichen von Abbruchkriterien, spätestens aber nach 91 d, wurden die Tiere getötet und die Lungen hinsichtlich der Präsenz von Metastasen untersucht. Repräsentative Beispiele lichtmikroskopischer Aufnahmen des Lungengewebes sind in Abb. 4.27 D und E dargestellt. Nach i.v. Applikation von $\beta 1$ -I kd HCT8 konnte kein Wachstum von Lungenmetastasen festgestellt werden. Abb. 4.27 E zeigt beispielhaft eine Region gesunden Lungengewebes. In den Tieren, die nach MSC-Vorlage mit mock-HCT8-Zellen i.v. appliziert wurden, waren ebenfalls keine Anzeichen für Lungenmetastasen zu sehen. In einem der drei Tiere mit i.v. Injektion von WT-HCT8-Zellen konnte die Formierung von Lungenmetastasen beobachtet werden (Abb. 4.27 D). Dieses Tier wies zudem weitere Tumore im Thorax und Hals auf.

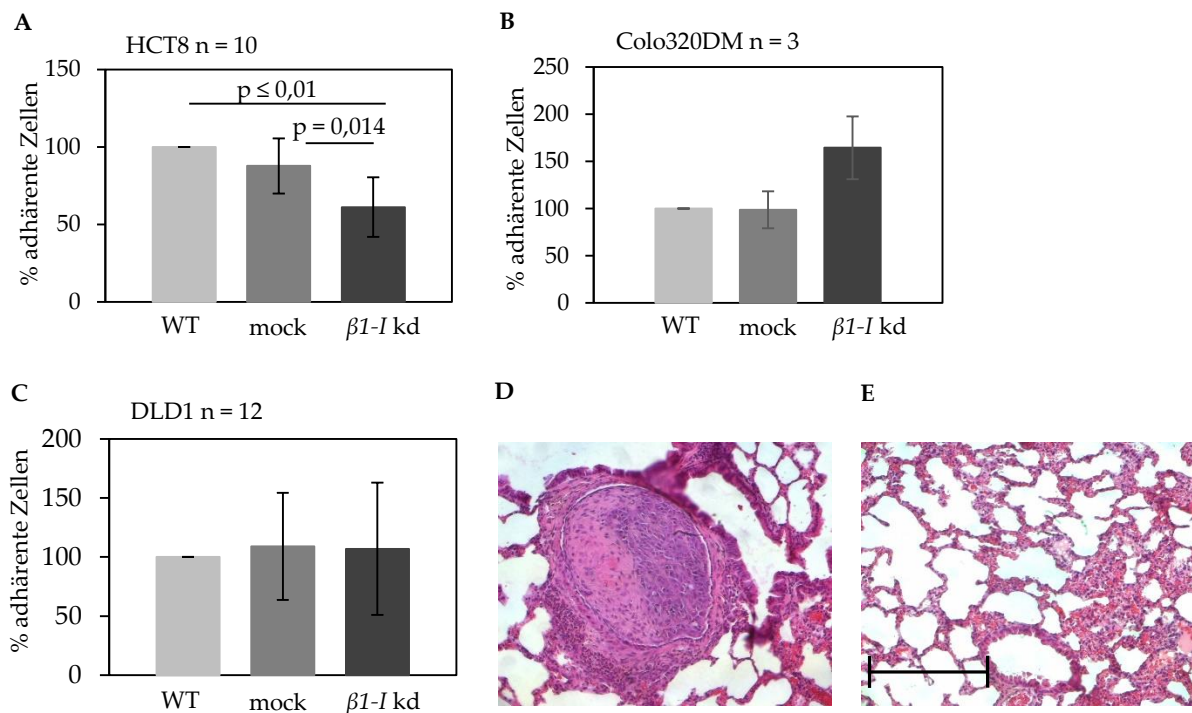


Abb. 4.27: Einfluss von MSC auf die Adhäsion und das metastatische Absiedeln von CRC-Zellen in Abhängigkeit von CRC-exprimiertem $\beta 1$ -Integrin. Mittels *in vitro*-2D-Adhäsionsassay ermittelte Anzahl adhärterer $\beta 1$ -I kd Zellen auf vorgelegte MSC-Monolayer vergleichend gegenüber WT- und mock-Zellen der CRC-Zelllinien HCT8 (A), Colo320DM (B) und DLD1 (C). (D) Lungenmetastase, entwickelt aus i.v. Applikation von WT-HCT8 nach i.v. Vorlage von MSC im Nacktmausmodell. (E) Lungengewebe ohne Anzeichen malignen Wachstums, ebenfalls im Nacktmausmodell, Balken – 250 μ m.

Die Adhäsion an MSC-Monolayer war im Vergleich zu den Linien DLD1 und Colo320DM spezifisch in der Linie HCT8 durch den kd von $\beta 1$ -Integrin vermindert. Auf Expressionsebene gab es keinerlei Anzeichen für eine $\beta 1$ -Integrin-abhängige MSC-induzierte EMT in HCT8. Hinsichtlich der Metastasierung ist festzustellen, dass aufgrund des präliminären Charakters der Studie sowie dem fehlenden Nachweis, dass es sich bei der identifizierten Lungenmetastase um einen HCT8-Tumor handelte, keine klare Aussage getroffen werden konnte, ob $\beta 1$ -Integrin beim metastatischen Anwachsen von HCT8 an vorgelegte MSC beteiligt war.

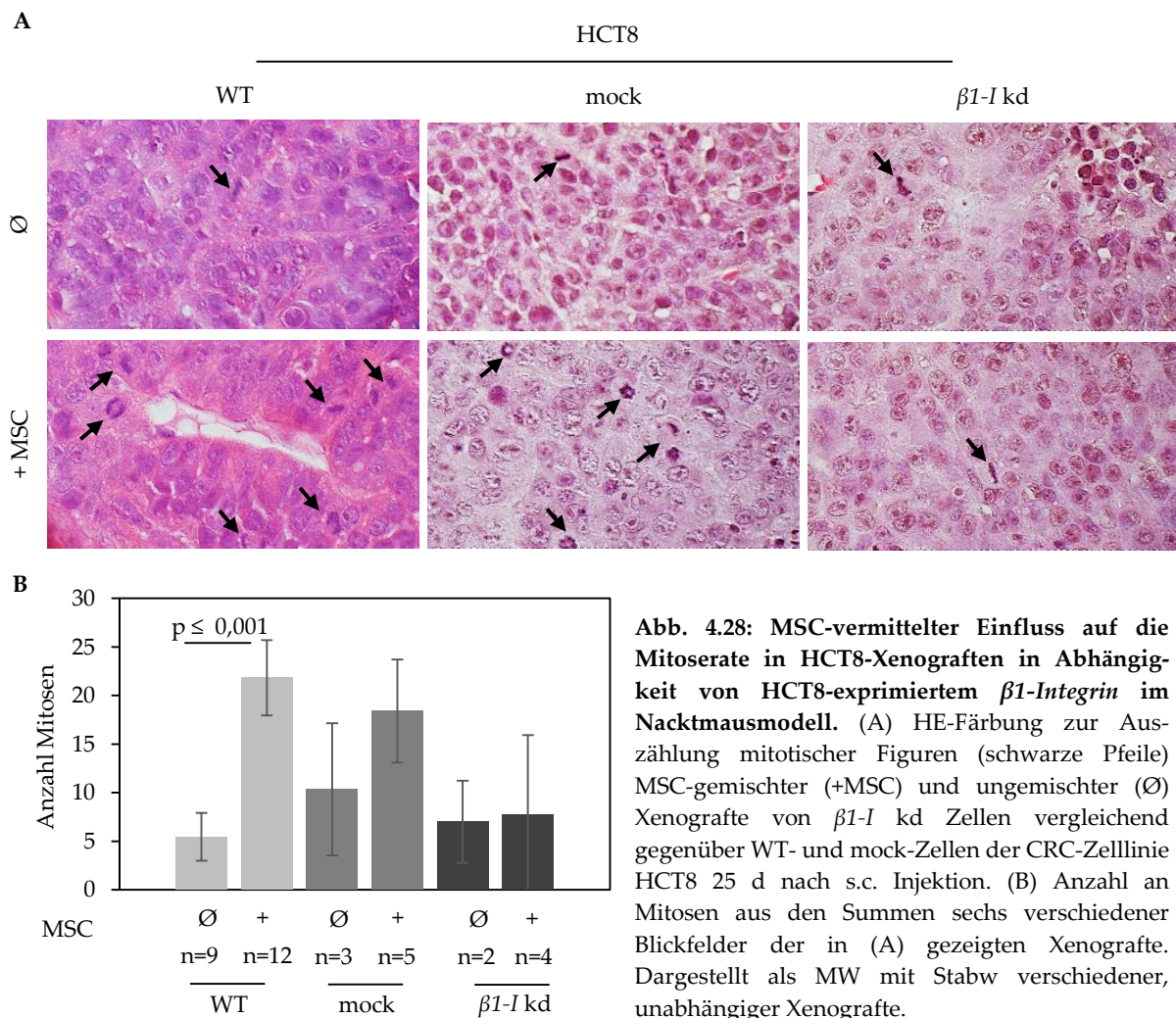
4.5.5 CRC-exprimiertes $\beta 1$ -Integrin ist relevant für eine MSC-induzierte Erhöhung der Mitoserate in Xenograften α -Catenin-defizienter CRC-Zellen

Die Ergebnisse der *in vitro*-Kokulturen zeigten, dass kein Einfluss von MSC auf die Proliferation von CRC vorlag (vgl. 4.2). Da jedoch eine deutliche Wachstumsförderung durch MSC *in vivo* beobachtet wurde, sollte die Proliferation von CRC anhand histologischer Kriterien in Xenograften überprüft werden. Aufgrund der Wachstumseigenschaften der Linie HCT8 stand für histologische Analysen früher Xenografte (d 7 – d 14) zu wenig Material zur Verfügung. Zwar zeigten Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe, dass an d 25 nach Injektion kaum noch MSC in den Xenograften detektierbar waren (Daten nicht gezeigt), dennoch wurde vermutet, dass MSC-vermittelte Mechanismen auch zu späteren Zeitpunkten (d 25)

nachweisbar waren. Gestützt wurde diese Vermutung mit den Ergebnissen des msFI und der Volumenberechnung der Xenografte (siehe 4.1.3 und Anhang Abb. A4, S. 104): Hier zeigte sich ein erhöhter Anstieg sowohl der FI als auch der Xenograftvolumina bei Präsenz von MSC im Vergleich zu den Kontrollen bis zum Versuchsende.

Die orientierende Auswertung immunhistochemischer Färbungen gegen den Proliferationsmarker Ki67 ergab für die Xenografte der Linie HCT8 an d 25 nach Injektion keine sichtbaren Expressionsunterschiede in Abhängigkeit der Präsenz von MSC (Daten nicht gezeigt). Ein Versuch der automatisierten Quantifizierung der Ki67-Färbung der Xenografte scheiterte anhand der Methodik: Aufgrund der hohen Dichte der Ki67-positiven Zellen im aufgenommenen Blickfeld konnten diese vom Bildbearbeitungsprogramm (ImageJ, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) nicht separiert werden. Dies hätte zu falsch-negativen Ergebnissen geführt. Auf eine weiterführende Analyse hinsichtlich der Expression von Ki67 wurde verzichtet.

Die orientierende Analyse mitotischer Figuren in HE-Färbungen von HCT8-Xenograften an d 25 nach Injektion zeigte einen deutlichen Anstieg der Zahl an Mitosen bei Präsenz von MSC im Vergleich zu den ungemischten Xenograften. Es wurde vermutet, dass dieser MSC-vermittelte Einfluss auf die Mitoserate in Xenograften der Linie HCT8 die MSC-vermittelte Wachstumsförderung erklärte. Da nach kd von $\beta 1$ -Integrin in HCT8 keine Wachstumsförderung *in vivo* mehr beobachtet werden konnte, wurde vermutet, dass auch der Einfluss der MSC auf die Mitoserate in diesen Xenograften aufgehoben war. Gestützt wurde diese Annahme durch die Resultate der Volumenberechnungen MSC-gemischter und ungemischter Xenografte von $\beta 1$ -I kd HCT8-Zellen im Vergleich zu den WT- und mock-Xenograften (Anhang Abb. A16, S. 111). Hier zeigte sich ausschließlich in WT- und mock-Xenograften der Linie HCT8 der in 4.1.3 bereits erwähnte stärkere Volumenzuwachs anhand höherer Anstiege zwischen den Messpunkten bis d 25 nach Injektion bei Präsenz von MSC. Dabei wurden in MSC-gemischten Xenograften deutlich größere Volumina erreicht als in den ungemischten Kontrollen. In Xenograften von $\beta 1$ -I kd HCT8 war dieser Effekt völlig aufgehoben. Ungemischte und MSC-gemischte Xenografte zeigten bis zum Ende des Versuchs annähernd identische Anstiege im Volumen, wobei die Volumina beider Gruppen nahezu gleiche Werte erreichten. Um die Hypothese zu klären, ob die MSC-vermittelte Erhöhung der Mitoserate in HCT8-Xenograften $\beta 1$ -Integrin-abhängig verlief, erfolgte die Analyse der Mitosezahl in MSC-gemischten und ungemischten Xenograften von $\beta 1$ -I kd HCT8 im Vergleich zu WT- und mock-HCT8. Dabei wurde lichtmikroskopisch die Summe der Mitosefiguren in sechs Blickfeldern eines Xenografts bestimmt. Repräsentative Ergebnisse sind Abb. 4.28 A zu entnehmen. Die MW der Anzahl der Mitosen aus unabhängigen Xenograften mit Stabw sind in Abb. 4.28 B dargestellt.



Der Vergleich zwischen ungemischten und MSC-gemischten Xenograften von WT- und mock-HCT8 zeigt deutlich, dass bei Präsenz von MSC mehr mitotische Figuren pro Blickfeld zu beobachten waren (Abb. 4.28A). Dies wurde durch den MW-Vergleich der Gruppen bestätigt (Abb. 4.28 B). In WT-Xenograften stieg die Anzahl an Mitosen bei Präsenz von MSC um mehr als das 4-Fache. Mittels t-Test konnte dieser Unterschied als statistisch signifikant ermittelt werden ($p \leq 0,001$). In mock-HCT8 stieg die Anzahl an Mitosen bei Präsenz von MSC um fast das Doppelte. In Xenograften von $\beta 1$ -I kd HCT8 war dieser MSC-vermittelte Anstieg an Mitosen komplett aufgehoben. Es konnte kein Unterschied in der Anzahl mitotischer Figuren in MSC-gemischten gegenüber ungemischten Xenograften ermittelt werden. Aufgrund der Wachstumseigenschaften von mock- und $\beta 1$ -I kd HCT8-Xenograften konnte nur eine geringe Stichprobenmenge für die Auswertung eingesetzt werden, weshalb auf die statistische Auswertung dieser Daten verzichtet wurde.

Für die CRC-Zelllinien DLD1 und Colo320DM wurden gleichartige Untersuchungen durchgeführt. Die MW mit Stabw der ausgezählten Mitosen sind Abb. 4.29 zu entnehmen. Repräsentative HE-Färbungen der Xenografte sind im Anhang in Abb. A17 dargestellt (S. 112). Es ist zu sehen, dass der $\beta 1$ -Integrin-abhängige MSC-vermittelte Einfluss auf die Mitoserate in CRC-Xenograften ein – für die α -Catenin-defiziente Linie HCT8 – spezifischer

Mechanismus war: Im Gegensatz zur Linie HCT8 konnte für DLD1 und Colo320DM bei Präsenz von MSC weder in WT- noch in mock-Xenograften ein Anstieg der Anzahl sichtbarer Mitosen beobachtet werden. Auch in Xenograften von $\beta 1$ -I kd Zellen zeigte sich in beiden Linien kein Einfluss von MSC auf die Anzahl an Mitosen (Abb. 4.29). Da aus diesen Rohdaten keine Unterschiede zwischen den Gruppen ersichtlich waren, wurde auf eine statistische Auswertung dieser verzichtet.

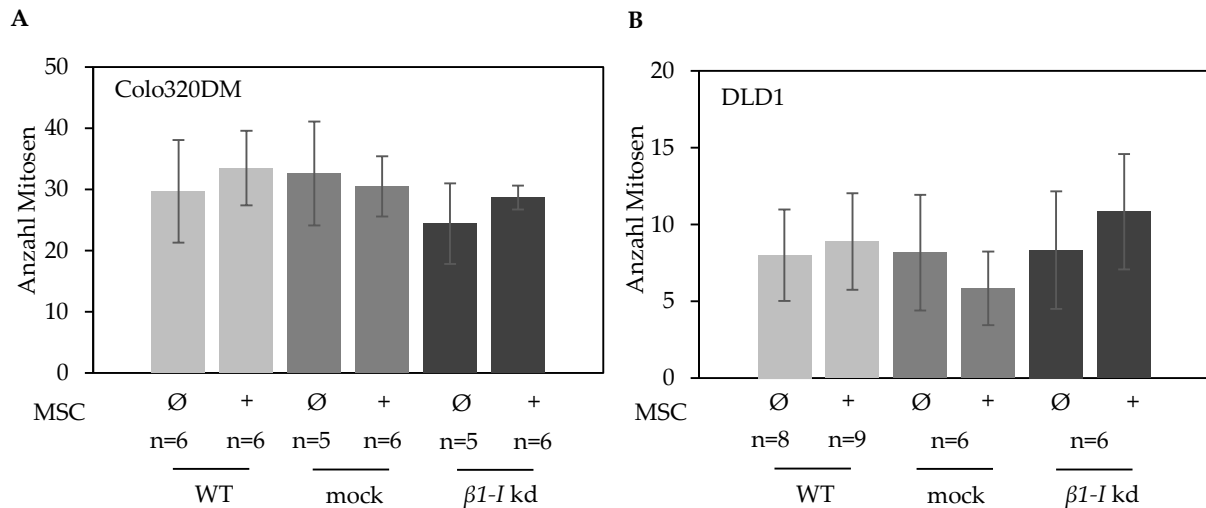


Abb. 4.29: MSC-vermittelter Einfluss auf die Mitoserate in CRC-Xenograften in Abhängigkeit von CRC-exprimiertem $\beta 1$ -Integrin im Nacktmausmodell. (A) Anzahl an Mitosen aus den Summen sechs verschiedener Blickfelder mehrerer MSC-gemischter (+MSC) und ungemischter (Ø) HE-gefärbter Xenograften von $\beta 1$ -I kd Zellen vergleichend gegenüber WT- und mock-Zellen der CRC-Zelllinien Colo320DM (A) und DLD1 (B). Dargestellt als MW mit Stabw.

Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, dass MSC einen Einfluss auf die Anzahl der Mitosen und somit auf die Proliferation von CRC-Zellen in Xenograften der α -Catenin-defizienten Zelllinie HCT8 hatten. Dieser MSC-vermittelte Einfluss auf die mitotische Aktivität war zudem abhängig von der Expression von $\beta 1$ -Integrin in dieser Zelllinie. MSC zeigten keinen Einfluss auf die Mitoserate in Xenograften sowohl E-Cadherin-defizienter Zellen der Linie Colo320DM als auch E-Cadherin-funktioneller Zellen der Linie DLD1. Die MSC-vermittelte Wachstumsförderung durch einen $\beta 1$ -Integrin-abhängigen Einfluss auf die Proliferation von CRC-Zellen schien ein spezifischer Mechanismus für α -Catenin-defiziente CRC-Zellen zu sein.

5. DISKUSSION

5.1 Wesentliche Resultate

Mit der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass MSC-vermittelte $\beta 1$ -Integrin-abhängige Tumor-Stroma-Interaktionen in CRC-Xenograften relevant sind.

Es wurden Tumor-Stroma-Interaktionen in mehreren CRC-Zelllinien mit differentieller Funktionalität des E-Cadherin-System untersucht: die α -Catenin-defiziente Zelllinie HCT8, die E-Cadherin-defiziente Linie Colo320DM und die Linie DLD1 mit funktionellem E-Cadherin-System. Als Stromazellen wurden humane MSC gegenüber Fibroblasten der gesunden Kolonschleimhaut (CCD18Co) untersucht.

Mittels s.c. Mischxenograftmodell wurden in allen untersuchten CRC-Zelllinien bei Präsenz von MSC erhöhte Gewichte gegenüber den ungemischten Kontrollen gemessen, wobei dies in E-Cadherin-dysfunktionalen CRC-Zelllinien prominent ausgeprägt war. Im Vergleich zu CCD18Co zeigten MSC in den untersuchten CRC-Linien einen stärkeren Einfluss auf das Xenograftgewicht. Auch im NOG-Mausmodell wurde eine MSC-vermittelte Wachstumsförderung von CRC-Xenograften, die über das Ausmaß der CCD18Co hinausging, festgestellt. Durch die Berechnung eines gemischt-linearen Modells konnten die Aussagen bezüglich der Xenograftgewichte in Nacktmäusen statistisch belegt werden.

Mittels nicht-invasivem *in vivo* multispektral-Fluoreszenzimagining wurde für mehrere CRC-Zelllinien festgestellt, dass Xenografte bei Präsenz von MSC einen früheren Wachstumsbeginn aufwiesen als ungemischte oder CCD18Co-gemischte Xenografte. Anhand der bis zum Versuchsende steigenden Xenograftvolumina wurde gezeigt, dass sich dieser MSC-vermittelte Effekt erneut in der E-Cadherin-dysfunktionalen CRC-Zelllinie prominent äußerte und sich auch zu späteren Zeitpunkten der Tumorentwicklung manifestierte.

Im 3D-Kulturmodell wurde analysiert, dass E-Cadherin-dysfunktionale CRC-Linien per se nicht zur Sphäroidbildung fähig waren, jedoch durch MSC bereits innerhalb von 24 h zur Bildung von Sphäroiden vermittelt wurden. Mittels blockierender Antikörper und shRNA-basierter knock-downs wurden CRC- und MSC-exprimiertes $\beta 1$ -Integrin sowie MSC-exprimiertes *Kollagen I $\alpha 1$* als Interaktionspartner der MSC-vermittelten Sphäroidbildung identifiziert.

In vivo konnte gezeigt werden, dass CRC-exprimiertes $\beta 1$ -Integrin spezifisch für die MSC-vermittelte Wachstumsförderung der α -Catenin-defizienten CRC-Zelllinie HCT8 relevant war und zu einer erhöhten Mitoserate in den Xenograften führte. In weiteren CRC-Zellen konnte keine Abhängigkeit der MSC-vermittelten Wachstumsförderung von CRC-exprimiertem $\beta 1$ -Integrin beobachtet werden.

5.2 Die Förderung des frühen Wachstums von CRC durch MSC

5.2.1 Die spezifische Wachstumsförderung des CRC durch MSC unabhängig von deren immunregulatorischem Potential

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Tumor-integrierte humane MSC einen generellen, fördernden Einfluss auf das Wachstum von CRC-Xenograften ausübten. Die für die vorliegende Arbeit gewählte Analyse verschiedener CRC-Zellen mit unterschiedlichen Mutationsstatus entspricht dabei der Heterogenität des CRC im humanen Organismus. Für die vorliegende Arbeit wurden Zelllinien mit differentieller Ausprägung der in 1.1.3 beschriebenen, zur Entstehung von CRC führenden, Mutationen gewählt: z.B. HCT8 mit mutiertem *KRAS* (Prewett *et al.* 2011), WT-*TP53* (Petak *et al.* 2000) sowie mutiertem *α -Catenin* (Vermeulen *et al.* 1997); Colo320DM mit WT-*KRAS* (Prewett *et al.* 2011), mutiertem *TP53* (American Type Culture Collection, ATCC) sowie mutiertem *E-Cadherin* (Comijn *et al.* 2001) und DLD1 mit mutiertem *KRAS* (Prewett *et al.* 2011), mutiertem *TP53* (Ahmed *et al.* 2013) sowie funktionellem E-Cadherin-System (Buck *et al.* 2007). Ob und welche Rolle diese Mutationen innerhalb der Tumor-Stroma-Interaktionen einnehmen ist bislang unklar. Im vorliegenden Modell zeigte sich ein Wachstumsvorteil anhand erhöhter Xenograftgewichte 25 d nach s.c. Injektion bei Präsenz von MSC in allen untersuchten Linien, jedoch mit prominenter Ausprägung in den E-Cadherin-dysfunktionalen Zelllinien HCT8 und Colo320DM (Abb. 4.1 und Tab. 4.5). Statistisch validiert wurden diese Daten durch die Berechnung eines gemischt-linearen Modells (Abb. 4.2 und 4.24).

Mit der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin erstmals gezeigt, dass MSC spezifisch gegenüber anderen Stromazellen das Xenograftwachstum unterschiedlicher CRC-Zelllinien förderten. Das Ausmaß der Wachstumsförderung durch MSC konnte durch Präsenz von CCD18Co nicht erreicht werden. Dieser Einfluss zeigte sich erneut prominent in der E-Cadherin-dysfunktionalen CRC-Zelllinie HCT8 gegenüber der E-Cadherin-funktionellen Linie DLD1. Statistisch bestätigt wurde dies ebenfalls durch das berechnete Modell (Abb. 4.1 und 4.2): In der Linie DLD1 konnten durch MSC, nicht aber durch CCD18Co, signifikant höhere Gewichte im Vergleich zu ungemischten Xenograften kalkuliert werden. In der Linie HCT8 konnte zudem gezeigt werden, dass die Gewichte der MSC-gemischten Xenograften sowohl gegenüber ungemischten als auch gegenüber CCD18Co-gemischten Xenograften signifikant höher waren. Es wird vermutet, dass MSC spezifisch gegenüber Fibroblasten eine erhöhte Expression bestimmter Moleküle aufweisen, die zur Tumorprogression beitragen könnten. Dies wird mit Daten anderer Autoren bestätigt. So konnten MSC, nicht aber normale Fibroblasten, durch die Expression membrangebundenen TGF- β eine EMT in Tumorzellen induzieren (Mele *et al.* 2014). Weiterhin wurde beschrieben, dass MSC im Vergleich zu Dermalfibroblasten 10x mehr VEGF-A exprimieren (Bae *et al.* 2009) und dass sie durch die Sekretion von VEGF und anderer pro-angiogener Faktoren maßgeblich zur Angiogenese in Tumoren beitragen (Beckermann *et al.* 2008).

MSC zeichnen sich durch immunregulatorische Effekte aus. Unter anderem supprimieren sie T-, B- und NK-Zellfunktionen und haben einen Einfluss auf dendritische Zellen (Übersicht in Uccelli *et al.* 2008). Für das in der vorliegenden Arbeit genutzte s.c. Xenograftmodell wurden hauptsächlich athymische Nacktmäuse verwendet. Es ist bekannt, dass eine residuelle Immunität in diesen Tieren vorliegt, die mit dem Alter zunimmt (Silobrcic *et al.* 1990). Aus diesem Grund wurden alle *in vivo*-Untersuchungen mit maximal sechs Wochen alten Tieren durchgeführt. Um dennoch auszuschließen, dass der Effekt von MSC auf das Wachstum von CRC-Xenograften ausschließlich auf immunsuppressiven Mechanismen beruhte, wurden einige Versuche in NOD/SCID/ γ_c^{null} -Mäusen (NOG-Mäuse) wiederholt (Abb. 4.4). Für diese Tiere ist eine umfassende Immundefizienz beschrieben (Ito *et al.* 2002). Relevant für die vorliegende Arbeit war, dass in beiden untersuchten CRC-Zelllinien im NOG-Mausmodell bei Präsenz von MSC gegenüber ungemischten Xenograften deutlich höhere Gewichte gemessen wurden. Somit konnte mit der vorliegenden Arbeit erstmals ausgeschlossen werden, dass die MSC-vermittelte Wachstumsförderung von CRC-Xenograften ausschließlich auf dem immunregulatorischen Potential von MSC beruhte. Die höheren Gewichte in MSC-gemischten gegenüber CCD18Co-gemischten Xenograften bestätigten auch im NOG-Modell den MSC-spezifischen Einfluss auf das Wachstum von CRC. Die im NOG-Mausmodell verglichen zum Nacktmausmodell ermittelten höheren Gewichte ungemischter Xenografte der Linie HCT8 lassen sich mit Arbeiten anderer Autoren erklären, die eine Abstoßung xenogener Zellen in Nacktmäusen beschreiben (Quintana *et al.* 2008).

Der Einsatz von MSC als Stromakomponente setzt voraus, dass MSC eine physiologische Relevanz in der Tumorbilogie einnehmen. MSC kommen u.a. im Knochenmark vor. In zahlreichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Zellen des Knochenmarks als Fibroblasten in Tumoren agieren können (Ishii *et al.* 2003; Direkze *et al.* 2004). Auch im humanen Organismus konnte eine Integration von Zellen des Knochenmarks in neoplastische Gewebe, auch des CRC, nachgewiesen werden (Worthley *et al.* 2009). Weiterhin wurde von anderen Autoren für MSC eine Differenzierung zu TAF beschrieben, wodurch die Relevanz der MSC als Teil des Tumorstromas untermauert wird (Mishra *et al.* 2008; Jeon *et al.* 2008). Eine direkte Ableitung von TAF aus MSC konnte *in vivo* bereits bestätigt werden (Quante *et al.* 2011). In einer aktuellen Arbeit ist zudem beschrieben, dass MSC-ähnliche Zellen aus CRC-Patientenproben isoliert werden konnten, und dass diese Zellen nach *in vitro*-Kultivierung typische MSC-Konsensus-Kriterien zeigten (vgl. 1.2.1) (Lin *et al.* 2013), sodass aus Sicht der Autorin die Verwendung von MSC als Stromakomponente des CRC in experimentellen Arbeiten gewährleistet ist.

Die Art und Weise der Integration von MSC in Tumore bleibt bislang unklar. Aufgrund ihrer Rolle bei der Wundheilung und der Analogie von Tumoren mit Wundgewebe (Dvorak 1986) ist eine aktive Migration von MSC zu Tumoren denkbar. Dies wird durch Arbeiten belegt, in denen systemisch applizierte Zellen des Knochenmarks im Stroma präformierter Tumore nachweisbar waren (Ishii *et al.* 2003; Direkze *et al.* 2004). Auch für das CRC konnte die Migration und Integration systemisch applizierter MSC in präformierte s.c. Xenografte, u.a. in

der eigenen Arbeitsgruppe, gezeigt werden (Kucerova *et al.* 2007; Luetzkendorf *et al.* 2010). Neben der beschriebenen aktiven Migration von MSC in Tumore wird weiterhin über eine Funktion der MSC am Ort der metastatischen Absiedlung diskutiert. So bestehen Hinweise, dass TLR4- und VEGFR-positive Zellen des Knochenmarks an der Formierung prä-metastatischer Nischen im Lungengewebe beteiligt sind (Hiratsuka *et al.* 2008; Kaplan *et al.* 2005). Auch im Knochenmark gibt es Hinweise für prä-metastatische Bedingungen (Peinado *et al.* 2012). Die Tatsache, dass MSC in nahezu allen Geweben, z.T. in Form Gefäß-assoziierter Perizyten, vorliegen (Crisan *et al.* 2008), macht deren Beteiligung an der Formierung prä-metastatischer Nischen, aber auch ihre frühe Rekrutierung in formierende Tumore, denkbar. In der vorliegenden Arbeit wurde das s.c. Mischxenograftmodell mit einem Anteil von 20% MSC gewählt. Dieses simuliert einen frühen Zustand der Tumorentwicklung, in dem MSC mit bereits maligne transformierten Zellen in Kontakt kommen. Der gewählte Anteil der MSC von 20 % am Gesamttumor geht einher mit Beobachtungen, wonach sich ca. 25 % der TAF in Tumoren von Zellen des Knochenmarks ableiten (Direkze *et al.* 2004). Aus Sicht der Autorin bietet das gewählte Modell ideale Voraussetzungen für die Untersuchungen hinsichtlich Tumor-Stroma-Interaktionen im CRC.

5.2.2 Die frühe MSC-vermittelte Wachstumsförderung des CRC

Die Untersuchung der Kinetik des CRC-Wachstums mittels msFI bestätigte die anhand der Xenograftgewichte festgestellte MSC-vermittelte Wachstumsförderung von CRC-Xenograften (Abb. 4.3). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten in MSC-gemischten Xenograften aller untersuchten Zelllinien höhere Fluoreszenzintensitäten ermittelt werden als in den ungemischten Kontrollen. Das msFI eignet sich für die Untersuchung von Wachstumskinetiken, da für s.c. Xenografte fluoreszenzmarkierter Zellen eine Korrelation zwischen Fluoreszenzintensität (FI) und Tumolvolumen beschrieben ist (Caysa *et al.* 2012). Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass die Unterschiede des Einflusses von MSC und CCD18Co durch das msFI weniger deutlich erscheinen als anhand der Xenograftgewichte. Dies könnte auf eine bereits beschriebene zelllinienspezifische Genauigkeit der Korrelation zwischen FI und Volumen zurückzuführen sein (Caysa *et al.* 2012). Das msFI ist eine sensitive Methode, die durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird. Eine optimale Korrelation von FI und Volumen kann durch die ellipsoide Form des Tumors gewährleistet werden, die wiederum von der Durchführung der Injektion abhängt. Weiterhin beeinflussen nicht-fluoreszierende murine Stromakomponenten sowie die Entstehung von Nekrosen die Korrelation zwischen Tumorgröße und FI: Beide tragen entscheidend zur Tumorgröße bei, liefern jedoch keinen Beitrag zur FI. Daneben beeinflussen die spektralen Eigenschaften der gewählten Fluoreszenzproteine maßgeblich die Fehleranfälligkeit der Bildgebung. Da sich die Fehler mit steigender Xenograftgröße manifestieren, ist das msFI aus Sicht der Autorin eine geeignete Methode zur Untersuchung des frühen Xenograftwachstums, sollte jedoch, wie im Fall der vorliegenden Arbeit, durch weitere Parameter (Xenograftgewichte, Xenograftvolumina, Histologie) abgesichert werden.

Ein wesentlicher Informationsgewinn des msFI der vorliegenden Arbeit war, dass MSC einen Einfluss auf die Kinetik des frühen Xenograftwachstums ausübten (Abb. 4.3 und Tab. 4.3). In beiden untersuchten Zelllinien zeigte die FI MSC-gemischter Xenografte bereits an d 7 nach Injektion einen höheren Anstieg, sowohl gegenüber der FI ungemischter als auch CCD18Co-gemischter Xenografte. Zusammen mit den Beobachtungen der Arbeitsgruppe, dass MSC an d 25 nach Injektion nicht mehr in den Xenograften nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt), wurde vermutet, dass MSC die Tumorentwicklung während einer frühen Phase beeinflussten. Eine Beteiligung von MSC zu frühen Zeitpunkten des Tumorwachstums wurde bereits von anderen Autoren im murinen Osteosarkom-Modell beschrieben. Hier resultierte die s.c. Koinjektion von Tumorzellen und MSC im Vergleich zur Injektion von ungemischten Tumorzellen in einer gesteigerten Tumorformierung sowie in höheren Wachstumsraten während einer frühen Phase (fünf Wochen nach Injektion). Zu späteren Zeitpunkten (neun Wochen nach Injektion) waren innerhalb der Gruppen keine Unterschiede mehr zu beobachten (Tsukamoto *et al.* 2012). Katsuno *et al.* zeigten ebenfalls einen frühen Einfluss von MSC auf das Wachstum von CRC. In dieser Studie wurde jedoch dargestellt, dass die Applikation von MSC zu frühen Zeitpunkten der Karzinogenese in einer Reduktion von Anzahl und Größe der Tumore resultiert (Katsuno *et al.* 2013). Zu beachten ist allerdings, dass es sich bei dieser Arbeit um ein syngenes Modell in Ratten handelte, wobei die Karzinogenese durch chemische Noxen induziert und die MSC i.v. nach fünf (früher Zeitpunkt) bzw. fünfzehn Wochen (später Zeitpunkt) injiziert wurden. Die Vergleichbarkeit derart unterschiedlicher Modelle ist umstritten. So konnte ebenfalls eine Studie zeigen, dass die Injektion von MSC in präformierte s.c. Xenografte muriner Melanomzellen deren Apoptose induzierte (Otsu *et al.* 2009), während in einem Modell zur Immunsuppression die s.c. Koinjektion von MSC und Melanomzellen zu einer erhöhten Anwachsrate der Tumore führte (Djouad *et al.* 2006).

5.2.3 Die Rolle von MSC beim Aufbau der Tumorarchitektur E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass E-Cadherin-dysfunktionale CRC-Zellen per se nicht zur Sphäroidbildung im 3D-Kulturmodell in der Lage waren. MSC konnten diese Zellen zur Sphäroidbildung vermitteln (Abb. 4.8 und 4.15). Auch hier zeigte sich der spezifische Einfluss von MSC gegenüber CCD18Co, die keine Sphäroidbildung von E-Cadherin-dysfunktionalen CRC-Zellen induzieren konnten. Durch die Analogie von Sphäroiden und avaskulären Mikrotumoren bzw. Metastasen (Abb. 1.1; Friedrich *et al.* 2007 a) kann aus Sicht der Autorin das Unvermögen zur Sphäroidbildung im Sinne einer gestörten Ausbildung der Tumorarchitektur *in vivo* vermutet werden: Zellen ohne funktionelles E-Cadherin sind durch das Fehlen fester interzellulärer Verbindungen scheinbar nicht befähigt, eine stabile Tumorarchitektur aufzubauen. Die Relevanz von E-Cadherin für die Sphäroidbildung konnte bereits von anderen Autoren im Mammakarzinom-Modell aufgezeigt werden. Auch hier waren Zellen ohne E-Cadherin bzw. mit einem Defekt im

α -Catenin unfähig, Sphäroide auszubilden (Ivascu und Kubbies 2007). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die MSC-vermittelte Sphäroidbildung E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen bereits nach 24 h vollzogen war, und dass im intakten Sphäroid bereits nach 4 - 5 d Apoptosen/Nekrosen, vermutlich ausgehend von den MSC, entstanden (Abb. 4.9). Weiterhin bestätigten die immunhistochemischen Färbungen gegen GFP, dass MSC und CRC-Zellen im Sphäroid tatsächlich in Interaktion traten. Es lagen deutliche Unterschiede in der Verteilung der MSC zwischen Sphäroiden E-Cadherin-funktioneller und -dysfunktionaler CRC-Zelllinien vor (Abb. 4.8 B). Während in Sphäroiden der Linie DLD1 die MSC scheinbar in einem unabhängigen zentralen Areal vorlagen, war die Verteilung innerhalb der HCT8-Sphäroide homogener. Andere Autoren konnten dies in gemischten Sphäroiden von Mammakarzinomzellen mit TAF beobachten, wobei diskutiert wurde, ob die Verteilung zwischen Tumorzellen und TAF im Sphäroid ein Indiz für das TAF induzierte invasive Verhalten der E-Cadherin-dysfunktionalen Tumorzellen sein könnte (Angelucci *et al.* 2012). Aus Sicht der Autorin wurde vermutet, dass die homogene Verteilung zwischen E-Cadherin-dysfunktionalen CRC-Zellen und MSC ein Indiz für einen intensiven Kontakt beider Zelltypen war, der beim Aufbau der Tumorarchitektur und der MSC-vermittelten Wachstumsförderung *in vivo* eine Funktion übernahm.

Die Daten des msFI und die Vermittlung der Sphäroidbildung innerhalb kurzer Zeit (24 h) deuten darauf hin, dass MSC die Tumorarchitektur während einer sehr frühen Phase des Tumorwachstums, z.B. des metastatischen Anwachsens, beeinflussen. Da konditioniertes Medium von MSC nicht zur vollständigen Sphäroidbildung ausreichte (Abb. 4.13), wurde vermutet, dass MSC als Stützgerüst zum Aufbau der Tumorarchitektur des CRC notwendig waren. Dies geht einher mit Beobachtungen anderer Autoren, in denen nur bei Präsenz eines „stromalen Nestes“ das Anwachsen von Plattenepithelzellen *in vivo* gewährleistet war (Patel *et al.* 2012). Ein Kontakt von MSC und Tumorzellen bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Tumorentstehung bzw. Metastasierung wird durch die vermutete Lokalisierung der MSC als Gefäß-assoziierte Perizyten (Crisan *et al.* 2008), sowie deren mögliche Beteiligung beim Aufbau prä-metastatischer Nischen denkbar (Kaplan *et al.* 2005).

Das Auswachsen einer Tumorzelle zur Metastase umfasst einen mehrstufigen Prozess, bei dem die Mikroumgebung in jedem Schritt eine entscheidende Rolle einnimmt. Beginnend mit der Ablösung der Tumorzelle vom Primärtumor durch eine EMT, dem Eintritt und Überleben der Zelle im Blutgefäßsystem, dem Austritt am Ort der metastatischen Absiedlung und der Induktion der Zellteilung (Bacac und Stamenkovic 2008) entwickelt sich die metastatische Einzelzelle zur Mikrometastase und im weiteren Verlauf durch die Rekrutierung von Stroma und die Induktion von Angiogenese zur Makrometastase und letztlich zu einem neuen Tumor (Joyce und Pollard 2009). Das CRC ist gekennzeichnet durch die Metastasierung, vor allem in die Lunge und Leber, wobei der Verlust von E-Cadherin vermutlich ein initialer Schritt der Metastasierung darstellt (Brabletz *et al.* 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde vermutet, dass MSC *in vivo* beim Aufbau der Tumorarchitektur E-Cadherin-dysfunktionaler,

im Sinne metastasierender, CRC-Zellen beteiligt waren, wodurch das frühe Anwachsen dieser Zellen *in vivo* begünstigt wurde. Bestätigt wurde diese Hypothese durch die in 5.2.1 und 5.2.2 geschilderte prominente Ausprägung der MSC-vermittelten Wachstumsförderung in den E-Cadherin-dysfunktionalen CRC-Linien HCT8 und Colo320DM im Vergleich zur geringeren MSC-vermittelten Wachstumsförderung der E-Cadherin-funktionellen Linie DLD1 (Abb. 4.1 und 4.25).

Das in der vorliegenden Arbeit gewählte Modell zur Untersuchung der Interaktion zwischen MSC als Stromakomponente und CRC-Zellen mit einer differentiellen Funktionalität hinsichtlich E-Cadherin repräsentiert die typische Physiologie des CRC und wird durch die klinische Relevanz des E-Cadherin im CRC gestützt. In einer Studie wurde beschrieben, dass der Verlust von E-Cadherin in Zellen der Kolon-Krypten zur Entwicklung von Adenomen führen kann (Hermiston und Gordon 1995). Weiterhin ist bekannt, dass die gesunde Darmmukosa über eine Expression von E-Cadherin auf der basolateralen Membran aller Kryptenzellen und Enterozyten verfügt (Blok *et al.* 1999), wohingegen CRC-Patientenproben eine abnorme Expression von E-Cadherin aufweisen (Überblick in Tsanou *et al.* 2008). Die Aussagen bezüglich der Rolle von E-Cadherin im CRC werden dabei kontrovers diskutiert. Es gibt jedoch eindeutige Hinweise, dass der Verlust von E-Cadherin und Cateninen mit einer Dedifferenzierung, Invasion und Metastasierung korreliert (Tsanou *et al.* 2008). Das Tumorstroma nimmt in diesen Phasen der Tumorphyse eine entscheidende Funktion ein. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte frühe Wachstumsförderung, spezifisch von E-Cadherin-dysfunktionalen CRC-Zelllinien, durch MSC könnte ein Indiz für die Rolle des Stromas während dieser Phasen darstellen. Ebenfalls zeigen klinische Daten, dass ein hoher Stromaanteil im CRC für eine schlechte Prognose des Krankheitsverlaufs steht (Mesker *et al.* 2007). Die Interaktionspartner zwischen Tumor und Stroma stellen somit vielversprechende, potentielle Therapieziele dar.

5.3 Die Interaktionspartner zwischen MSC und CRC

5.3.1 β 1-Integrin als Interaktionspartner auf Seiten der CRC-Zellen

Als Interaktionspartner auf Seiten der E-Cadherin-dysfunktionalen CRC-Zellen konnte mittels Sphäroidmodell β 1-Integrin identifiziert werden. Es wurde gezeigt, dass alle untersuchten CRC-Linien β 1-Integrin exprimierten (Abb. 4.21). Die MSC-vermittelte Sphäroidbildung war in allen untersuchten Linien durch Antikörper-vermittelte Blockade von β 1-Integrin aufgehoben (Abb. 4.17). Um die Relevanz CRC-exprimierten β 1-Integrins an der Interaktion mit MSC zu untersuchen, wurde ein gezielter knock-down von β 1-Integrin in den CRC-Zellen mittels lentiviraler shRNA eingefügt. Eine shRNA-Sequenz reichte dabei aus, um in den Tumorzellen einen effizienten knock-down zu erzielen. Die Verwendung einer shRNA-Sequenz erhöht die Wahrscheinlichkeit des Auftretens unerwünschter *off-target*-Effekte (Hannus *et al.* 2014). Um diese auszuschließen, wurden die generierten β 1-Integrin knock-down Klone der CRC-Linien umfangreich hinsichtlich ihrer Wachstumseigenschaften geprüft.

Der knock-down zeigte keinen kritischen Einfluss auf Wachstumskinetiken und Verhalten gegenüber Zytostatika *in vitro*. Im Soft-Agar zeigte sich durch den knock-down von $\beta 1$ -Integrin eine leicht reduzierte Größe der CRC-Kolonien im Vergleich zu WT- und mock-CRC (Anhang Abb. A11 – A13), die jedoch nicht mit dem Xenograftwachstum *in vivo* korrelierte: Xenografte von $\beta 1$ -Integrin knock-down Zellen aller drei untersuchten CRC-Zelllinien zeigten ein zu den WT- bzw. mock-Xenograften vergleichbares Wachstum (Tab. 4.5 und Anhang Abb. A14). Auffällig war die im Vergleich zum WT reduzierte MSC-vermittelte Wachstumsförderung von mock-HCT8-Xenograften. Allerdings wurde mittels allgemeinem Modell auch hier der Einfluss der MSC auf die Gewichte der mock-Zellen als statistisch signifikant ermittelt (Abb. 4.24). Weiterhin wurde in mock-HCT8-Xenograften ein deutlicher Einfluss von MSC auf deren Volumina beobachtet (Anhang Abb. A16), sodass im Rahmen dieser Arbeit auch in mock-HCT8 von einer, der WT-entsprechenden, MSC-vermittelten Wachstumsförderung ausgegangen wurde. Aufgrund der Resultate dieser Analysen wurde vermutet, dass unerwünschte *off-target*-Effekte für die weiteren Versuche keine Rolle spielten. Andere Autoren beobachteten z.B. nach knock-down von $\beta 1$ -Integrin im Pankreaskarzinom-Modell eine reduzierte Anzahl an Kolonien im Soft-Agar-Assay (Schooley *et al.* 2012) sowie ein reduziertes Tumorwachstum *in vivo* (Grzesiak *et al.* 2011). Diese zur vorliegenden Arbeit kontroversen Daten deuten damit auf einen von der Entität abhängigen Mechanismus der $\beta 1$ -Integrin-vermittelten Tumorigenität hin.

Nach knock-down von $\beta 1$ -Integrin waren alle untersuchten E-Cadherin-dysfunktionalen CRC-Linien nicht mehr zur MSC-vermittelten Sphäroidbildung fähig (Abb. 4.22). Dies ließ darauf schließen, dass MSC und CRC über CRC-exprimiertes $\beta 1$ -Integrin miteinander interagierten und dass diese Interaktion vermutlich beim Aufbau der Tumorarchitektur durch MSC beteiligt war (vgl. 5.2.3).

Dass $\beta 1$ -Integrin im untersuchten Modell eine Funktion in der Tumor-Stroma-Interaktion einnimmt, wird durch den Einfluss von $\beta 1$ -Integrin in der Tumorprogression im Allgemeinen und dessen klinischer Relevanz speziell im CRC bestätigt. $\beta 1$ -Integrin hat eine entscheidende Bedeutung in der Initiierung, dem Wachstum sowie der Progression verschiedener Tumorentitäten (Übersicht in Xiong *et al.* 2013 und Howe und Addison 2012). Die zugrunde liegenden Mechanismen hierbei sind weitestgehend ungeklärt. In einigen Fällen wurde eine Beteiligung des Signalwegs über FAK (McLean *et al.* 2004) sowie ein wechselseitiger stimulierender *cross-talk* von Integrinen mit TGF- β beschrieben, der in der Förderung der Tumorprogression resultierte (Margadant und Sonnenberg 2010). Im CRC ist eine deutlich veränderte Expression von Integrinen beschrieben, wobei ein Verlust von $\beta 1$ -Integrin mit einer Dedifferenzierung der Tumore einhergeht (Pignatelli *et al.* 1990). Während Adenome sowie stark differenzierte Adenokarzinome über eine hohe Expression verfügen, sinkt diese in moderat und schlecht differenzierten Tumoren ab (Stallmach *et al.* 1992). In einer aktuellen Fallkontrollstudie konnte gezeigt werden, dass $\beta 1$ -Integrin vor allem in fortgeschrittenen

Stadien des CRC in Patienten nachweisbar ist und somit als prognostischer Marker agieren könnte (Oh *et al.* 2014).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde vermutet, dass die Interaktion zwischen CRC und MSC eine Rolle in der Adhäsion, eventuell in der metastatischen Absiedlung spielte. Es bestätigte sich, dass spezifisch die α -Catenin-defiziente CRC-Zelllinie HCT8 β 1-Integrin-abhängig an MSC adhärierte (Abb. 4.27; weitere Ausführungen zur Adhäsion siehe 5.4.1). Aus der Fachliteratur ist bekannt, dass β 1-Integrin an der Tumorprogression und Invasion sowie der Adhäsion zirkulierender CRC-Zellen im Lebersinusoid beteiligt ist (Kirkland und Ying 2008; Enns *et al.* 2004). Da auch Lebermetastasen des CRC eine Korrelation der β 1-Integrin-Expression mit histopathologischen Eigenschaften aufweisen (Vassos *et al.* 2014), wird aus Sicht der Autorin vermutet, dass β 1-Integrin eine Rolle im Adhäsionsvermögen und der Invasion von CRC einnimmt. Aktuelle experimentelle Arbeiten bestätigen einen Einfluss von aktivem β 1-Integrin auf die Extravasation und metastatische Absiedlung von Tumorzellen (Kato *et al.* 2012), während inaktives β 1-Integrin die Migration, Invasion und Adhäsion inhibiert (Chen *et al.* 2014).

Die Daten der vorliegenden Arbeit bestätigten die Funktionalität der β 1-Integrin-abhängigen Tumor-Stroma-Interaktion *in vivo* in spezifischen E-Cadherin-dysfunktionalen CRC-Zellen: Selektiv für die α -Catenin-defiziente Linie HCT8 war die MSC-vermittelte Wachstumsförderung *in vivo* durch den knock-down von β 1-Integrin aufgehoben (Abb. 4.24). Demgegenüber stehen Daten der E-Cadherin-defizienten Zelllinie Colo320DM, die nach dem knock-down von β 1-Integrin weiterhin über eine MSC-vermittelte Wachstumsförderung verfügte (Abb. 4.24). Obwohl beide CRC-Linien ein dysfunktionales E-Cadherin-System aufweisen, scheinen verschiedene Mechanismen der MSC-vermittelten Wachstumsförderung *in vivo* vorzuliegen.

Hierbei muss der Unterschied zwischen E-Cadherin-Dysfunktionalität aufgrund einer E-Cadherin-Defizienz (Colo320DM) oder einer α -Catenin-Defizienz (HCT8) berücksichtigt werden. Trotz Dysfunktionalität kann die vorhandene Expression von E-Cadherin in HCT8 bei der Wachstumsförderung durch MSC von Bedeutung sein. Für E-Cadherin ist eine Konvergenz zum Wnt-Signalweg beschrieben (Heuberger und Birchmeier 2010). Dieser liegt im CRC hauptsächlich in mutierter Form vor, sodass E-Cadherin im CRC eine entscheidende Funktion einnehmen könnte. E-Cadherin und der Wnt-Signalweg konvergieren bezüglich des zellulären β -Catenin-Pools, wobei E-Cadherin zytosolisches β -Catenin bindet und dessen nukleare Lokalisation und somit die β -Catenin-abhängige Transkription ausgewählter Gene inhibiert (Orsulic *et al.* 1999). Im CRC konnte gezeigt werden, dass in Zellen mit einem per se konstitutiv aktiven Wnt-Signalweg der Verlust von E-Cadherin zur weiteren Erhöhung der β -Catenin-abhängigen Transkription führt (Kuphal und Behrens 2006). Möglich wäre, dass der komplette Verlust von E-Cadherin in Colo320DM zu erhöhten zytosolischen β -Catenin-Levels führt, woraus letztlich eine weitere Erhöhung der Expression von Wnt-Zielgenen

resultiert. Dies könnte wiederum Einfluss auf das Tumorwachstum und die Tumor-Stroma-Interaktion nehmen. Relevant könnte zudem der Einfluss von – im Gegensatz zur HCT8 – funktionellem α -Catenin bei der Interaktion zwischen Zellen der CRC-Linie Colo320DM und MSC sein. Neben der Rolle als Verbindung zwischen E-Cadherin und dem Aktinzytoskelett werden α -Catenin entscheidende Funktionen in der Tumorbilogie zugeschrieben, u.a. der Tumorigenese und Progression (Benjamin und Nelson 2008). Im CRC ist der Verlust von α -Catenin ein stärkerer prognostischer Marker für Invasion und Metastasierung in Lymphknoten als der Verlust von E-Cadherin (Gofuku *et al.* 1999). Aus Sicht der Autorin bestätigen die Daten der vorliegenden Arbeit und die Daten der Fachliteratur, dass eine E-Cadherin-Dysfunktionalität heterogene Ausprägungsformen zeigt, die zelllinienspezifisch betrachtet werden sollten.

Neben der unterschiedlichen Relevanz von α -Catenin und E-Cadherin in der Tumor-Stroma-Interaktion sind jedoch auch zelllinienspezifische kompensatorische Mechanismen bei der MSC-vermittelten Wachstumsförderung des CRC möglich, die im Sphäroidmodell nicht erfasst werden konnten und scheinbar unabhängig von β 1-Integrin sind. So ist u.a. beschrieben, dass die Überexpression von β 3-Integrin kompensatorisch für den Verlust von β 1-Integrin in *Mammary Epithelial Cells* wirkt (Parvani *et al.* 2013). Weiterhin ist bekannt, dass der Verlust von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen kaum Auswirkungen auf die Adhäsion hat, solange funktionelles E-Cadherin vorliegt (Duband *et al.* 1987). Es wird vermutet, dass dies auch für den Verlust von Integrinen zutrifft und sich daher der Verlust dieser Interaktion in E-Cadherin-funktionellen Zelllinien nicht prominent äußert. Dies könnte für die E-Cadherin-funktionelle CRC-Zelllinie DLD1 erklären, warum die Adhäsion an MSC-Monolayer und die MSC-vermittelte Wachstumsförderung *in vivo* unabhängig von β 1-Integrin verliefen. Weiterhin sind additive Mechanismen in dieser Linie denkbar. Von anderen Autoren wurde z.B. im Ovarialkarzinom-Modell gezeigt, dass β 1-Integrin zusammen mit CD44 bei der Adhäsion am Mesothel beteiligt ist, wobei die Blockade eines Moleküls die Adhäsion nicht vollständig aufheben kann (Lessan *et al.* 1999).

5.3.2 β 1-Integrin als Interaktionspartner auf Seiten der MSC

Auch auf Seiten der MSC waren Untersuchungen im Sphäroidmodell hilfreich, um Interaktionspartner zu CRC-Zellen zu identifizieren. Zunächst wurde geprüft, ob ein direkter Kontakt von MSC über CRC-exprimiertes β 1-Integrin zur MSC-vermittelten Sphäroidbildung führte. Für β 1-Integrin ist ein direkter Kontakt zu VCAM-1 bekannt (Taichman *et al.* 1991). Zudem ist beschrieben, dass MSC VCAM-1 exprimieren (Juneja *et al.* 1993). Da die MSC-vermittelte Sphäroidbildung in HCT8 trotz blockierenden Antikörpers gegen VCAM-1 bestand, wurde dessen Beteiligung bei der Interaktion zwischen MSC und CRC-Zellen ausgeschlossen (Abb. 4.18).

Weiterhin wurde analysiert, dass MSC ebenfalls β 1-Integrin exprimieren (Abb. 4.19). Mittels lentiviraler shRNA-Partikel konnte in den MSC ein stabiler knock-down von β 1-Integrin

eingefügt werden, wobei im Gegensatz zu CRC-Zellen ein Gemisch aller vorliegenden shRNA-Sequenzen für einen stabilen knock-down notwendig war. Der Einsatz eines shRNA-Gemisches ist von Vorteil, da nicht vorhersehbare *off-target*-Effekte minimiert werden (Hannus *et al.* 2014). Für beide untersuchten MSC-Chargen MSC #1 und MSC #2 konnte ein effizienter knock-down von $\beta 1$ -Integrin mittels Western-Blot nachgewiesen werden (Abb. 4.19). Die kontroversen Resultate zwischen qPCR und Western-Blot bei MSC #2 lassen sich auf die methodenspezifischen Unterschiede zurückführen, wobei der Western-Blot eine stärkere Aussagekraft für das Vorhandensein funktionellen Proteins aufweist. Für beide MSC-Chargen konnte gezeigt werden, dass der knock-down von $\beta 1$ -Integrin keinen Einfluss auf ausgewählte Konsensus-Kriterien der MSC genommen hat (Anhang Abb. A9 und A10).

Die Rolle MSC-exprimierten $\beta 1$ -Integrins bei der Interaktion mit CRC-Zellen und dessen Beteiligung beim postulierten Aufbau einer funktionellen Tumorarchitektur zeigte sich durch den Verlust der MSC-vermittelten Sphäroidbildung in E-Cadherin-dysfunktionalen CRC-Zellen nach knock-down von $\beta 1$ -Integrin in MSC (Abb. 4.20). Die Experimente zur Relevanz von MSC-exprimiertem $\beta 1$ -Integrin bei der Wachstumsförderung von CRC-Xenograften *in vivo* lieferten hingegen widersprüchliche Ergebnisse (Abb. 4.25). Während MSC #1 die Wachstumsförderung von HCT8-Xenograften trotz knock-downs von $\beta 1$ -Integrin vermittelte, war diese in MSC #2 komplett aufgehoben. Einerseits können trotz des Einsatzes verschiedener shRNA-Sequenzen nicht vorhersehbare *off-target*-Effekte, die einen Einfluss auf die wachstumsfördernden Eigenschaften der MSC haben könnten, nicht ausgeschlossen werden. Andererseits wird vermutet, dass es sich um einen sehr komplexen Mechanismus der Wachstumsförderung durch MSC handelt, der u.a. von der Kultivierung der MSC vor deren Einsatz im Tierversuch abhängig sein könnte. Verschiedene Autoren konnten zeigen, dass innerhalb der MSC-Population 80 % der Zellen positiv für $\beta 1$ -Integrin sind, wobei die Expression während des Wachstums schwankt und einige Integrine erst bei höherer Konfluenz exprimiert werden (Semon *et al.* 2010; Goessler *et al.* 2006; Goessler *et al.* 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde vermutet, dass die Reproduzierbarkeit der Versuche sensibel von der Konfluenz der eingesetzten MSC abhing. Weiterhin wurde aus Sicht der Autorin vermutet, dass es sich bei der beobachteten MSC-vermittelten Wachstumsförderung um additive Mechanismen handelte, die nicht ausschließlich auf MSC-exprimiertem $\beta 1$ -Integrin, sondern auf einer Vielzahl sezernierter Faktoren beruhten. Aus der Literatur ist bekannt, dass MSC-sezerniertes CCL5 im Mammakarzinom-Modell zur Tumorprogression durch Induktion von Invasion und Metastasierung beiträgt (Karnoub *et al.* 2007). Speziell für das CRC ist eine Wachstumsförderung durch MSC-sezerniertes Neuregulin 1 (Boeck *et al.* 2013) sowie PAI-1 beschrieben (Hogan *et al.* 2013), wobei in diesen Studien der Nachweis der funktionellen Relevanz dieser MSC-sezernierten Moleküle *in vivo* fehlt.

Aus Sicht der Autorin stellen die kontroversen Ergebnisse zur Rolle von MSC-exprimiertem $\beta 1$ -Integrin bei der Wachstumsförderung von CRC-Xenograften keinen Widerspruch zur beschriebenen Relevanz von Stroma-exprimiertem $\beta 1$ -Integrin im CRC dar. Neben der

prominenten Funktion in Tumorzellen gibt es zahlreiche Hinweise, dass $\beta 1$ -Integrin auf Stromazellen ebenfalls einen Einfluss auf die Tumorprogression ausüben kann: Integrine auf MSC scheinen u.a. an deren Differenzierung beteiligt zu sein und nehmen hierbei vermutlich eine Funktion bei der Signaltransduktion ein (Goessler *et al.* 2008). Ob eine Differenzierung Tumor-integrierter MSC während der Tumorprogression eine Bedeutung hat, ist nicht zuletzt wegen des fehlenden unikaten Markers der MSC fraglich. Für zahlreiche $\beta 1$ -haltige Integrine des Stromas konnte eine entscheidende Beteiligung bei der Tumor- und Lymphangiogenese gezeigt werden (Avraamides *et al.* 2008). Weiterhin ist beschrieben, dass $\alpha 11\beta 1$ -Integrin auf stromalen Fibroblasten eine Rolle in der Sekretion von IGF-2 hat und somit Einfluss auf die Tumorprogression nimmt (Zhu *et al.* 2007). Speziell im Hinblick auf die Relevanz von $\beta 1$ -Integrin auf MSC als Tumorstromakomponente konnten einige Studien zeigen, dass $\alpha 4\beta 1$ -Integrin auf Zellen des Knochenmarks die Adhäsion an Tumor-assoziierte Endothelzellen vermittelt (Jin *et al.* 2006 b) und dass eine Blockade dieses Integrins zu einer verringerten Blutgefäßdichte führt (Jin *et al.* 2006 a).

5.3.3 Kollagen I als Interaktionspartner auf Seiten der MSC

Neben einer direkten Interaktion über Oberflächenrezeptoren ist auch der indirekte Einfluss von MSC auf das Xenograftwachstum durch sezernierte Faktoren möglich. MSC sezernieren eine Vielzahl von Molekülen, vor allem Cytokine, ECM und ECM-modulierende Enzyme, die eine potentielle Rolle in der Tumorprogression einnehmen können (Park *et al.* 2009; Silva *et al.* 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Kultivierung mit Cycloheximid die MSC-vermittelte Sphäroidbildung der Zelllinie HCT8 aufgehoben hat. Somit schien eine Neusynthese von Proteinen bei der Interaktion von MSC und CRC relevant zu sein (Abb. 4.10). Weiterhin wurde beobachtet, dass konditioniertes Medium von MSC ebenfalls einen Einfluss auf die 3D-Architektur von HCT8-Zellen hatte, und dass BD Matrigel™ und Kollagen I die MSC-vermittelte Sphäroidbildung in diesen Zellen simulierten (Abb. 4.11). Zudem konnte in histologischen Analysen MSC-gemischter HCT8-Sphäroide im Gegensatz zu ungemischten 3D-Kulturen kollagene Fasern nachgewiesen werden (Abb. 4.12). Da bekannt ist, dass MSC Kollagen I exprimieren, wurde weiterhin vermutet, dass MSC-sezerniertes Kollagen I an der Interaktion zwischen MSC und CRC-Zellen beteiligt war. Dies konnte mittels gezieltem knock-down von *Kol I $\alpha 1$* , einer Untereinheit des Kollagen I, bestätigt werden. E-Cadherin-dysfunktionale CRC-Zellen wurden durch MSC mit einem knock-down von *Kol I $\alpha 1$* nicht mehr zur Sphäroidbildung vermittelt (Abb. 4.13). Diese MSC wiesen eine stark reduzierte Proliferation auf, was auf eine Relevanz des Kollagen I für MSC deutet. Bestätigt wurde dies durch die Arbeit von Popov *et al.*, in der gezeigt wurde, dass die Unterbrechung der Bindung an Kollagen I in einer reduzierten Zellzahl von MSC resultiert (Popov *et al.* 2011).

Bedingt durch diese gestörte Proliferation konnte weder eine Analyse hinsichtlich wichtiger Konsensus-Kriterien noch hinsichtlich der Funktion von MSC-sezerniertem Kollagen I bei der Wachstumsförderung von CRC-Xenograften *in vivo* durchgeführt werden. Aus der Literatur

ist jedoch bekannt, dass die Organisation der ECM innerhalb der Tumorarchitektur eine große Rolle in der Tumorprogression einnimmt (Maller *et al.* 2013). Tumore sind gekennzeichnet durch eine desmoplastische Reaktion, ein fibrotischer Status mit erhöhter Bildung und Modifizierung der umgebenen ECM (Lu *et al.* 2012). Des Weiteren wird der ECM in einem aktuellen Artikel eine Funktion bei der Realisierung der *hallmarks of cancer* zugesprochen: So beeinflusste die Komposition der ECM u.a. die Zellzyklusprogression, die Angiogenese sowie die Aktivierung von Invasion und Metastasierung von Tumorzellen (Übersicht in Pickup *et al.* 2014). Für das CRC ist zudem eine klinische Relevanz für Kollagen I beschrieben: In einer Studie wurde eine dynamische Expression in Abhängigkeit des Stadiums der Erkrankung beobachtet, wobei die höchste Kollagen I-Expression während der frühen Karzinogenese (Stadium I und II) vorlag (Zou *et al.* 2013). Die zugrunde liegenden Mechanismen von Kollagen I in der Tumorprogression werden in der Induktion von EMT vermutet (Kirkland 2009). Dafür spricht ein durch Kollagen I induzierter dedifferenzierter Phänotyp von Zellen an der invasiven Front des CRC sowie die höhere Kollagen I-Expression in metastasierenden gegenüber nicht metastasierenden CRC-Primärtumoren (Oku *et al.* 2008; Nyström *et al.* 2012). Die wechselseitigen Interaktionen hinsichtlich der ECM innerhalb des Tumorstromas konnte eine Studie mit Erkenntnissen über den Einfluss von Tumorzellen auf die stromale Produktion von ECM aufzeigen: Metastatische CRC-Zellen führten gegenüber nicht-metastatischen zur erhöhten Expression von Kollagenen in stromalen Fibroblasten (Basso *et al.* 2001). Dies bestätigt zum einen die Relevanz der in der vorliegenden Arbeit detektierten Interaktion über MSC-sezerniertes Kollagen I, zum anderen wird der komplexe *cross-talk* mit wechselseitiger Beeinflussung von Tumor- und Stromazellen deutlich.

5.4 Die Effekte der Interaktion zwischen MSC und α -Catenin-defizienten CRC-Zellen

5.4.1 Einfluss der Interaktion auf die Metastasierung α -Catenin-defizienter CRC-Zellen

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Identifizierung molekularer Mechanismen der Interaktion zwischen MSC und CRC-Zellen, die letztendlich zur MSC-vermittelten Wachstumsförderung *in vivo* führten. Da die Funktionalität der identifizierten Interaktionspartner spezifisch für die α -Catenin-defiziente CRC-Zelllinie HCT8 bestätigt werden konnte, wird im Folgenden diese Zelllinie fokussiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass durch die Interaktion mit MSC ein erhöhtes β 1-Integrin-abhängiges *scattering* der HCT8-Zellen vorlag (Abb. 4.26). Ein *scattering* von Zellen entspricht dem Zustand während Invasion und Metastasierung (Rooij *et al.* 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde a) das *scattering* von HCT8 auch durch konditioniertes Medium von MSC ausgelöst und b) MSC-sezerniertes Kollagen I als Interaktionspartner zwischen MSC und CRC-Zellen identifiziert. Daher wurde vermutet, dass MSC-sezerniertes Kollagen I zu einer β 1-Integrin-abhängigen EMT in HCT8 führte. Expressionsanalysen zeigten jedoch keinerlei Anhalt für eine MSC-induzierte, β 1-Integrin-abhängige EMT in HCT8 (Anhang Abb. A15). Andere Autoren konnten zeigen, dass eine EMT in CRC-Zellen durch

membranständiges TFG- β auf MSC ausgelöst werden kann (Mele *et al.* 2014). Das könnte bedeuten, dass für die Induktion von EMT ein direkter Zell-Zell-Kontakt erforderlich ist, und konditioniertes Medium, wie im Fall der vorliegenden Arbeit, dafür eventuell nicht hinreichend war. Aber auch die direkte Kokultivierung von CRC-Zellen mit MSC führte zu Beobachtungen, die einer EMT entgegenstehen: Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reduktion des C-terminalen Fragments (CTF) von E-Cadherin in CRC-Sphäroiden bei Präsenz von MSC detektiert (Abb. 4.14). Dies deutete auf einen reduzierten Abbau von E-Cadherin hin, was einer EMT widersprach. In einem Kooperationsprojekt der Arbeitsgruppe konnte in MSC-gemischten Sphäroiden im Mammakarzinom-Modell eine Erhöhung des CTF jedoch ohne weitere Hinweise auf eine EMT beobachtet werden (Dittmer *et al.* 2009). In diesem Modell ist allerdings bekannt, dass MSC eine EMT der Tumorzellen induzieren (Martin *et al.* 2010). Die Daten der vorliegenden Arbeit deuteten insgesamt darauf hin, dass die MSC-vermittelte Wachstumsförderung vermutlich nicht mit einer MSC-induzierten EMT in HCT8 einherging.

Da das Zell-*scattering* auch im Zusammenhang mit der Adhäsion stehen kann, wurde vermutet, dass das MSC-induzierte *scattering* in HCT8 Hinweise auf eine mögliche verstärkte Adhäsion während des metastatischen Absiedelns lieferte. In einem 2D-Adhäsionsassay konnte bestätigt werden, dass die Adhäsion der untersuchten CRC-Zelllinien an MSC spezifisch in der Linie HCT8 abhängig von β 1-Integrin war (Abb. 4.27). Integrine vermitteln durch die Bindung an Liganden u.a. die Organisation des Aktinzytoskeletts (Hynes 2002), wobei die intrazelluläre Anordnung von Aktin einen kritischen Schritt in der Adhäsion darstellt (Vicente-Manzanares *et al.* 2009). Da Catenine die Strukturierung des Aktinzytoskeletts über die Verbindung von Aktin an Cadherine vermitteln (Fuchs und Raghavan 2002), wurde aus Sicht der Autorin vermutet, dass in der α -Catenin-defizienten HCT8 diese Aktin-Strukturierung statt über Catenine über β 1-Integrin vermittelt und durch den knock-down von β 1-Integrin aufgehoben wurde. Im Sinne der Tumorprogression ist die Adhäsion z.B. in der metastatischen Absiedlung von Zellen relevant. In 5.2.1 und 5.2.3 wurde bereits die mögliche Rolle von MSC bei der Ausbildung prä-metastatischer Nischen diskutiert. In orientierenden Vorversuchen wurde die Relevanz der β 1-Integrin-abhängigen Adhäsion von HCT8 an MSC *in vivo* durch Metastasierungsversuche analysiert. Hierfür wurde der bekannte pulmonale Tropismus von MSC nach i.v. Applikation ausgenutzt (Luetzkendorf *et al.* 2010). Es wurde vermutet, dass MSC in den Lungen persistierten und eine prä-metastatische Nische ausbildeten, an die HCT8 β 1-Integrin-abhängig adhären und anwachsen konnten. Allerdings wurden in der vorliegenden Arbeit keine eindeutigen Hinweise auf ein β 1-Integrin-abhängiges MSC-vermitteltes metastatisches Wachstum von HCT8 identifiziert. Es handelte sich bei dieser Studie um einen orientierenden Versuch mit geringer Fallzahl und steht damit nicht im Widerspruch zur biologischen Relevanz der β 1-Integrin-abhängigen Adhäsion von CRC-Zellen an Matrices. Aus Arbeiten anderer Autoren ist bekannt, dass CRC-Zellen über β 1-Integrin an Endothelzellen adhären (Martín-Padura *et al.* 1994). Weiterhin ist beschrieben, dass ein β 1-Integrin blockierender Antikörper die Adhäsion von CRC-Zellen

an, durch operative Eingriffe verletztes, Peritoneum reduziert (Oosterling *et al.* 2008). Eine Beteiligung von MSC während dieser Adhäsion wäre aufgrund ihrer Funktion bei der Wundheilung denkbar.

5.4.2 Einfluss der Interaktion auf die Proliferation α -Catenin-defizienter CRC-Zellen

Weitere Untersuchungen hinsichtlich der molekularen Mechanismen der MSC-vermittelten Wachstumsförderung in HCT8 wurden anhand histologischer Analysen der CRC-Xenografte durchgeführt. Mittels msFI wurde ein Effekt der MSC bereits während einer frühen Phase des Xenograftwachstums beschrieben (Abb. 4.3), aufgrund der Wachstumseigenschaften von HCT8 *in vivo* konnte jedoch nicht genug Material für histologische Analysen früher Xenografte (d 7 – d 14 nach Injektion) gewonnen werden. Zwar konnten an d 25 nach Injektion kaum noch MSC im Xenograft nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), jedoch konnten höhere Anstiege im Wachstum der Volumina MSC-gemischter gegenüber ungemischter Xenografte bis zum Versuchsende ermittelt werden (Anhang Abb. A4). Daher wurde vermutet, dass sich der MSC-vermittelte Einfluss auf das Xenograftwachstum auch zu späteren Zeitpunkten manifestierte und in Xenograften an d 25 nach Injektion histologisch nachweisbar war.

Entsprechend dieser Vermutung konnte ein proliferationsfördernder Einfluss von MSC auf WT-Zellen der Linie HCT8 in Xenograften an d 25 nach s.c. Injektion beobachtet werden. Dieser Einfluss äußerte sich anhand einer MSC-vermittelten Erhöhung der Anzahl an Mitosen in Xenograften der Linie HCT8, nicht aber Colo320DM oder DLD1 (Abb. 4.28 und 4.29). Die immunhistochemische Färbung des Proliferationsmarkers Ki67 ergab hingegen keine Unterschiede in dessen Expression in MSC-gemischten gegenüber ungemischten Xenograften (Daten nicht gezeigt). Es ist beschrieben, dass ein positives Signal für Ki67 nicht in jedem Fall bedeutet, dass eine Zelle in die Teilung übergeht (Scholzen und Gerdes 2000). Ki67 ist – abgesehen von G0 – in jeder Phase des Zellzyklus nachweisbar, wobei die Expression nicht zwingend mit der aktiven Proliferation von Zellen korreliert: Da Zellen selbst nach einer kompletten S-Phase in die Quieszenz übergehen können, zeigt die Expression von Ki67 zwar das Potential, aber nicht die aktive Teilungsfähigkeit von Zellen an (Scholzen und Gerdes 2000). Die Analyse mitotischer Figuren in Geweben hingegen zeigt aktiv teilende Zellen an und ist somit aus Sicht der Autorin ein stabiler Marker zur Bestimmung der Proliferation von Zellen innerhalb eines Xenografts.

In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin beobachtet, dass der Effekt der MSC-vermittelten höheren Gewichte und Anstiege der Xenograftvolumina in $\beta 1$ -I kd HCT8 im Vergleich zu WT- und mock-HCT8 komplett aufgehoben war (Anhang Abb. A16). Einhergehend mit den o.g. Beobachtungen wurde vermutet, dass dies mit der Mitoserate in $\beta 1$ -I kd HCT8-Xenograften korrelierte. Es konnte bestätigt werden, dass die MSC-vermittelte erhöhte Mitoserate nach knock-down von $\beta 1$ -Integrin in HCT8 ebenfalls vollständig aufgehoben war (Abb. 4.28). Dies deutete auf eine $\beta 1$ -Integrin-abhängige MSC-vermittelte Proliferation α -Catenin-defizienter Zellen der Linie HCT8 *in vivo* hin. Dabei sollte jedoch beachtet werden, dass nicht in jedem

Fall eine Volumenzunahme im Zusammenhang mit der Proliferation steht. So haben z.B. Nekrosen sowie die Infiltration murinen Stromas einen fördernden Einfluss auf das Tumorzellvolumen. Im vorliegenden Fall konnte jedoch durch den Einsatz mehrerer Methoden (msFI, Xenograftvolumina, Xenograftgewichte, histologische Analysen) die Korrelation zwischen dem Xenograftvolumen und der Proliferation der Tumorzellen bestätigt werden.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen der histologischen Untersuchungen konnte *in vitro* weder durch die direkte Kultivierung mit MSC noch durch die Kultivierung mit konditioniertem Medium von MSC ein proliferativer Einfluss auf die untersuchten CRC-Zelllinien gefunden werden (Abb. 4.5 und 4.6). Ebenso konnte in diesen Kulturen keine MSC-vermittelte Aktivierung von FAK oder Akt, was Hinweise auf eine induzierte Proliferation liefern könnte, identifiziert werden (Anhang Abb. A5). Dies steht im Einklang zu Arbeiten anderer Autoren, in denen mit einem ähnlichen experimentellen Aufbau ebenfalls kein spezifischer Effekt von MSC auf die Proliferation von Tumorzellen beobachtet werden konnte (Shinagawa *et al.* 2010; Hombauer und Minguell 2000). Als Ursache kann in diesem Fall der artifizielle Charakter von *in vitro*-Analysen betrachtet werden. So konnte gezeigt werden, dass die Rigidität der ECM eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von Integrinen und FAK einnimmt (Du *et al.* 2011; Wei *et al.* 2008; Kocgozlu *et al.* 2010). Es ist fraglich, ob dieser optimale Bereich der ECM-Rigidität *in vitro* erreicht werden kann.

Aus Sicht der Autorin wurde vermutet, dass MSC *in vivo* als Stützgerüst für HCT8-Zellen agierten und den Aufbau einer Tumorarchitektur bewirkten. Dies könnte die funktionelle Grundlage der beschleunigten Proliferation der HCT8-Zellen und somit der MSC-vermittelten Wachstumsförderung der Xenografte dieser Linie darstellen. Es bleibt unklar, ob MSC dazu beitragen, dass eine per se proliferativ aktive Subpopulation von HCT8-Zellen β 1-Integrin-abhängig anwachsen, überleben und bis d 25 nach Injektion aktiv proliferieren. Alternativ ist denkbar, dass initial MSC-sezernierte Moleküle wie Kollagen I 25 d nach Injektion weiterhin aktiv die Proliferation der Tumorzellen beeinflussen können und die Präsenz der MSC bzw. deren direkter Kontakt zu den Tumorzellen nicht ausschlaggebend ist. Dass MSC auch ohne nachweisbare direkte Präsenz bestimmte Nischen für das Anwachsen von Tumorzellen *primen*, wurde bereits von anderen Autoren gezeigt (Medyouf *et al.* 2014).

Die mit der vorliegenden Arbeit identifizierte Tumor-Stroma-Interaktion zwischen MSC und CRC-exprimiertem β 1-Integrin und deren fördernder Einfluss auf die mitotische Aktivität in CRC-Xenograften steht im Einklang mit der klinischen Relevanz des mitotischen Gleichgewichts innerhalb des CRC: So ist bekannt, dass durch das Ungleichgewicht von Apoptose und Mitose die Wachstumsrate sessiler Adenome, aus denen sich Karzinome entwickeln können, erhöht ist (Endo *et al.* 2013). Integrin-abhängige Signalwege, z.B. über FAK, Akt und Erk oder über Mitglieder der GTPase-Familie nehmen dabei einen komplexen Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus (Übersicht in Moreno-Layseca und Streuli 2014). In experimentellen Arbeiten anderer Autoren wurde beschrieben, dass CRC-Zellen durch die

Überexpression von $\beta 1$ -Integrin über eine gesteigerte Proliferation verfügen. Diese war gekennzeichnet durch eine erhöhte Expression von Cyclin D1 (Förderung des Zellzyklus) und die verminderte Expression von p21 (Hemmung des Zellzyklus) (Song *et al.* 2014). Eine Arbeit zum Pankreaskarzinom-Modell konnte zeigen, dass Zellen mit einem knock-down von $\beta 1$ -Integrin einen deutlichen Arrest in der G 0/1 Phase des Zellzyklus aufweisen (Kren *et al.* 2007). Es ist weiterhin bekannt, dass aktivierte Integrine Wachstumsfaktor-Rezeptoren (z.B. EGFR) auch ohne Präsenz von Wachstumsfaktoren aktivieren und Zellen somit zur Proliferation anregen können (Yamada und Even-Ram 2002). Bei dieser Integrin-abhängigen Zellzyklusregulation nimmt die Beschaffenheit der ECM eine entscheidende Rolle ein. In Chondrozyten z.B. wird durch mechanischen Stress im Sinne der ECM-Rigidität die Proliferation über $\beta 1$ -Integrin ausgelöst (Ren *et al.* 2012). Diese Beobachtungen unterstreichen den Einfluss der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Interaktionen auf die Proliferation von Tumorzellen.

Auf Grundlage der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten konnte das in Abb. 5.1 dargestellte Modell zum molekularen Mechanismus der MSC-vermittelten Wachstumsförderung des CRC skizziert werden. MSC und CRC-Zellen treten über $\beta 1$ -Integrin, vermutlich mit MSC-sezerniertem Kollagen I als *linker*, in Interaktion. Diese Interaktion führt spezifisch in α -Catenin-defizienten CRC-Zellen der Linie HCT8 zum Aufbau einer funktionellen Tumorarchitektur und vermutlich damit verbunden zu einer Wachstumsförderung durch die Beschleunigung der Proliferation der Tumorzellen. Weitere CRC-Linien mit WT- α -Catenin, wie DLD1 und Colo320DM, werden ebenfalls durch MSC im Wachstum gefördert, jedoch scheinbar unabhängig von einer MSC-vermittelten Proliferationsförderung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde vermutet, dass diese Zellen neben der $\beta 1$ -Integrin-abhängigen Interaktion über andere, bislang ungeklärte kompensatorische und/oder additive Mechanismen durch MSC im Wachstum gefördert wurden.

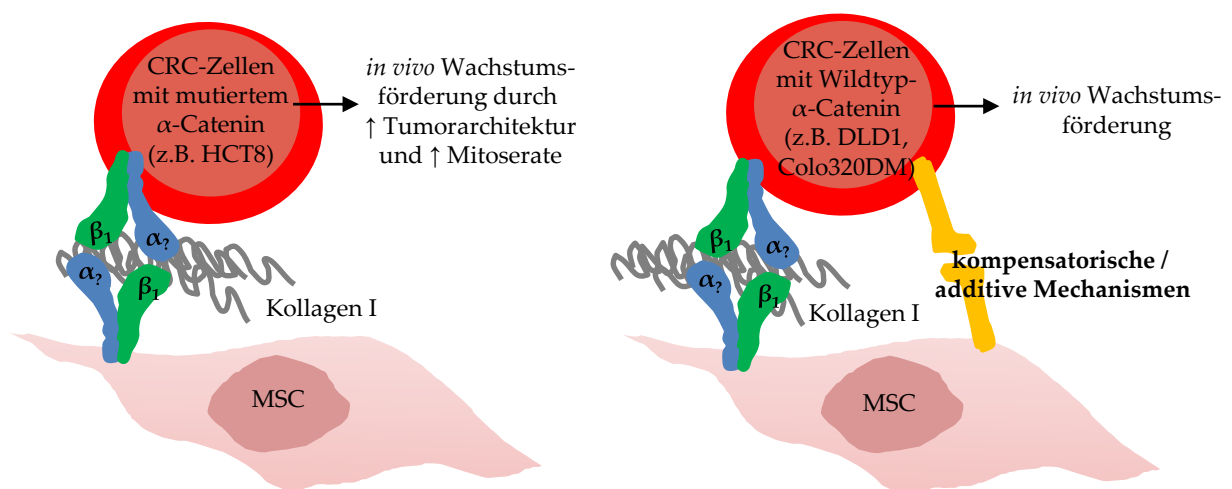


Abb. 5.1: Anhand der Daten der vorliegenden Arbeit erstelltes Schema des postulierten molekularen Mechanismus der MSC-vermittelten Wachstumsförderung in differentiellen CRC-Zelllinien.

5.5 Stellenwert der Arbeit/Methodische Aspekte

Mit der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine differentielle MSC-vermittelte Wachstumsförderung von Xenograften verschiedener CRC-Zelllinien gezeigt werden. Der gegenüber anderen Stromazellen spezifische Einfluss von MSC auf das Wachstum von CRC wurde dabei sowohl *in vitro* (mittels Sphäroidmodell) als auch *in vivo* mit drei unabhängigen Methoden (Xenograftgewichte, msFI und Xenograftvolumina) und in zwei unterschiedlichen Mausmodellen (Nackt- und NOG-Maus) nachgewiesen. Zu beachten ist allerdings, dass es sich beim gewählten s.c. Xenograft um ein artifizielles Modell handelt. Für weiterführende Analysen sollten orthotope Modelle gewählt werden.

Für die Identifizierung der Interaktionspartner zwischen MSC und CRC-Zellen wurden *in vitro*-3D-Kulturen unter Verwendung blockierender Antikörper, aber auch stabiler shRNA-vermittelter knock-downs, eingesetzt. Trotz der im Gegensatz zur Monolayerkultur besseren Vergleichbarkeit zum *in vivo*-Zustand bleiben 3D-Kulturen artifizielle *in vitro*-Modelle. Auch wenn andere Autoren die Fähigkeit zur Sphäroidbildung als prädiktiven Marker für eine Tumorigenität *in vivo* ansehen (Sodek *et al.* 2009), wurde in der vorliegenden Arbeit darauf Wert gelegt, alle *in vitro* gefundenen Aspekte *in vivo* zu verifizieren. Aufgrund der erschwerten Handhabung von shRNA-behandelten MSC und der vermuteten Komplexität des Einflusses von MSC auf das Xenograftwachstum von CRC konnte die exakte Rolle von MSC-exprimiertem *Kollagen I $\alpha 1$* und *$\beta 1$ -Integrin* bei der Tumor-Stroma-Interaktion im CRC-Modell mit der vorliegenden Arbeit nicht vollständig geklärt werden.

Im vorliegenden Modell konnte am Beispiel der α -Catenin-defizienten CRC-Zelllinie HCT8 ein zugrunde liegender, $\beta 1$ -Integrin-abhängiger molekularer Mechanismus der MSC-vermittelten Wachstumsförderung aufgeklärt werden. Der Mechanismus der Wachstumsförderung der anderen untersuchten CRC-Zelllinien blieb im Rahmen der vorliegenden Arbeit ungeklärt. Zwar wurden alle untersuchten CRC-Linien durch Stroma im Wachstum gefördert, doch scheinen die zu Grunde liegenden Mechanismen unterschiedlicher Natur zu sein. Diese Zelllinienspezifität entspricht der Heterogenität des CRC im humanen Organismus und deutet auf differentielle, vom Mutationshintergrund der Tumorzellen abhängige, Tumor-Stroma-Interaktionen bei der Tumorprogression hin. Um diese als effizientes Therapieziel zu nutzen, ist eine individualisierte/ zelllinienspezifische Analyse dieser Interaktionen unabdingbar. Da die physiologische Relevanz der Tumor-Stroma-Interaktionen innerhalb der vorliegenden Arbeit nicht vollständig geklärt werden konnte, ist eine Fortführung des Projekts zum weiteren Verständnis der Tumor-Stroma-Interaktionen im CRC und deren Einsatz in der personalisierten Tumorthherapie aus Sicht der Autorin sehr vielversprechend (siehe 7.).

6. ZUSAMMENFASSUNG

Mit der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein differentielles CRC-Zelllinienmodell hinsichtlich der E-Cadherin-Funktionalität beschrieben, in dem β 1-Integrin-abhängige Interaktionen mit Tumor-integrierten MSC existieren und zur Förderung des Xenograftwachstums spezifischer CRC-Zellen führte:

In vivo wurde ein fördernder Effekt von MSC auf das Xenograftwachstum aller untersuchten CRC-Zellen beschrieben, wobei sich das Ausmaß der MSC-vermittelten Wachstumsförderung prominent in CRC-Zellen mit dysfunktionalem E-Cadherin-System äußerte. Dieser fördernde Einfluss von MSC auf das Xenograftwachstum von CRC war spezifisch gegenüber dem anderer Stromazellen und konnte nicht ausschließlich durch das immunregulatorische Potential von MSC erklärt werden.

Die Daten der vorliegenden Arbeit lassen weiterhin vermuten, dass MSC eine Funktion während einer frühen Phase des Xenograftwachstums E-Cadherin-dysfunktionaler CRC-Zellen einnehmen: Es scheint, dass MSC in diesen CRC-Zellen den Aufbau einer Xenograftarchitektur förderten, wodurch das Anwachsen der Xenografte beschleunigt wurde. Erneut konnte gezeigt werden, dass sich dieser Einfluss von MSC während der frühen Phase des Xenograftwachstums spezifisch gegenüber anderen Stromazellen ausprägte.

Es wurde gezeigt, dass MSC und E-Cadherin-dysfunktionale CRC-Zellen jeweils über β 1-Integrin, vermutlich mit MSC-sezerniertem Kollagen I als *linker*, interagierten und damit die Sphäroidbildung – im Sinne der Xenograftarchitektur – vermittelten.

Die Interaktion von MSC und CRC über CRC-exprimiertes *β 1-Integrin* führte spezifisch in der α -Catenin-defizienten CRC-Zelllinie HCT8 zur MSC-vermittelten Wachstumsförderung *in vivo*. Dabei konnte gezeigt werden, dass MSC in Abhängigkeit von β 1-Integrin in HCT8 deren Proliferation förderten. Dieser β 1-Integrin-abhängige Mechanismus konnte in anderen analysierten CRC-Zelllinien nicht beobachtet werden, sodass hier additive/kompensatorische Mechanismen vermutet werden.

Die zelllinienspezifische Ausprägung der mit der vorliegenden Arbeit identifizierten Tumor-Stroma-Interaktion verdeutlicht neben der komplexen Beteiligung des Stromas in der Tumorprogression die Heterogenität des CRC. Auch wenn die Relevanz der identifizierten Interaktionen des CRC unter physiologischen Bedingungen nicht abschließend geklärt werden konnte, trägt die vorliegende Arbeit maßgeblich zum Verständnis der Tumorbiologie des CRC bei.

7. AUSBLICK

Im Fokus weiterer Arbeiten würde zunächst der Nachweis der klinischen Relevanz der β 1-Integrin-abhängigen MSC-vermittelten Wachstumsförderung α -Catenin-defizienter CRC-Zellen stehen. Hierbei wäre der Nachweis der Interaktion im orthotopen Modell und in Patientenproben wichtig. Zur Eingrenzung der relevanten Phase der Tumor-Stroma-Interaktion wären ein konditionelles System zur induzierbaren Expression der Interaktionspartner sowie histologische Analysen von Patientenproben unterschiedlicher Erkrankungsstadien hilfreich.

In weiteren Schritten könnten die Mechanismen der MSC-vermittelten Wachstumsförderung anderer CRC-Zelllinien, z.B. DLD1 und Colo320DM, geklärt werden. In beiden Zelllinien lag kein MSC-vermittelter Einfluss auf die Proliferation der Tumorzellen in Xenograften an d 25 nach Injektion vor. Es wäre denkbar, dass MSC in diesen Zelllinien ausschließlich die Proliferation in frühen Phasen oder aber andere Prozesse der Tumorprogression stimulieren, z.B. EMT oder Angiogenese. Hier sollte auch der Zusammenhang anderer für das CRC bekannter Mutationen (siehe 5.2.1) bei der Analyse von Tumor-Stroma-Interaktionen berücksichtigt werden. Im Mammakarzinom-Modell wurde z.B. festgestellt, dass der Verlust von β 1-Integrin mit einer Überexpression von EGFR verbunden ist (Chrenek *et al.* 2001). Weiterhin wurde bereits die aktivierende Eigenschaft von β 1-Integrin auf EGFR aufgezeigt (Yamada und Even-Ram 2002). Welche Auswirkung könnte z.B. die Tumor-Stroma-Interaktion über β 1-Integrin zusätzlich auf das EGFR-*signaling* in CRC-Zellen mit unterschiedlichen KRAS-Mutationsstatus nehmen?

In einem weiteren Ziel könnte die Frage nach dem therapeutischen Nutzen der identifizierten Interaktion geklärt werden. Könnte man mittels systemisch applizierter, blockierender Antikörper die Tumor-Stroma-Interaktionen in α -Catenin-defizienten CRC aufheben und somit das Wachstum inhibieren? Derzeit befindet sich ein humanisierter monoklonaler β 1-Integrin-blockierender Antikörper gegen rezidivierende Glioblastome in der prä-klinischen Testung (OS2966; OncoSynergy Inc., San Francisco, US). Für das CRC müssten zunächst orthotope Modelle etabliert werden, um zu testen, wie ein Antikörper bestmöglich intratumoral verabreicht werden kann, z.B. über vernetzte Antikörper, die gezielt Tumorstrukturen angreifen.

Die vorliegende Arbeit liefert neue Erkenntnisse zu wechselseitigen Tumor-Stroma-Interaktionen im CRC. Dass sich viele neue Fragen eröffnen, unterstreicht deren Komplexität, wobei die Heterogenität der Tumorzellen eine enorme Relevanz hat. Es konnte gezeigt werden, dass ein Unterbrechen der Interaktion zwischen α -Catenin-defizienten Tumorzellen und dem umliegendem Stroma den wachstumsfördernden Einfluss des Stromas inhibieren kann. In Patientenproben könnte die personalisierte Untersuchung des Mutationsprofils des Tumors und der damit verbundenen Tumor-Stroma-Interaktionen die Möglichkeit auf eine gezielte Therapie zur effizienten Behandlung von CRC bieten. Eine Fortsetzung des Projekts zur weiteren Analyse von Tumor-Stroma-Interaktionen in Abhängigkeit des Mutationsstatus der Tumorzellen wäre daher sehr nützlich.

8. LITERATUR

- Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknæs M, Hektoen M, Lind GE, Lothe RA (2013) Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *ONCOGENESIS* 2:e71.
- Allinen M, Beroukhi R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, Porter D, Hu M, Chin L, Richardson A, Schnitt S, Sellers WR, Polyak K (2004) Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *CANCER CELL* 6:17–32.
- Alonso A, Citoler P (1971) Wirkung von Cycloheximid auf den Eiweiss-Stoffwechsel der durch Diäthylnitrosamin cancerisierten Leber. *ZEITSCHRIFT FÜR KREBSFORSCHUNG* 75:255–261.
- Angeli F, Koumakis G, Chen M, Kumar S, Delinassios JG (2009) Role of stromal fibroblasts in cancer: promoting or impeding? *TUMOUR BIOLOGY : THE JOURNAL OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR ONCODEVELOPMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE* 30:109–120.
- Angelucci C, Maulucci G, Lama G, Proietti G, Colabianchi A, Papi M, Maiorana A, Spirito M de, Micera A, Balzamino OB, Di Leone A, Masetti R, Sica G (2012) Epithelial-stromal interactions in human breast cancer: effects on adhesion, plasma membrane fluidity and migration speed and directness. *PLOS ONE* 7:e50804.
- Aurich I, Mueller LP, Aurich H, Luetzkendorf J, Tisljar K, Dollinger MM, Schormann W, Walldorf J, Hengstler JG, Fleig WE, Christ B (2007) Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *GUT* 56:405–415.
- Avital I, Moreira AL, Klimstra DS, Leversha M, Papadopoulos EB, Brennan M, Downey RJ (2007) Donor-derived human bone marrow cells contribute to solid organ cancers developing after bone marrow transplantation. *STEM CELLS (DAYTON, OHIO)* 25:2903–2909.
- Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA (2008) Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *NATURE REVIEWS. CANCER* 8:604–617.
- Bacac M, Stamenkovic I (2008) Metastatic cancer cell. *ANNUAL REVIEW OF PATHOLOGY* 3:221–247.
- Bae S, Ahn JH, Park CW, Son HK, Kim K, Lim N, Jeon C, Kim H (2009) Gene and microRNA expression signatures of human mesenchymal stromal cells in comparison to fibroblasts. *CELL AND TISSUE RESEARCH* 335:565–573.
- Basso D, Mazza S, Greco E, Belluco C, Roveroni G, Navaglia F, Nitti D, Lise M, Plebani M (2001) Metastatic colorectal cancer stimulates collagen synthesis by fibroblasts. *ANTICANCER RESEARCH* 21:2665–2670.
- Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I (2004) Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *STEM CELLS (DAYTON, OHIO)* 22:675–682.
- Beckermann BM, Kallifatidis G, Groth A, Frommhold D, Apel A, Mattern J, Salnikov AV, Moldenhauer G, Wagner W, Diehlmann A, Saffrich R, Schubert M, Ho AD, Giese N, Büchler MW, Friess H, Büchler P, Herr I (2008) VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. *BRITISH JOURNAL OF CANCER* 99:622–631.
- Benjamin JM, Nelson WJ (2008) Bench to bedside and back again: molecular mechanisms of alpha-catenin function and roles in tumorigenesis. *SEMINARS IN CANCER BIOLOGY* 18:53–64.
- Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL (2004) Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *NATURE* 432:332–337.
- Blok P, Craanen ME, Dekker W, Tytgat GN (1999) Loss of E-cadherin expression in early gastric cancer. *HISTOPATHOLOGY* 34:410–415.
- Boeck A de, Pauwels P, Hensen K, Rummens J, Westbroek W, Hendrix A, Maynard D, Denys H, Lambein K, Braems G, Gespach C, Bracke M, Wever O de (2013) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through paracrine neuregulin 1/HER3 signalling. *GUT* 62:550–560.
- Boland CR, Goel A (2010) Microsatellite instability in colorectal cancer. *GASTROENTEROLOGY* 138:2073-2087.e3.

- Böyum A (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. SCANDINAVIAN JOURNAL OF CLINICAL AND LABORATORY INVESTIGATION. SUPPLEMENTUM 97:77–89.
- Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T (2005) Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. NATURE REVIEWS. CANCER 5:744–749.
- Brenner H, Kloor M, Pox CP (2014) Colorectal cancer. THE LANCET 383:1490–1502.
- Buck E, Eyzaguirre A, Barr S, Thompson S, Sennello R, Young D, Iwata KK, Gibson NW, Cagnoni P, Haley JD (2007) Loss of homotypic cell adhesion by epithelial-mesenchymal transition or mutation limits sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition. MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS 6:532–541.
- Cammarota R, Bertolini V, Pennesi G, Bucci EO, Gottardi O, Garlanda C, Laghi L, Barberis MC, Sessa F, Noonan DM, Albini A (2010) The tumor microenvironment of colorectal cancer: stromal TLR-4 expression as a potential prognostic marker. JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE 8:112.
- Caplan AI (1991) Mesenchymal stem cells. JOURNAL OF ORTHOPAEDIC RESEARCH : OFFICIAL PUBLICATION OF THE ORTHOPAEDIC RESEARCH SOCIETY 9:641–650.
- Caplan AI, Dennis JE (2006) Mesenchymal stem cells as trophic mediators. JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY 98:1076–1084.
- Carmeliet P, Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. NATURE 407:249–257.
- Casey RC, Burleson KM, Skubitz KM, Pambuccian SE, Oegema TR, Ruff LE, Skubitz AP (2001) Beta 1-integrins regulate the formation and adhesion of ovarian carcinoma multicellular spheroids. THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY 159:2071–2080.
- Caysa H, Hoffmann S, Luetzkendorf J, Mueller LP, Unverzagt S, Mäder K, Mueller T (2012) Monitoring of xenograft tumor growth and response to chemotherapy by non-invasive in vivo multispectral fluorescence imaging. PLOS ONE 7:e47927.
- Chen C, Okayama H (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY 7:2745–2752.
- Chen C, Wang S, Liu C, Wu Y, Wang W, Huang J, Hung J, Lai I, Liang J, Huang M (2014) β -1,4-Galactosyltransferase III suppresses β 1 integrin-mediated invasive phenotypes and negatively correlates with metastasis in colorectal cancer. CARCINOGENESIS 35:1258–1266.
- Chrenek MA, Wong P, Weaver VM (2001) Tumour-stromal interactions. Integrins and cell adhesions as modulators of mammary cell survival and transformation. BREAST CANCER RESEARCH : BCR 3:224–229.
- Cogle CR, Theise ND, Fu D, Ucar D, Lee S, Guthrie SM, Lonergan J, Rybka W, Krause DS, Scott EW (2007) Bone marrow contributes to epithelial cancers in mice and humans as developmental mimicry. STEM CELLS (DAYTON, OHIO) 25:1881–1887.
- Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschuere K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy F (2001) The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. MOLECULAR CELL 7:1267–1278.
- Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng P, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badyrak S, Buhring H, Giacobino J, Lazzari L, Huard J, Péault B (2008) A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. CELL STEM CELL 3:301–313.
- Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A (2014) Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. CLINICAL, COSMETIC AND INVESTIGATIONAL DERMATOLOGY 7:301–311.
- DGHO-Leitlinie Kolonkarzinom, www.dgho-onkopedia.de, Datum des Zugriffs: 13.01.2015
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM (2002) Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. BLOOD 99:3838–3843.

- Direkze NC, Forbes SJ, Brittan M, Hunt T, Jeffery R, Preston SL, Poulson R, Hodivala-Dilke K, Alison MR, Wright NA (2003) Multiple organ engraftment by bone-marrow-derived myofibroblasts and fibroblasts in bone-marrow-transplanted mice. *STEM CELLS (DAYTON, OHIO)* 21:514–520.
- Direkze NC, Hodivala-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulson R, Oukrif D, Alison MR, Wright NA (2004) Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *CANCER RESEARCH* 64:8492–8495.
- Dittmer A, Hohlfeld K, Lützkendorf J, Müller LP, Dittmer J (2009) Human mesenchymal stem cells induce E-cadherin degradation in breast carcinoma spheroids by activating ADAM10. *CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES : CMLS* 66:3053–3065.
- Djouad F, Bony C, Apparailly F, Louis-Plence P, Jorgensen C, Noël D (2006) Earlier onset of syngeneic tumors in the presence of mesenchymal stem cells. *TRANSPLANTATION* 82:1060–1066.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *CYTOTHERAPY* 8:315–317.
- Du J, Chen X, Liang X, Zhang G, Xu J, He L, Zhan Q, Feng X, Chien S, Yang C (2011) Integrin activation and internalization on soft ECM as a mechanism of induction of stem cell differentiation by ECM elasticity. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 108:9466–9471.
- Duband JL, Dufour S, Hatta K, Takeichi M, Edelman GM, Thiery JP (1987) Adhesion molecules during somitogenesis in the avian embryo. *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY* 104:1361–1374.
- DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* 7:379–387.
- Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L (1998) A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *JOURNAL OF VIROLOGY* 72:8463–8471.
- Dvorak HF (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE* 315:1650–1659.
- Endo A, Koizumi H, Takahashi M, Tamura T, Tatsunami S, Watanabe Y, Takagi M (2013) A significant imbalance in mitosis versus apoptosis accelerates the growth rate of sessile serrated adenoma/polyps. *VIRCHOWS ARCHIV : AN INTERNATIONAL JOURNAL OF PATHOLOGY* 462:131–139.
- Enns A, Gassmann P, Schlüter K, Korb T, Spiegel H, Senninger N, Haier J (2004) Integrins can directly mediate metastatic tumor cell adhesion within the liver sinusoids. *JOURNAL OF GASTROINTESTINAL SURGERY : OFFICIAL JOURNAL OF THE SOCIETY FOR SURGERY OF THE ALIMENTARY TRACT* 8:1049-59; discussion 1060.
- Fearon ER (2011) Molecular genetics of colorectal cancer. *ANNUAL REVIEW OF PATHOLOGY* 6:479–507.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2014) Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER. JOURNAL INTERNATIONAL DU CANCER.*
- Folkman J (2003) Angiogenesis and apoptosis. *SEMINARS IN CANCER BIOLOGY* 13:159–167.
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *CELL AND TISSUE KINETICS* 3:393–403.
- Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart LA (2007 a) Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge? *INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION BIOLOGY* 83:849–871.
- Friedrich J, Eder W, Castaneda J, Doss M, Huber E, Ebner R, Kunz-Schughart LA (2007 b) A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the acid phosphatase assay. *JOURNAL OF BIOMOLECULAR SCREENING* 12:925–937.
- Fuchs E, Raghavan S (2002) Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *NATURE REVIEWS. GENETICS* 3:199–209.
- Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, Selig M, Nielsen G, Taksir T, Jain RK, Seed B (1998) Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *CELL* 94:715–725.

- Garin-Chesa P, Old LJ, Rettig WJ (1990) Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 87:7235–7239.
- Ghosh S, Spagnoli GC, Martin I, Ploegert S, Demougin P, Heberer M, Reschner A (2005) Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: a high density oligonucleotide array study. *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY* 204:522–531.
- Goessler UR, Bieback K, Bugert P, Heller T, Sadick H, Hörmann K, Riedel F (2006) In vitro analysis of integrin expression during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and chondrocytes upon dedifferentiation in cell culture. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE* 17:301–307.
- Goessler UR, Bugert P, Bieback K, Stern-Straeter J, Bran G, Hörmann K, Riedel F (2008) Integrin expression in stem cells from bone marrow and adipose tissue during chondrogenic differentiation. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE* 21:271–279.
- Gofuku J, Shiozaki H, Tsujinaka T, Inoue M, Tamura S, Doki Y, Matsui S, Tsukita S, Kikkawa N, Monden M (1999) Expression of E-cadherin and alpha-catenin in patients with colorectal carcinoma. Correlation with cancer invasion and metastasis. *AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY* 111:29–37.
- Grzesiak JJ, Tran Cao, Hop S, Burton DW, Kaushal S, Vargas F, Clopton P, Snyder CS, Deftos LJ, Hoffman RM, Bouvet M (2011) Knockdown of the $\beta(1)$ integrin subunit reduces primary tumor growth and inhibits pancreatic cancer metastasis. *INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER. JOURNAL INTERNATIONAL DU CANCER* 129:2905–2915.
- Hamburger AW, Salmon SE (1977) Primary bioassay of human tumor stem cells. *SCIENCE (NEW YORK, N.Y.)* 197:461–463.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The Hallmarks of Cancer. *CELL* 100:57–70.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *CELL* 144:646–674.
- Hannus M, Beitzinger M, Engelmann JC, Weickert M, Spang R, Hannus S, Meister G (2014) siPools: highly complex but accurately defined siRNA pools eliminate off-target effects. *NUCLEIC ACIDS RESEARCH* 42:8049–8061.
- Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R (2011) Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *CELL COMMUNICATION AND SIGNALING : CCS* 9:12.
- Hermiston ML, Gordon JI (1995) Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *SCIENCE (NEW YORK, N.Y.)* 270:1203–1207.
- Heuberger J, Birchmeier W (2010) Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *COLD SPRING HARBOR PERSPECTIVES IN BIOLOGY* 2:a002915.
- Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, Akashi-Takamura S, Ishibashi S, Miyake K, Shibuya M, Akira S, Aburatani H, Maru Y (2008) The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *NATURE CELL BIOLOGY* 10:1349–1355.
- Hogan NM, Joyce MR, Murphy JM, Barry FP, O'Brien T, Kerin MJ, Dwyer RM (2013) Impact of mesenchymal stem cell secreted PAI-1 on colon cancer cell migration and proliferation. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* 435:574–579.
- Hombauer H, Minguell JJ (2000) Selective interactions between epithelial tumour cells and bone marrow mesenchymal stem cells. *BRITISH JOURNAL OF CANCER* 82:1290–1296.
- Howe GA, Addison CL (2012) $\beta 1$ integrin: an emerging player in the modulation of tumorigenesis and response to therapy. *CELL ADHESION & MIGRATION* 6:71–77.
- Hynes RO (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *CELL* 110:673–687.
- Ishii G, Sangai T, Oda T, Aoyagi Y, Hasebe T, Kanomata N, Endoh Y, Okumura C, Okuhara Y, Magae J, Emura M, Ochiya T, Ochiai A (2003) Bone-marrow-derived myofibroblasts contribute to the cancer-induced stromal reaction. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* 309:232–240.

- Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, Heike T, Nakahata T (2002) NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *BLOOD* 100:3175–3182.
- Ivascu A, Kubbies M (2007) Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY* 31:1403–1413.
- Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW (2010) Hereditary and familial colon cancer. *GASTROENTEROLOGY* 138:2044–2058.
- Jass JR (2007) Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *HISTOPATHOLOGY* 50:113–130.
- Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, Song HY, Kim YM, Cho M, Suh D, Yoon M, Chang CL, Jung JS, Kim JH (2008) Cancer-Derived Lysophosphatidic Acid Stimulates Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells to Myofibroblast-Like Cells. *STEM CELLS* 26:789–797.
- Jiang X, Zhang Y, Liu B, Zhang S, Wu Y, Yu X, Mao N (2005) Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *BLOOD* 105:4120–4126.
- Jin H, Aiyer A, Su J, Borgstrom P, Stupack D, Friedlander M, Varner J (2006 b) A homing mechanism for bone marrow-derived progenitor cell recruitment to the neovasculature. *THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION* 116:652–662.
- Jin H, Su J, Garmy-Susini B, Kleeman J, Varner J (2006 a) Integrin alpha4beta1 promotes monocyte trafficking and angiogenesis in tumors. *CANCER RESEARCH* 66:2146–2152.
- Jing Y, Han Z, Liu Y, Sun K, Zhang S, Jiang G, Li R, Gao L, Zhao X, Wu D, Cai X, Wu M, Wei L (2012) Mesenchymal stem cells in inflammation microenvironment accelerates hepatocellular carcinoma metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition. *PLOS ONE* 7:e43272.
- Joyce JA, Pollard JW (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *NATURE REVIEWS. CANCER* 9:239–252.
- Juneja HS, Schmalsteig FC, Lee S, Chen J (1993) Vascular cell adhesion molecule-1 and VLA-4 are obligatory adhesion proteins in the heterotypic adherence between human leukemia/lymphoma cells and marrow stromal cells. *EXPERIMENTAL HEMATOLOGY* 21:444–450.
- Jung Y, Kim JK, Shiozawa Y, Wang J, Mishra A, Joseph J, Berry JE, McGee S, Lee E, Sun H, Wang J, Jin T, Zhang H, Dai J, Krebsbach PH, Keller ET, Pienta KJ, Taichman RS (2013) Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis. *NATURE COMMUNICATIONS* 4:1795.
- Kalluri R, Zeisberg M (2006) Fibroblasts in cancer. *NATURE REVIEWS. CANCER* 6:392–401.
- Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D (2005) VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *NATURE* 438:820–827.
- Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA (2007) Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *NATURE* 449:557–563.
- Kato H, Liao Z, Mitsios JV, Wang H, Deryugina EI, Varner JA, Quigley JP, Shattil SJ (2012) The primacy of β 1 integrin activation in the metastatic cascade. *PLOS ONE* 7:e46576.
- Katsuno T, Ochi M, Tominaga K, Tanaka F, Sogawa M, Tanigawa T, Yamagami H, Shiba M, Watanabe K, Watanabe T, Fujiwara Y, Arakawa T (2013) Mesenchymal stem cells administered in the early phase of tumorigenesis inhibit colorectal tumor development in rats. *JOURNAL OF CLINICAL BIOCHEMISTRY AND NUTRITION* 53:170–175.

- Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, Rovira II, Nguyen AT, Malide D, Combs CA, Hall G, Zhang J, Raffeld M, Rogers TB, Stetler-Stevenson W, Frank JA, Reitz M, Finkel T (2006) Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE* 203:1235–1247.
- Kinzler KW, Vogelstein B (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *CELL* 87:159–170.
- Kirkland SC, Ying H (2008) Alpha2beta1 integrin regulates lineage commitment in multipotent human colorectal cancer cells. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 283:27612–27619.
- Kirkland SC (2009) Type I collagen inhibits differentiation and promotes a stem cell-like phenotype in human colorectal carcinoma cells. *BRITISH JOURNAL OF CANCER* 101:320–326.
- Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F (2011) Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *STEM CELLS (DAYTON, OHIO)* 29:11–19.
- Kocgozlu L, Lavallo P, Koenig G, Senger B, Haikel Y, Schaaf P, Voegel J, Tenenbaum H, Vautier D (2010) Selective and uncoupled role of substrate elasticity in the regulation of replication and transcription in epithelial cells. *JOURNAL OF CELL SCIENCE* 123:29–39.
- Komarova S, Kawakami Y, Stoff-Khalili MA, Curiel DT, Pereboeva L (2006) Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS* 5:755–766.
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG (1999) Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 96:10711–10716.
- Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC, Fine A (2001) Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *DEVELOPMENT (CAMBRIDGE, ENGLAND)* 128:5181–5188.
- Kren A, Baeriswyl V, Lehembre F, Wunderlin C, Strittmatter K, Antoniadis H, Fässler R, Cavallaro U, Christofori G (2007) Increased tumor cell dissemination and cellular senescence in the absence of beta1-integrin function. *THE EMBO JOURNAL* 26:2832–2842.
- Kucerova L, Altanerova V, Matuskova M, Tyciakova S, Altaner C (2007) Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy. *CANCER RESEARCH* 67:6304–6313.
- Kunz-Schughart LA (1999) Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and in vivo tumor. *CELL BIOLOGY INTERNATIONAL* 23:157–161.
- Kuphal F, Behrens J (2006) E-cadherin modulates Wnt-dependent transcription in colorectal cancer cells but does not alter Wnt-independent gene expression in fibroblasts. *EXPERIMENTAL CELL RESEARCH* 312:457–467.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *NATURE* 227:680–685.
- Landry J, Freyer JP, Sutherland RM (1982) A model for the growth of multicellular spheroids. *CELL AND TISSUE KINETICS* 15:585–594.
- Lazard D, Sastre X, Frid MG, Glukhova MA, Thierry JP, Kotliansky VE (1993) Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 90:999–1003.
- Le Blanc K, Rasmuson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O (2004) Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *LANCET* 363:1439–1441.
- LeBedis C, Chen K, Fallavollita L, Boutros T, Brodt P (2002) Peripheral lymph node stromal cells can promote growth and tumorigenicity of breast carcinoma cells through the release of IGF-I and EGF. *INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER. JOURNAL INTERNATIONAL DU CANCER* 100:2–8.

- Lessan K, Aguiar DJ, Oegema T, Siebenson L, Skubitz AP (1999) CD44 and beta1 integrin mediate ovarian carcinoma cell adhesion to peritoneal mesothelial cells. *THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY* 154:1525–1537.
- Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, Fong, Sheri F T, Csiszar K, Giaccia A, Weninger W, Yamauchi M, Gasser DL, Weaver VM (2009) Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *CELL* 139:891–906.
- Lin J, Wang J, Chen M, Chen H, Chang T, Su B, Chang P (2013) Colon cancer mesenchymal stem cells modulate the tumorigenicity of colon cancer through interleukin 6. *EXPERIMENTAL CELL RESEARCH* 319:2216–2229.
- Liotta LA, Kohn EC (2001) The microenvironment of the tumour-host interface. *NATURE* 411:375–379.
- Logan CY, Nusse R (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *ANNUAL REVIEW OF CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY* 20:781–810.
- Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D (2002) Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *SCIENCE (NEW YORK, N.Y.)* 295:868–872.
- Lu P, Weaver VM, Werb Z (2012) The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY* 196:395–406.
- Luetzkendorf J, Mueller LP, Mueller T, Caysa H, Nerger K, Schmoll H (2010) Growth inhibition of colorectal carcinoma by lentiviral TRAIL-transgenic human mesenchymal stem cells requires their substantial intratumoral presence. *JOURNAL OF CELLULAR AND MOLECULAR MEDICINE* 14:2292–2304.
- Maller O, Hansen KC, Lyons TR, Acerbi I, Weaver VM, Prekeris R, Tan A, Schedin P (2013) Collagen architecture in pregnancy-induced protection from breast cancer. *JOURNAL OF CELL SCIENCE* 126:4108–4110.
- Margadant C, Sonnenberg A (2010) Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO REPORTS* 11:97–105.
- Martin FT, Dwyer RM, Kelly J, Khan S, Murphy JM, Curran C, Miller N, Hennessy E, Dockery P, Barry FP, O'Brien T, Kerin MJ (2010) Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumour microenvironment: stimulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT). *BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT* 124:317–326.
- Martin-Padura I, Bazzoni G, Zanetti A, Bernasconi S, Elices MJ, Mantovani A, Dejana E (1994) A novel mechanism of colon carcinoma cell adhesion to the endothelium triggered by beta 1 integrin chain. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 269:6124–6132.
- McLean GW, Komiyama NH, Serrels B, Asano H, Reynolds L, Conti F, Hodivala-Dilke K, Metzger D, Chambon P, Grant, Seth G N, Frame MC (2004) Specific deletion of focal adhesion kinase suppresses tumor formation and blocks malignant progression. *GENES & DEVELOPMENT* 18:2998–3003.
- McLean MH, Murray GI, Stewart KN, Norrie G, Mayer C, Hold GL, Thomson J, Fyfe N, Hope M, Mowat, N Ashley G, Drew JE, El-Omar EM (2011) The inflammatory microenvironment in colorectal neoplasia. *PLOS ONE* 6:e15366.
- Medyouf H, Mossner M, Jann J, Nolte F, Raffen S, Herrmann C, Lier A, Eisen C, Nowak V, Zens B, Müdder K, Klein C, Obländer J, Fey S, Vogler J, Fabarius A, Riedl E, Roehl H, Kohlmann A, Staller M, Haferlach C, Müller N, John T, Platzbecker U, Metzgeroth G, Hofmann W, Trumpp A, Nowak D (2014) Myelodysplastic cells in patients reprogram mesenchymal stromal cells to establish a transplantable stem cell niche disease unit. *CELL STEM CELL* 14:824–837.
- Mele V, Muraro MG, Calabrese D, Pfaff D, Amatruda N, Amicarella F, Kvinlaug B, Bocelli-Tyndall C, Martin I, Resink TJ, Heberer M, Oertli D, Terracciano L, Spagnoli GC, Iezzi G (2014) Mesenchymal stromal cells induce epithelial-to-mesenchymal transition in human colorectal cancer cells through the expression of surface-bound TGF- β . *INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER. JOURNAL INTERNATIONAL DU CANCER* 134:2583–2594.

- Mesker WE, Junggeburt, Jan M C, Szuhai K, Heer P de, Morreau H, Tanke HJ, Tollenaar, Rob A E M (2007) The carcinoma-stromal ratio of colon carcinoma is an independent factor for survival compared to lymph node status and tumor stage. *CELLULAR ONCOLOGY : THE OFFICIAL JOURNAL OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR CELLULAR ONCOLOGY* 29:387–398.
- Mishra PJ, Mishra PJ, Humeniuk R, Medina DJ, Alexe G, Mesirov JP, Ganesan S, Glod JW, Banerjee D (2008) Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *CANCER RESEARCH* 68:4331–4339.
- Mochizuki H, Schwartz JP, Tanaka K, Brady RO, Reiser J (1998) High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. *JOURNAL OF VIROLOGY* 72:8873–8883.
- Moreno-Layseca P, Streuli CH (2014) Signalling pathways linking integrins with cell cycle progression. *MATRIX BIOLOGY : JOURNAL OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR MATRIX BIOLOGY* 34:144–153.
- Mueller LP, Luetzkendorf J, Mueller T, Reichelt K, Simon H, Schmoll H (2006) Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction. *STEM CELLS (DAYTON, OHIO)* 24:2753–2765.
- Mueller MM, Fusenig NE (2004) Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *NATURE REVIEWS. CANCER* 4:839–849.
- Mueller-Klieser W (1997) Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *THE AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY* 273:C1109-23.
- Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, Kato S, Ito M, Hotta T, Ando K (2006) Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *BLOOD* 107:1878–1887.
- Nakagawa H, Liyanarachchi S, Davuluri RV, Auer H, Martin EW, de la Chapelle, Albert, Frankel WL (2004) Role of cancer-associated stromal fibroblasts in metastatic colon cancer to the liver and their expression profiles. *ONCOGENE* 23:7366–7377.
- Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J, Chen J, Hentschel S, Vecil G, Dembinski J, Andreeff M, Lang FF (2005) Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *CANCER RESEARCH* 65:3307–3318.
- Nederman T, Norling B, Glimelius B, Carlsson J, Brunk U (1984 b) Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids. *CANCER RESEARCH* 44:3090–3097.
- Nederman T (1984 a) Effects of vinblastine and 5-fluorouracil on human glioma and thyroid cancer cell monolayers and spheroids. *CANCER RESEARCH* 44:254–258.
- Nyström H, Naredi P, Berglund A, Palmqvist R, Tavelin B, Sund M (2012) Liver-metastatic potential of colorectal cancer is related to the stromal composition of the tumour. *ANTICANCER RESEARCH* 32:5183–5191.
- O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F (1996) The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE* 184:1075–1082.
- Oh B, Kim KH, Chung SS, Hong KS, Lee R (2014) Role of β 1-Integrin in Colorectal Cancer: Case-Control Study. *ANNALS OF COLOPROCTOLOGY* 30:61–70.
- Oku Y, Shimoji T, Takifuji K, Hotta T, Yokoyama S, Matsuda K, Higashiguchi T, Tominaga T, Nasu T, Tamura K, Matsuura M, Miyata S, Kato Y, Yamaue H, Miki Y (2008) Identification of the molecular mechanisms for dedifferentiation at the invasion front of colorectal cancer by a gene expression analysis. *CLINICAL CANCER RESEARCH : AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH* 14:7215–7222.
- Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR (1999) Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *CANCER RESEARCH* 59:5002–5011.
- Oosterling SJ, van der Bij, Gerben J, Bögels M, Raa S ten, Post JA, Meijer GA, Beelen, Robert H J, van Egmond M (2008) Anti-beta1 integrin antibody reduces surgery-induced adhesion of colon carcinoma cells to traumatized peritoneal surfaces. *ANNALS OF SURGERY* 247:85–94.

- Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA (2005) Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *CELL* 121:335–348.
- Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R (1999) E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *JOURNAL OF CELL SCIENCE* 112 (Pt 8):1237–1245.
- Otsu K, Das S, Houser SD, Quadri SK, Bhattacharya S, Bhattacharya J (2009) Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. *BLOOD* 113:4197–4205.
- Page` F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc P, Trajanoski Z, Fridman W, Galon J (2005) Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE* 353:2654–2666.
- Park CW, Kim K, Bae S, Son HK, Myung P, Hong HJ, Kim H (2009) Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array. *INTERNATIONAL JOURNAL OF STEM CELLS* 2:59–68.
- Parvani JG, Galliher-Beckley AJ, Schiemann BJ, Schiemann WP (2013) Targeted inactivation of $\beta 1$ integrin induces $\beta 3$ integrin switching, which drives breast cancer metastasis by TGF- β . *MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL* 24:3449–3459.
- Patel GK, Yee CL, Yuspa SH, Vogel JC (2012) A humanized stromal bed is required for engraftment of isolated human primary squamous cell carcinoma cells in immunocompromised mice. *THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY* 132:284–290.
- Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, Garcı́a-Santos G, Ghajar C, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D (2012) Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *NATURE MEDICINE* 18:883–891.
- Petak I, Tillman DM, Houghton JA (2000) p53 dependence of Fas induction and acute apoptosis in response to 5-fluorouracil-leucovorin in human colon carcinoma cell lines. *CLINICAL CANCER RESEARCH: AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH* 6:4432–4441.
- Petersen OW, Nielsen HL, Gudjonsson T, Villadsen R, Rank F, Niebuhr E, Bissell MJ, Rønnev-Jessen L (2003) Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma. *THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY* 162:391–402.
- Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM (2014) The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO REPORTS* 15:1243–1253.
- Pietras K, Östman A (2010) Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. *EXPERIMENTAL CELL RESEARCH* 316:1324–1331.
- Pignatelli M, Smith ME, Bodmer WF (1990) Low expression of collagen receptors in moderate and poorly differentiated colorectal adenocarcinomas. *BRITISH JOURNAL OF CANCER* 61:636–638.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *SCIENCE (NEW YORK, N.Y.)* 284:143–147.
- Popov C, Radic T, Haasters F, Prall WC, Aszodi A, Gullberg D, Schieker M, Docheva D (2011) Integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 11\beta 1$ regulate the survival of mesenchymal stem cells on collagen I. *CELL DEATH & DISEASE* 2:e186.
- Prewett M, Bassi R, Paz K, Amatulli M, Deevi D, Li H, Wang S, Witte L, Samakoglu S, Tonra JR (2011) Estimating preclinical efficacy targets utilizing cetuximab efficacy in KRAS mutant and wild-type colorectal cancer models. *ANTICANCER RESEARCH* 31:2149–2160.
- Psaila B, Lyden D (2009) The metastatic niche: adapting the foreign soil. *NATURE REVIEWS. CANCER* 9:285–293.

- Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang, Sophie S W, Takashi S, Baik GH, Shibata W, Diprete B, Betz KS, Friedman R, Varro A, Tycko B, Wang TC (2011) Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *CANCER CELL* 19:257–272.
- Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ (2008) Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *NATURE* 456:593–598.
- Ren K, Liu F, Huang Y, Liang W, Cui W, Wang Q, Fan W (2012) Periodic mechanical stress activates integrin β 1-dependent Src-dependent PLC γ 1-independent Rac1 mitogenic signal in rat chondrocytes through ERK1/2. *CELLULAR PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY : INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL CELLULAR PHYSIOLOGY, BIOCHEMISTRY, AND PHARMACOLOGY* 30:827–842.
- Rønnov-Jessen L, Petersen OW (1993) Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *LABORATORY INVESTIGATION; A JOURNAL OF TECHNICAL METHODS AND PATHOLOGY* 68:696–707.
- Rønnov-Jessen L, Petersen OW, Bissell MJ (1996) Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS* 76:69–125.
- Rooij J de, Kerstens A, Danuser G, Schwartz MA, Waterman-Storer CM (2005) Integrin-dependent actomyosin contraction regulates epithelial cell scattering. *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY* 171:153–164.
- Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H (2008) Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950)* 180:2581–2587.
- Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY* 182:311–322.
- Schooley AM, Andrews NM, Zhao H, Addison CL (2012) β 1 integrin is required for anchorage-independent growth and invasion of tumor cells in a context dependent manner. *CANCER LETTERS* 316:157–167.
- Segditsas S, Tomlinson I (2006) Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *ONCOGENE* 25:7531–7537.
- Semon JA, Nagy LH, Llamas CB, Tucker HA, Lee RH, Prockop DJ (2010) Integrin expression and integrin-mediated adhesion in vitro of human multipotent stromal cells (MSCs) to endothelial cells from various blood vessels. *CELL AND TISSUE RESEARCH* 341:147–158.
- Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, Higashi Y, Tanaka S, Yasui W, Chayama K (2010) Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER. JOURNAL INTERNATIONAL DU CANCER* 127:2323–2333.
- Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, Cooper D, Gansler T, Lerro C, Fedewa S, Lin C, Leach C, Cannady RS, Cho H, Scoppa S, Hachey M, Kirch R, Jemal A, Ward E (2012) Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA: A CANCER JOURNAL FOR CLINICIANS* 62:220–241.
- Silobrcic V, Zietman AL, Ramsay JR, Suit HD, Sedlacek RS (1990) Residual immunity of athymic NCr/Sed nude mice and the xenotransplantation of human tumors. *INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER. JOURNAL INTERNATIONAL DU CANCER* 45:325–333.
- Silva WA, Covas DT, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Siufi, Jorge L C, Zanette DL, Santos, Anemari R D, Zago MA (2003) The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *STEM CELLS (DAYTON, OHIO)* 21:661–669.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE* 82:1107–1112.
- Sodek KL, Ringuette MJ, Brown TJ (2009) Compact spheroid formation by ovarian cancer cells is associated with contractile behavior and an invasive phenotype. *INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER. JOURNAL INTERNATIONAL DU CANCER* 124:2060–2070.
- Song J, Zhang J, Wang J, Cao Z, Wang J, Guo X, Dong W (2014) β 1 integrin modulates tumor growth and apoptosis of human colorectal cancer. *ONCOLOGY REPORTS* 32:302–308.

- Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F (2008) Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *GENE THERAPY* 15:730–738.
- Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, Hall B, Andreeff M, Marini F (2009) Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLOS ONE* 4:e4992.
- Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L (2006) Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *BLOOD* 107:1484–1490.
- Stallmach A, Lampe B von, Matthes H, Bornhöft G, Riecken EO (1992) Diminished expression of integrin adhesion molecules on human colonic epithelial cells during the benign to malign tumour transformation. *GUT* 33:342–346.
- Strnad H, Lacina L, Kolár M, Cada Z, Vlcek C, Dvoránková B, Betka J, Plzák J, Chovanec M, Sáčková J, Valach J, Urbanová M, Smetana K (2010) Head and neck squamous cancer stromal fibroblasts produce growth factors influencing phenotype of normal human keratinocytes. *HISTOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY* 133:201–211.
- Studený M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M (2002) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *CANCER RESEARCH* 62:3603–3608.
- Sundberg C, Branting M, Gerdin B, Rubin K (1997) Tumor cell and connective tissue cell interactions in human colorectal adenocarcinoma. Transfer of platelet-derived growth factor-AB/BB to stromal cells. *THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY* 151:479–492.
- Sutherland RM, Durand RE (1976) Radiation response of multicell spheroids--an in vitro tumour model. *CURRENT TOPICS IN RADIATION RESEARCH QUARTERLY* 11:87–139.
- Sutherland RM (1988) Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *SCIENCE (NEW YORK, N.Y.)* 240:177–184.
- Suzuki K, Sun R, Origuchi M, Kanehira M, Takahata T, Itoh J, Umezawa A, Kijima H, Fukuda S, Saijo Y (2011) Mesenchymal stromal cells promote tumor growth through the enhancement of neovascularization. *MOLECULAR MEDICINE (CAMBRIDGE, MASS.)* 17:579–587.
- Taichman DB, Cybulsky MI, Djaffar I, Longenecker BM, Teixidó J, Rice GE, Aruffo A, Bevilacqua MP (1991) Tumor cell surface alpha 4 beta 1 integrin mediates adhesion to vascular endothelium: demonstration of an interaction with the N-terminal domains of INCAM-110/VCAM-1. *CELL REGULATION* 2:347–355.
- Tarin D, Croft CB (1969) Ultrastructural features of wound healing in mouse skin. *JOURNAL OF ANATOMY* 105:189–190.
- Tlstý TD, Hein PW (2001) Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *CURRENT OPINION IN GENETICS & DEVELOPMENT* 11:54–59.
- Tomayko MM, Reynolds CP (1989) Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *CANCER CHEMOTHERAPY AND PHARMACOLOGY* 24:148–154.
- Tsanou E, Peschos D, Batistatou A, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K (2008) The E-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach. *ANTICANCER RESEARCH* 28:3815–3826.
- Tsukamoto S, Honoki K, Fujii H, Tohma Y, Kido A, Mori T, Tsujiuchi T, Tanaka Y (2012) Mesenchymal stem cells promote tumor engraftment and metastatic colonization in rat osteosarcoma model. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY* 40:163–169.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V (2008) Mesenchymal stem cells in health and disease. *NATURE REVIEWS. IMMUNOLOGY* 8:726–736.
- Valtieri M, Sorrentino A (2008) The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis. *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY* 217:296–300.

- Vassos N, Rau T, Merkel S, Feiersinger F, Geppert CI, Stürzl M, Hohenberger W, Croner RS (2014) Prognostic value of $\beta 1$ integrin expression in colorectal liver metastases. *INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL PATHOLOGY* 7:288–300.
- Vermeulen SJ, Bruyneel EA, Bracke ME, De Bruyne, G K, Vennekens KM, Vleminckx KL, Berx GJ, van Roy, F M, Mareel MM (1995) Transition from the noninvasive to the invasive phenotype and loss of alpha-catenin in human colon cancer cells. *CANCER RESEARCH* 55:4722–4728.
- Vermeulen SJ, Nollet F, Teugels E, Philippe J, Speleman F, van Roy, F M, Bracke ME, Mareel MM (1997) Mutation of alpha-catenin results in invasiveness of human HCT-8 colon cancer cells. *ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES* 833:186–189.
- Vicente-Manzanares M, Choi CK, Horwitz AR (2009) Integrins in cell migration--the actin connection. *JOURNAL OF CELL SCIENCE* 122:199–206.
- Wei W, Lin H, Shen M, Tang M (2008) Mechanosensing machinery for cells under low substratum rigidity. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. CELL PHYSIOLOGY* 295:C1579-89.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB (2000) Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH* 61:364–370.
- Worthley DL, Ruskiewicz A, Davies R, Moore S, Nivison-Smith I, Bik To L, Browett P, Western R, Durrant S, So J, Young GP, Mullighan CG, Bardy PG, Michael MZ (2009) Human gastrointestinal neoplasia-associated myofibroblasts can develop from bone marrow-derived cells following allogeneic stem cell transplantation. *STEM CELLS (DAYTON, OHIO)* 27:1463–1468.
- Wuchter P, Bieback K, Schrezenmeier H, Bornhäuser M, Müller LP, Bönig H, Wagner W, Meisel R, Pavel P, Tonn T, Lang P, Müller I, Renner M, Malcherek G, Saffrich R, Buss EC, Horn P, Rojewski M, Schmitt A, Ho AD, Sanzenbacher R, Schmitt M (2015) Standardization of Good Manufacturing Practice-compliant production of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells for immunotherapeutic applications. *CYTOTHERAPY* 17:128–139.
- Xiong J, Balcioglu HE, Danen, Erik H J (2013) Integrin signaling in control of tumor growth and progression. *THE INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY & CELL BIOLOGY* 45:1012–1015.
- Xouri G, Christian S (2010) Origin and function of tumor stroma fibroblasts. *SEMINARS IN CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY* 21:40–46.
- Yamada KM, Even-Ram S (2002) Integrin regulation of growth factor receptors. *NATURE CELL BIOLOGY* 4:E75–6.
- Young HE, Mancini ML, Wright RP, Smith JC, Black AC, Reagan CR, Lucas PA (1995) Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS : AN OFFICIAL PUBLICATION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF ANATOMISTS* 202:137–144.
- Yu Y, Xiao C, Tan L, Wang Q, Li X, Feng Y (2014) Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- β signalling. *BR J CANCER* 110:724–732.
- Yuhás JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ (1977) A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *CANCER RESEARCH* 37:3639–3643.
- Zhu C, Popova SN, Brown, Ewan R S, Barsyte-Lovejoy D, Navab R, Shih W, Li M, Lu M, Jurisica I, Penn LZ, Gullberg D, Tsao M (2007) Integrin alpha 11 regulates IGF2 expression in fibroblasts to enhance tumorigenicity of human non-small-cell lung cancer cells. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 104:11754–11759.
- Zou X, Feng B, Dong T, Yan G, Tan B, Shen H, Huang A, Zhang X, Zhang M, Yang P, Zheng M, Zhang Y (2013) Up-regulation of type I collagen during tumorigenesis of colorectal cancer revealed by quantitative proteomic analysis. *JOURNAL OF PROTEOMICS* 94:473–485.
- Zvibel I, Halpern Z, Papa M (1998) Extracellular matrix modulates expression of growth factors and growth-factor receptors in liver-colonizing colon-cancer cell lines. *INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER. JOURNAL INTERNATIONAL DU CANCER* 77:295–301.

9. ANHANG

Abbildungen

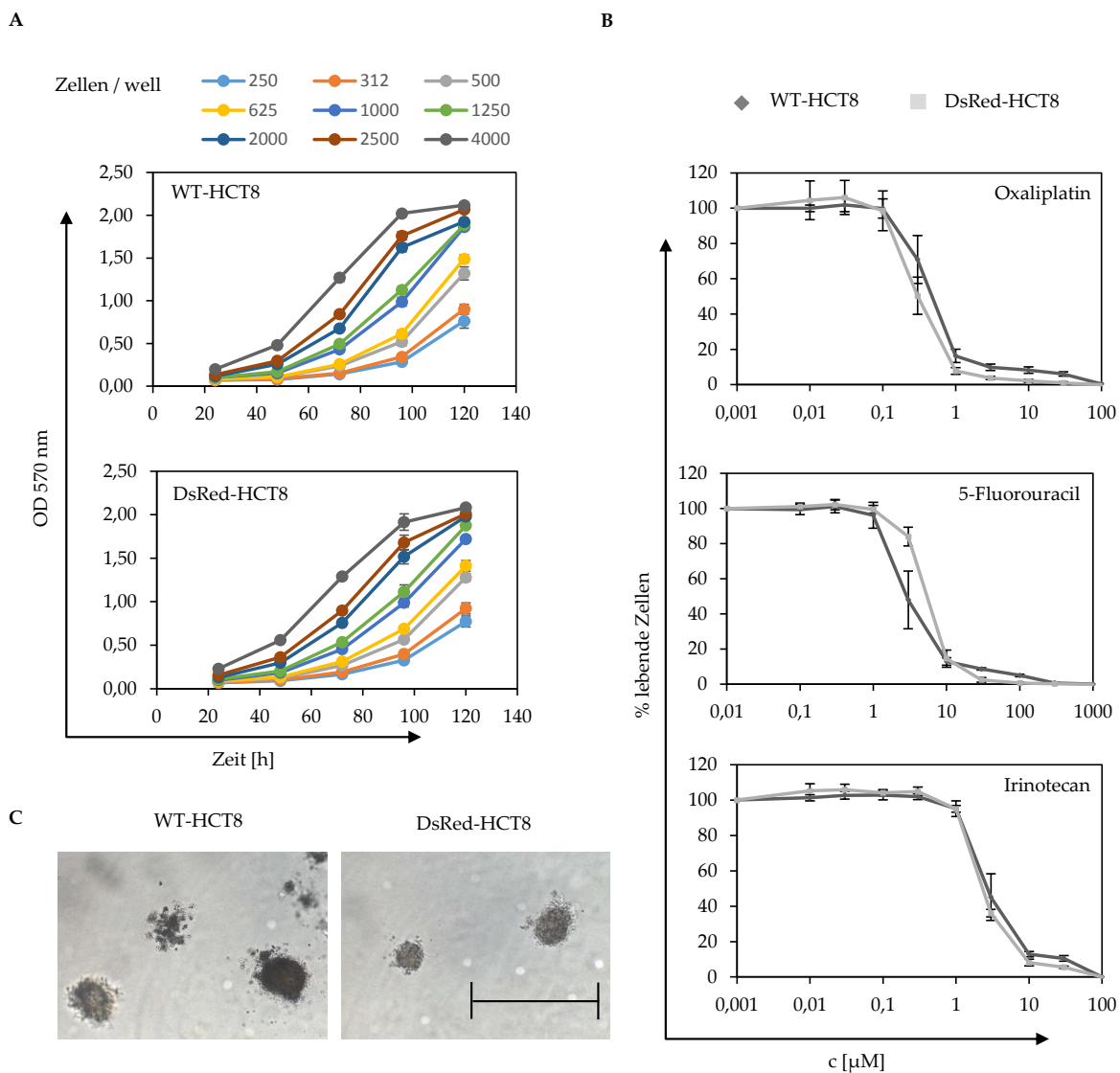


Abb. A1: Nachweis wichtiger WT-Charakteristika der CRC-Zelllinie HCT8 nach lentiviraler DsRed-Markierung. (A) Wachstumskinetiken mittels SRB-Assay. (B) Zytotoxizitätsanalysen mittels SRB-Assay für drei verschiedene Zytostatika. (C) Repräsentatives Koloniewachstum im Soft-Agar-Assay. Alle Untersuchungen für *DsRed*-HCT8 vergleichend gegenüber WT-HCT8; Balken – 200 µm.

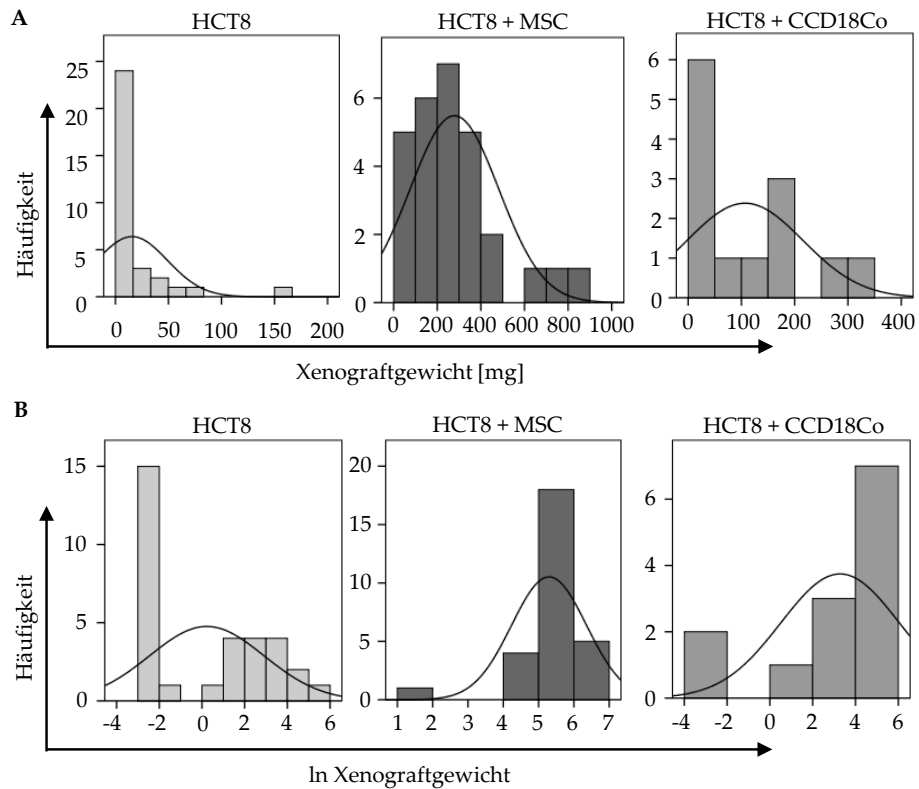


Abb. A2: Histogramme für Xenograftgewichte der CRC-Zelllinie HCT8 in Abhängigkeit von deren Logarithmierung. Häufigkeitsverteilung und Gauß'sche Normalverteilungskurve für Gewichte (A) und logarithmierte Gewichte (B) s.c. Xenografte der CRC-Zelllinie HCT8 im Nacktmausmodell (d 25 nach Injektion).

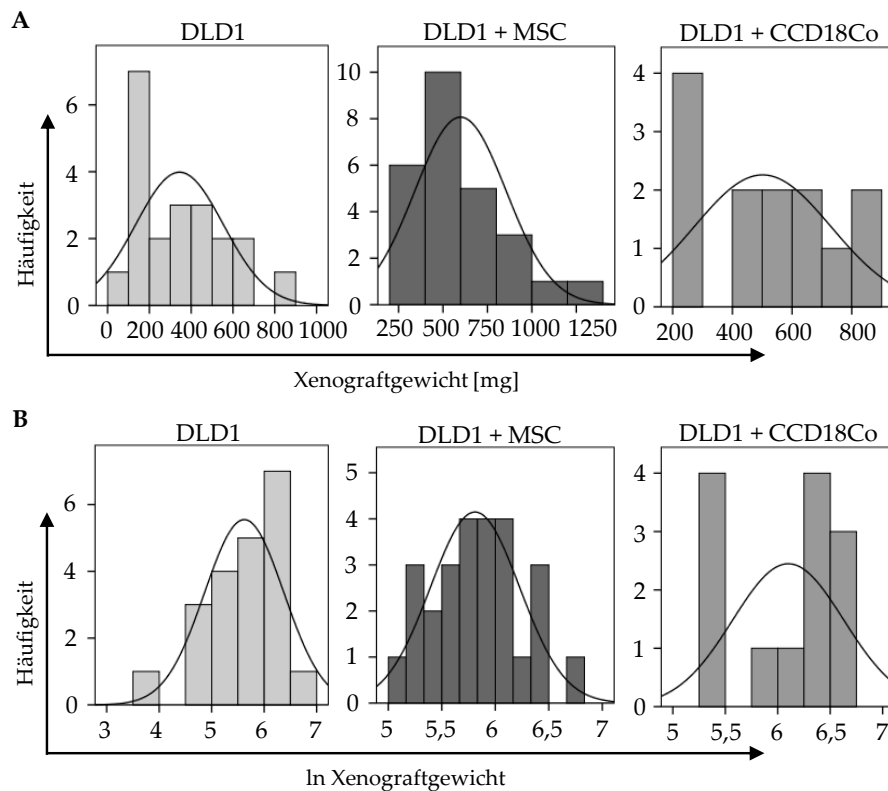


Abb. A3: Histogramme für Xenograftgewichte der CRC-Zelllinie DLD1 in Abhängigkeit von deren Logarithmierung. Häufigkeitsverteilung und Gauß'sche Normalverteilungskurve für Gewichte (A) und logarithmierte Gewichte (B) s.c. Xenografte der CRC-Zelllinie DLD1 im Nacktmausmodell (d 25 nach Injektion).

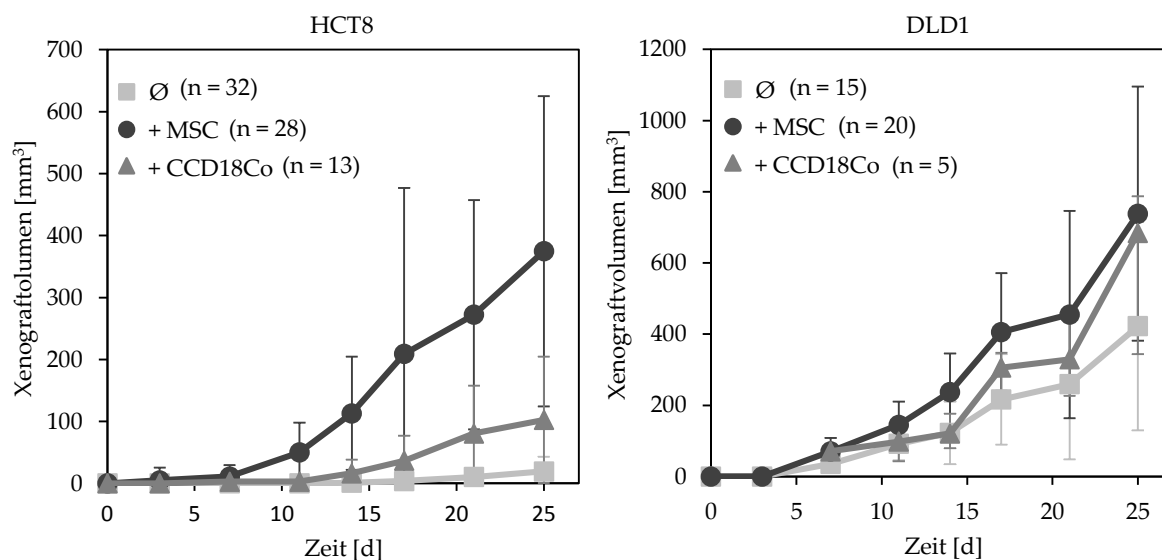


Abb. A4: MSC-vermittelter Einfluss auf das Volumen von CRC-Xenograften im Nacktmausmodell. Mittels Schiebelehre ermittelte Volumina MSC-gemischter (+MSC), ungemischter (Ø) sowie CCD18Co-gemischter (+CCD18Co) s.c. Xenografte der CRC-Zelllinien HCT8 (A) und DLD1 (B). Dargestellt als MW mit Stabw.

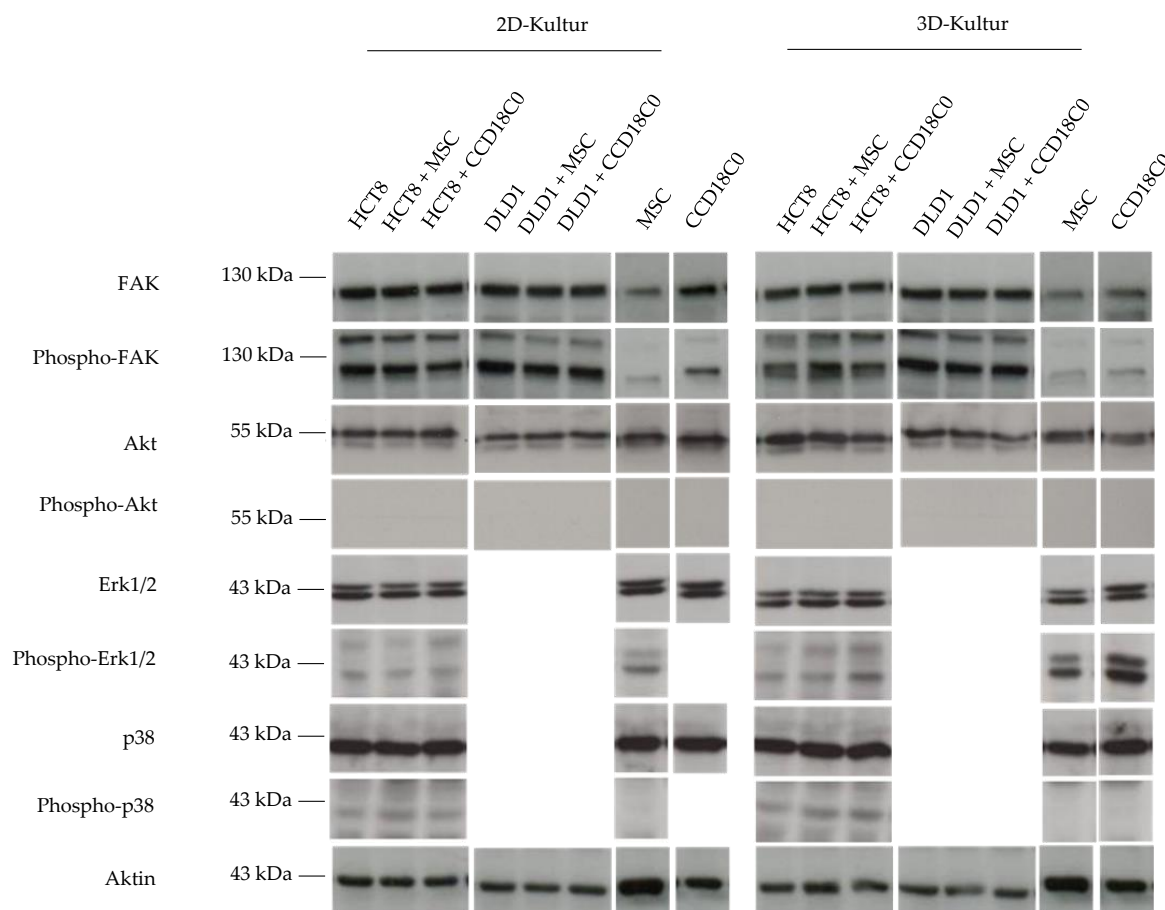


Abb. A5: Western-Blot-Analysen von 2D- und 3D-Mischkulturen von CRC-Zellen. Western-Blot-Analyse von FAK (125 kDa), Akt (60 kDa), Erk1/2 (44/42 kDa) und p38 (prognostizierte Größe: 38 kDa, beobachtet: ca. 42 kDa) sowie deren aktivierten Phospho-Formen in MSC-gemischten, ungemischten und CCD18Co-gemischten 2D- und 3D-Kulturen der CRC-Zelllinien HCT8 und DLD1. Aktin (42 kDa) als Ladekontrolle.

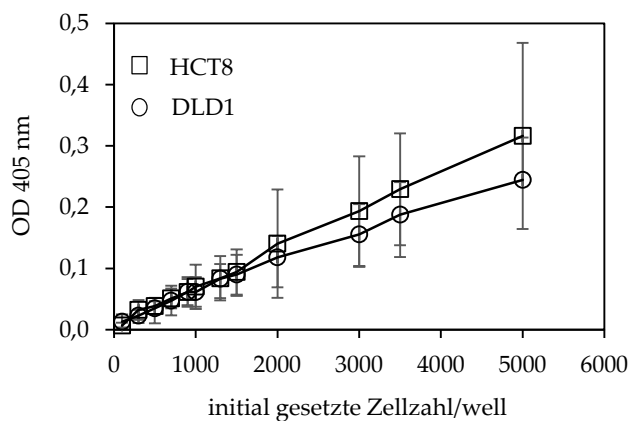


Abb. A6: Analyse der Korrelation zwischen Signal der APh-Reaktion und der initial gesetzten CRC-Zellzahl im 3D-Kulturmodell. Auftragung der OD-Werte der APh-Reaktion gegen die initial gesetzten CRC-Zellzahl pro well für die CRC-Zelllinien HCT8 und DLD1. Dargestellt als MW mit Stabw aus 8-fach Bestimmung.

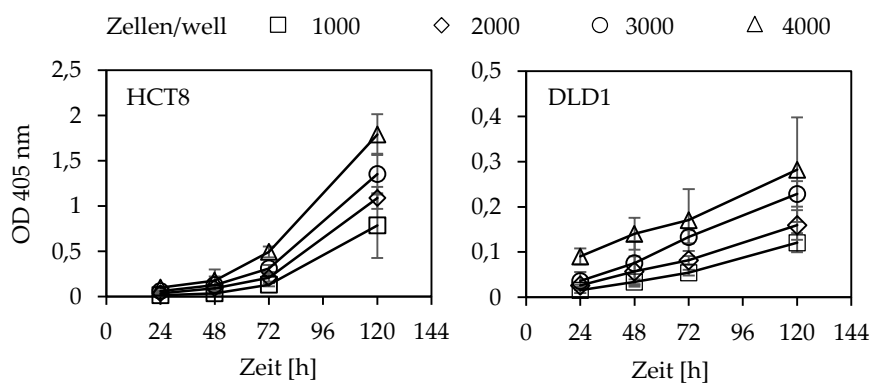


Abb. A7: APh-Assay zur Untersuchung der Wachstumskinetik von 3D-Kulturen von CRC-Zelllinien. Auftragung der OD-Werte der APh-Reaktion gegen die Zeit für 3D-Kulturen mit initial unterschiedlichen Zellzahlen der CRC-Zelllinien HCT8 und DLD1. Dargestellt als MW mit Stabw aus 8-fach Bestimmung.

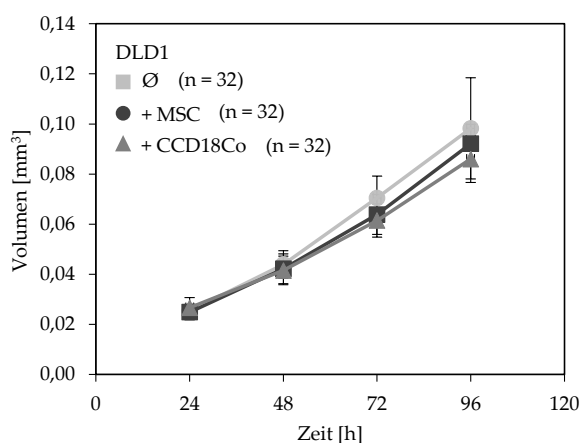


Abb. A8: Einfluss von MSC auf die Volumina von Sphäroiden der CRC-Zelllinie DLD1. Volumina MSC-gemischter (+MSC), ungemischter (Ø) und CCD18Co-gemischter Sphäroide (+CCD18Co) der CRC-Zelllinie DLD1. Dargestellt als MW mit Stabw aus jeweils 32 unabhängigen Sphäroiden.

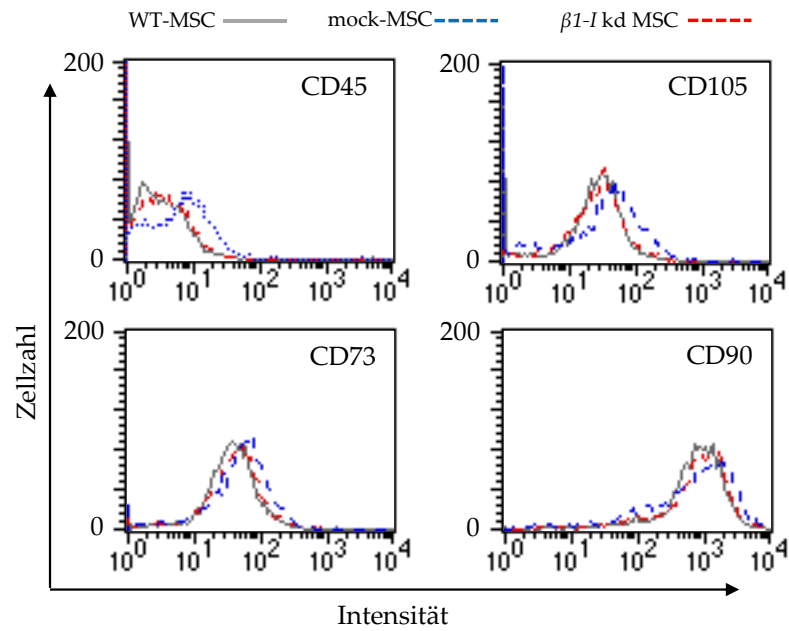


Abb. A9: Durchflusszytometrischer Nachweis relevanter Oberflächenmarker von MSC nach knock-down von $\beta 1$ -Integrin. Overlay-Darstellung der Expression von CD45, CD105, CD73 und CD90 in $\beta 1$ -kd MSC vergleichend gegenüber WT- und mock-MSC.

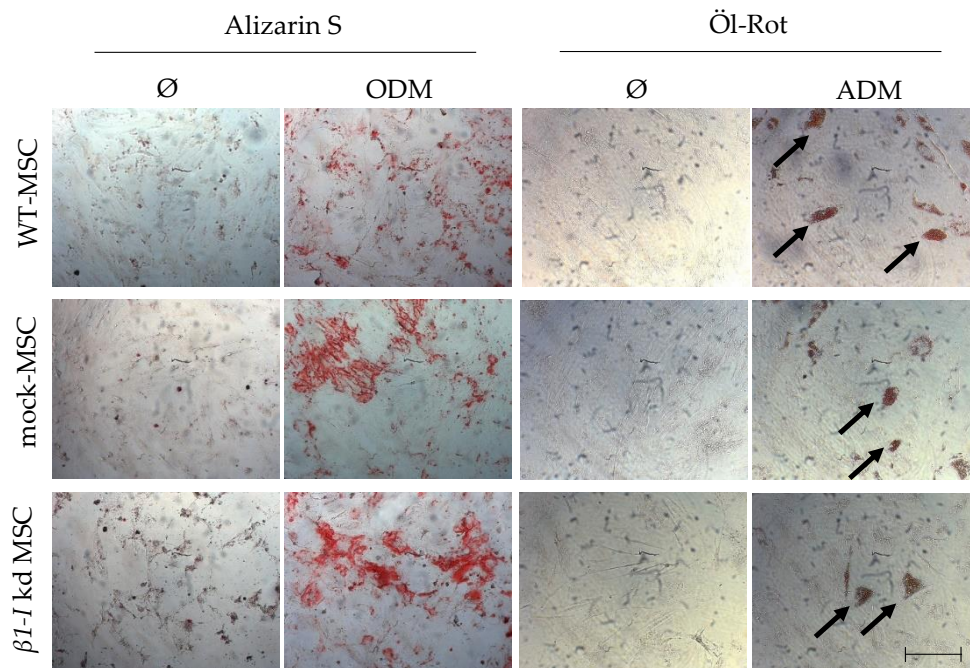


Abb. A10: Differenzierungspotential von MSC nach knock-down von $\beta 1$ -Integrin. Nachweis der osteogenen und adipogenen Differenzierung in $\beta 1$ -kd MSC sowie WT- und mock-MSC. Chemische Färbung nach Kultivierung im jeweiligen Differenzierungsmedium (ODM – osteogenes Differenzierungsmedium; ADM – adipogenes Differenzierungsmedium) vergleichend gegenüber der Kultivierung in Wachstumsmedium (Ø), Balken – 500 μ m, Pfeile zeigen Fettvakuolen an.

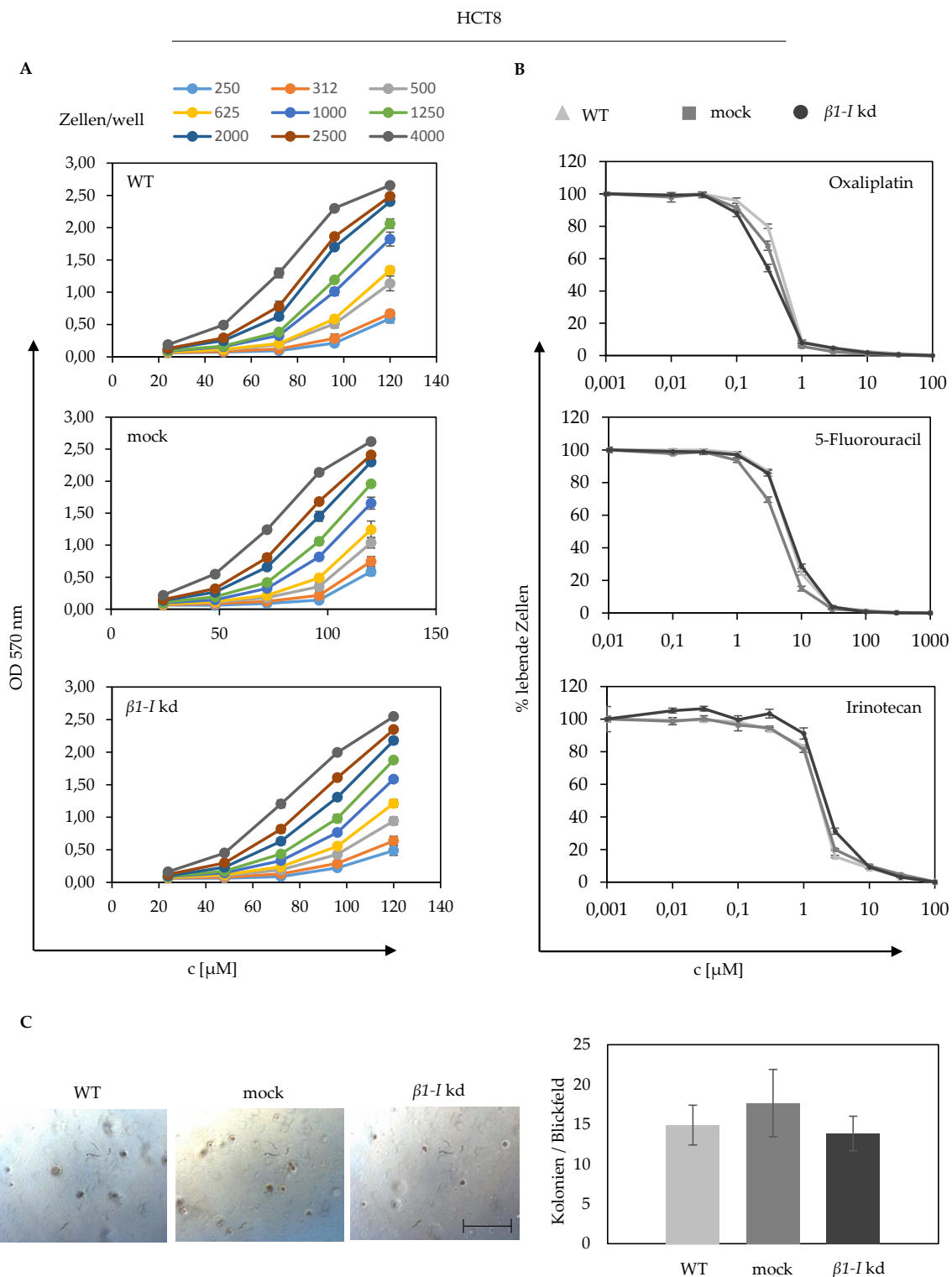


Abb. A11: Nachweis wichtiger WT-Charakteristika der CRC-Zelllinie HCT8 nach knock-down von $\beta 1$ -Integrin. (A) Wachstumskinetiken mittels SRB-Assay. (B) Zytotoxizitätsanalysen mittels SRB-Assay für drei verschiedene Zytostatika. (C) Repräsentatives Koloniewachstum im Soft-Agar-Assay (Balken – 500 μ m) sowie Anzahl an Kolonien pro Blickfeld (MW mit Stabw aus 3-fach Bestimmung von je 6 Blickfeldern). Alle Untersuchungen für $\beta 1$ -I kd HCT8 vergleichend gegenüber WT- und mock-HCT8.

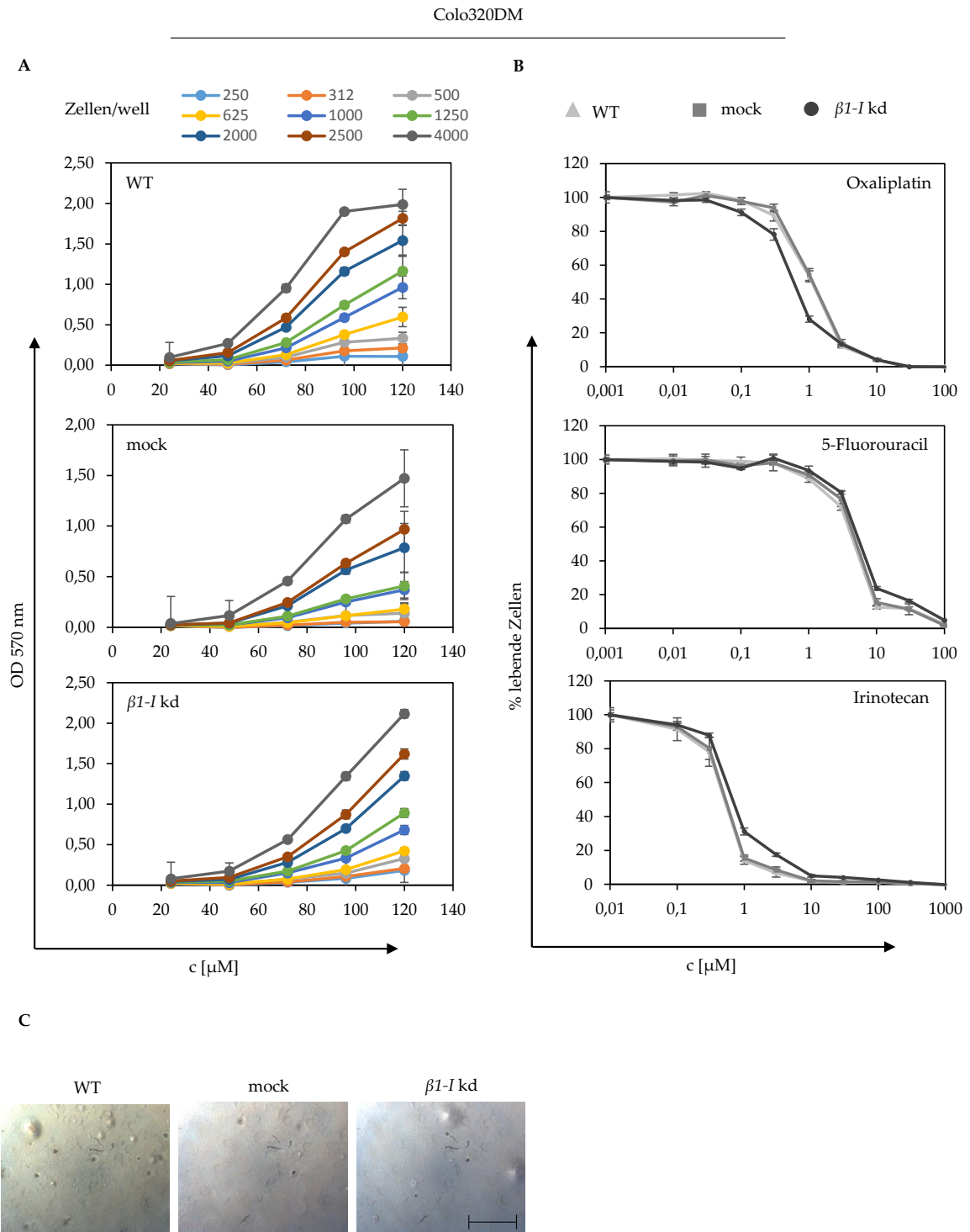


Abb. A12: Nachweis wichtiger WT-Charakteristika der CRC-Zelllinie Colo320DM nach knock-down von $\beta 1$ -Integrin. (A) Wachstumskinetiken mittels SRB-Assay. (B) Zytotoxizitätsanalysen mittels SRB-Assay für drei verschiedene Zytostatika. (C) Repräsentatives Koloniewachstum im Soft-Agar-Assay (Balken – 500 μ m). Alle Untersuchungen für $\beta 1$ -I kd Colo320DM vergleichend gegenüber WT- und mock-Colo320DM.

DLD1

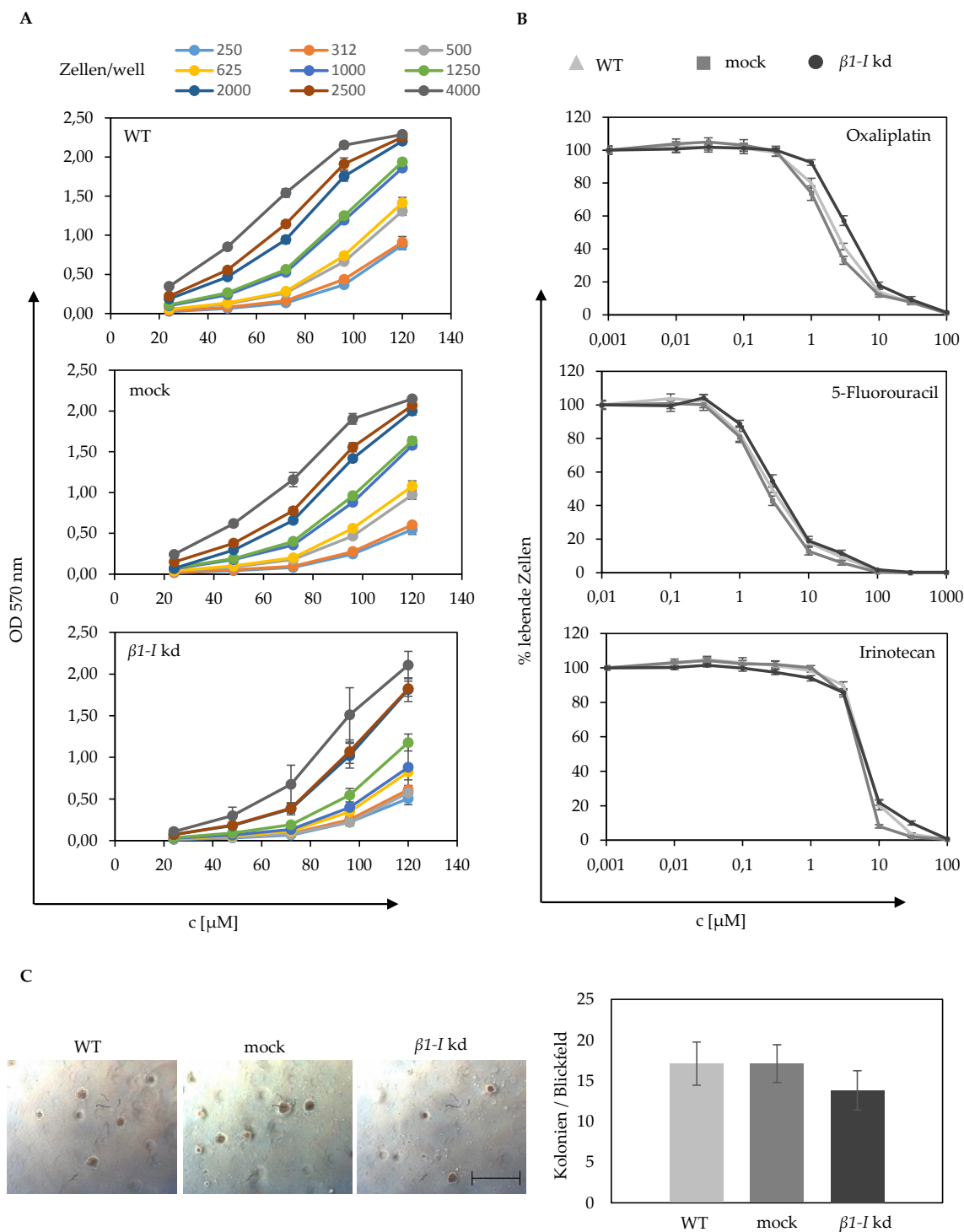


Abb. A13: Nachweis wichtiger WT-Charakteristika der CRC-Zelllinie DLD1 nach knock-down von $\beta 1$ -Integrin. (A) Wachstumskinetiken mittels SRB-Assay. (B) Zytotoxizitätsanalysen mittels SRB-Assay für drei verschiedene Zytostatika. (C) Repräsentatives Koloniewachstum im Soft-Agar-Assay (Balken – 500 μ m) sowie Anzahl an Kolonien pro Blickfeld (MW mit Stabw aus 3-fach Bestimmung von je 6 Blickfeldern). Alle Untersuchungen für $\beta 1$ -I kd DLD1 vergleichend gegenüber WT- und mock-DLD1.

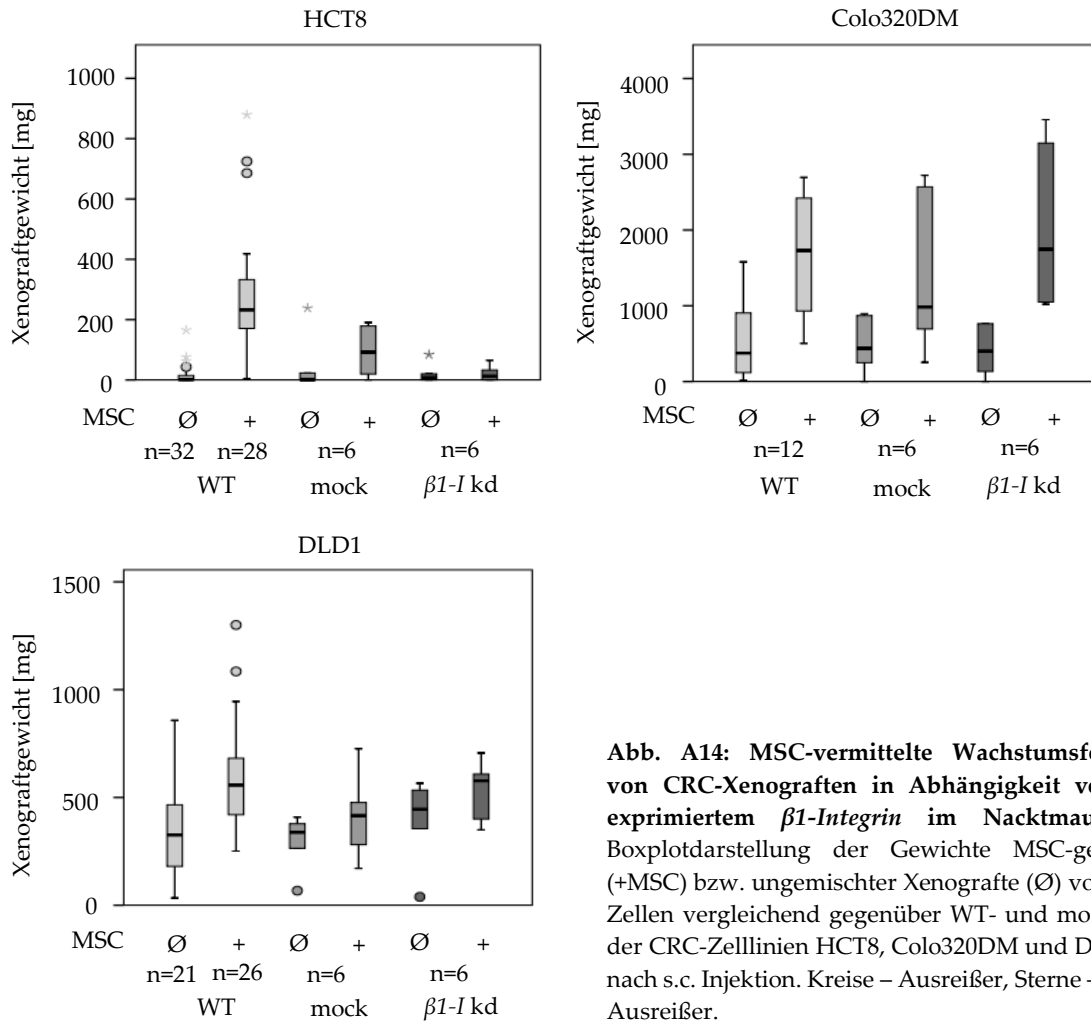


Abb. A14: MSC-vermittelte Wachstumsförderung von CRC-Xenograften in Abhängigkeit von CRC-exprimiertem $\beta 1$ -Integrin im Nacktmausmodell. Boxplotdarstellung der Gewichte MSC-gemischter (+MSC) bzw. ungemischter Xenografte (Ø) von $\beta 1$ -I kd Zellen vergleichend gegenüber WT- und mock-Zellen der CRC-Zelllinien HCT8, Colo320DM und DLD1 25 d nach s.c. Injektion. Kreise – Ausreißer, Sterne – extreme Ausreißer.

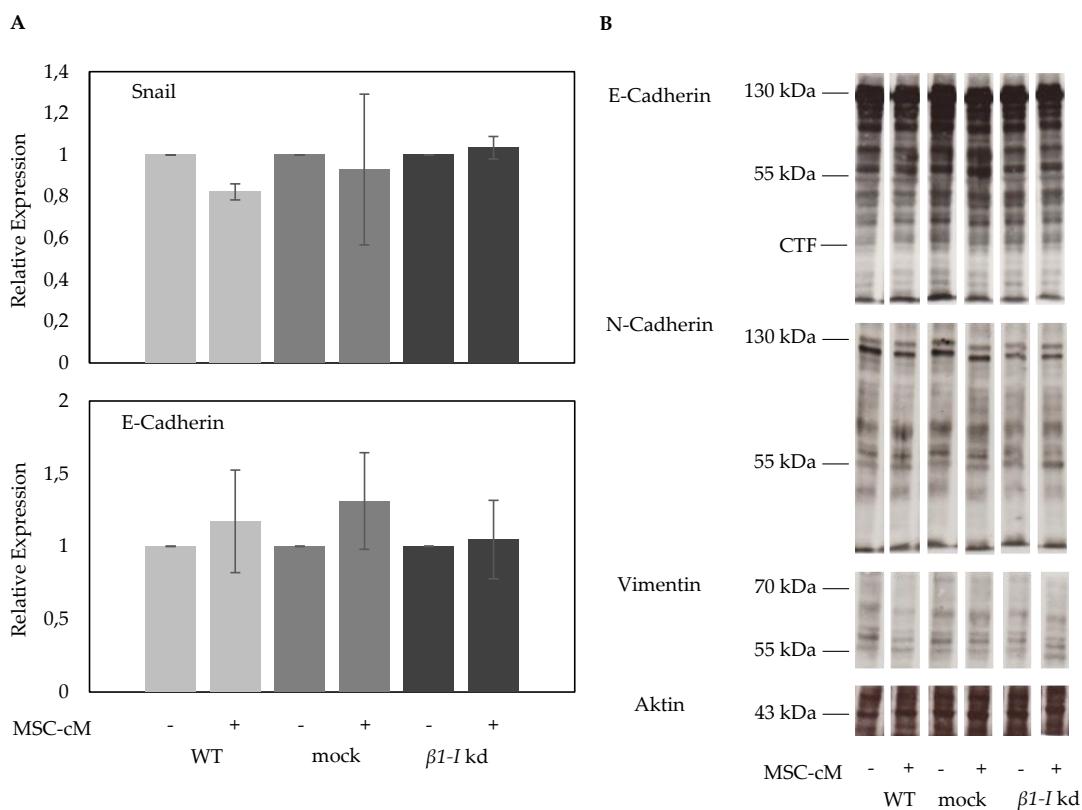


Abb. A15: Einfluss von MSC-cM auf die Expression von EMT-Genen in HCT8-Zellen in Abhängigkeit von HCT8-exprimiertem $\beta 1$ -Integrin. (A) qPCR-Analyse der Expression von *Snail* und *E-Cadherin* in $\beta 1$ -I kd HCT8-Zellen kultiviert in MSC-cM (+) bzw. Wachstumsmedium (-) vergleichend gegenüber WT- und mock-HCT8-Zellen. (B) Western-Blot-Analyse von E-Cadherin (120 kDa, CTF – C-terminales Fragment, 38 kDa), N-Cadherin (130 kDa) und Vimentin (55 kDa) in $\beta 1$ -I kd HCT8-Zellen kultiviert in MSC-cM (+) bzw. Wachstumsmedium (-) vergleichend gegenüber WT- und mock-HCT8-Zellen. Aktin (42 kDa) als Ladekontrolle.

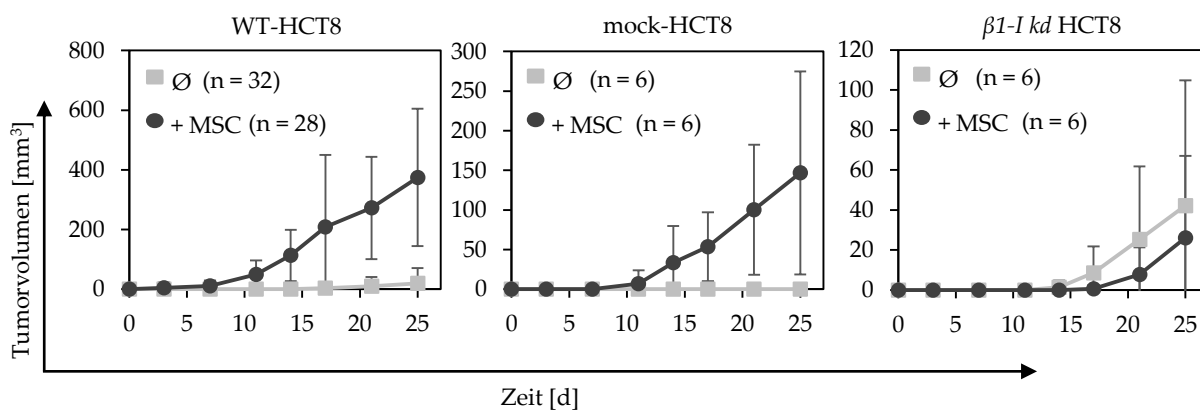


Abb. A16: MSC-vermittelter Einfluss auf das Xenograftvolumen der CRC-Zelllinie HCT8 in Abhängigkeit von HCT8-exprimiertem $\beta 1$ -Integrin im Nacktmausmodell. Mittels Schiebelehre ermittelte Volumina MSC-gemischter (+MSC) und ungemischter (\emptyset) s.c. Xenografte von $\beta 1$ -I kd Zellen vergleichend gegenüber WT- und mock-Zellen der CRC-Zelllinie HCT8. Dargestellt als MW mit Stabw.

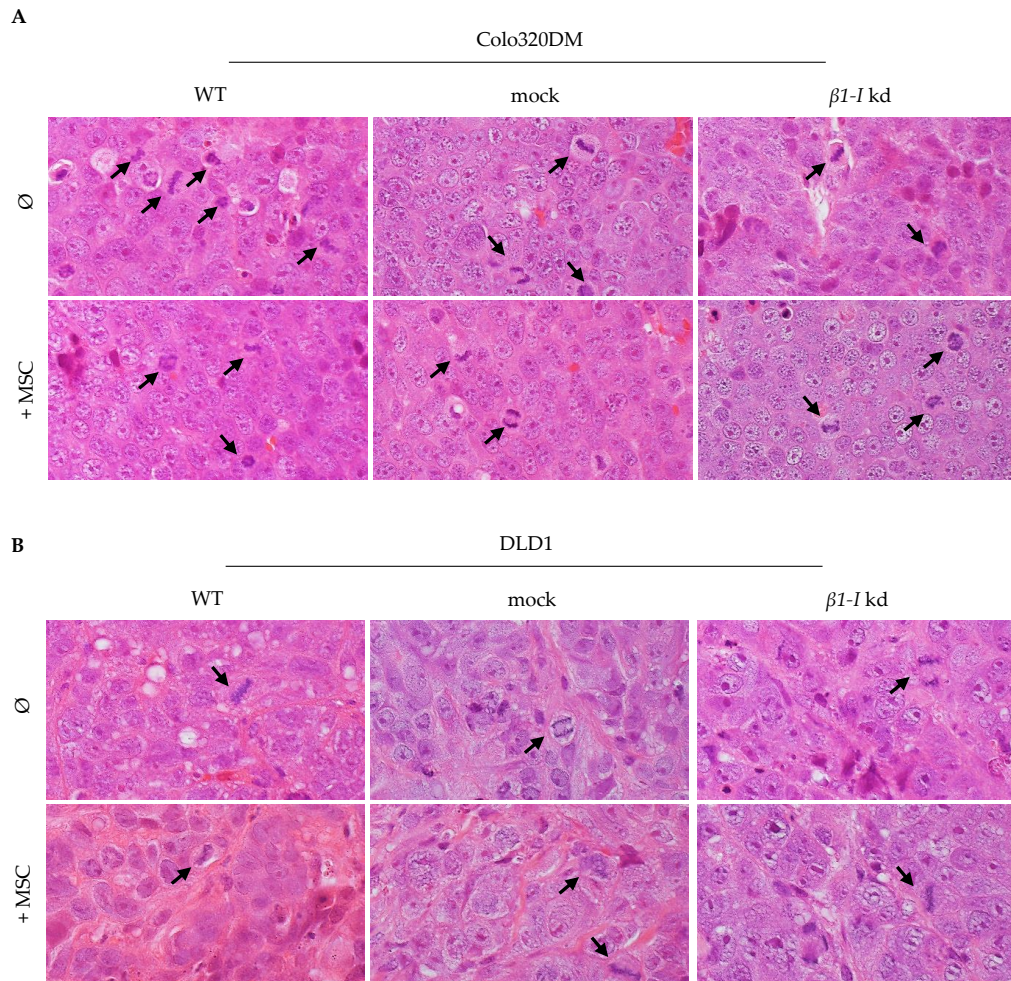


Abb. A17: MSC-vermittelter Einfluss auf die Mitoserate von CRC-Xenograften in Abhängigkeit von CRC-exprimiertem $\beta 1$ -Integrin im Nacktmausmodell. HE-Färbung zur Auszählung mitotischer Figuren (schwarze Pfeile) MSC-gemischter (+MSC) und ungemischter (\emptyset) Xenografte von $\beta 1$ -I kd Zellen vergleichend gegenüber WT- und mock-Zellen der CRC-Zelllinien Colo320DM (A) und DLD1 (B) d 25 nach s.c. Injektion.

Tabellen

Tab. A1: Normierte DsRed-FI s.c. CRC-Xenografte im Nacktmausmodell an d 25 nach Injektion

	<i>DsRed-HCT8</i>			<i>DsRed-DLD1</i>		
	Ø	+ MSC	+ CCD18Co	Ø	+ MSC	+ CCD18Co
MW	0,85	7,36	5,3	8,54	13,35	13,83
± Stabw	1,2	4,76	4,64	5,83	6,67	9,69

Tab. A2: MW und Stabw von Gewichten s.c. CRC-Xenografte im NOG-Mausmodell an d 25 nach Injektion

	HCT8			DLD1		
	Ø	+ MSC	+ CCD18Co	Ø	+ MSC	+ CCD18Co
MW [mg]	143	323	215	360	655	474
± Stabw [mg]	65	83	50	27	194	140

Tab. A3: Anzahl DsRed-positiver CRC-Zellen nach 96 h Kultivierung

	<i>DsRed-HCT8</i>			<i>DsRed-DLD1</i>		
	Ø	+ MSC	+ CCD18Co	Ø	+ MSC	+ CCD18Co
MW	2,1*10 ⁶	2,6*10 ⁶	2,3*10 ⁶	1,4*10 ⁶	1,6*10 ⁶	1,9*10 ⁶
± Stabw	5*10 ⁵	7*10 ⁵	3*10 ⁵	1*10 ⁵	5*10 ⁵	1,7*10 ⁵

Tab. A4: MW sowie obere und untere Grenzen des gemischt-linearen Modells zur MSC-vermittelten Wachstumsförderung s.c. CRC-Xenografte in Abhängigkeit von CRC-exprimiertem $\beta 1$ -Integrin im Nacktmausmodell

CRC-Linie		WT-CRC		mock-CRC		$\beta 1$ -I kd CRC	
		Ø	+ MSC	Ø	+ MSC	Ø	+ MSC
HCT8	MW [mg]	1,3	197	1,3	27	1,7	3,7
	untere Grenze	0,6	84	0,2	4,1	0,3	0,6
	obere Grenze	2,9	463	8,5	171	11	24
Colo320DM	MW [mg]	269	1433	132	1022	103	1811
	untere Grenze	64	985	16	601	14	1066
	obere Grenze	1122	2085	927	1735	777	3077
DLD1	MW [mg]	279	555	261	376	447	521
	untere Grenze	165	342	96	138	164	192
	obere Grenze	474	901	710	1023	1218	1419

Tab. A5: MW und Stabw von Gewichten s.c. HCT8-Xenografte im Nacktmausmodell an d 25 nach Injektion in Abhängigkeit von MSC-exprimiertem $\beta 1$ -Integrin

MSC-Charge		HCT8			
		\emptyset	WT-MSC	mock-MSC	$\beta 1$ -I kd MSC
MSC #1	MW [mg]	8	171	89	218
	\pm Stabw [mg]	14	103	51	130
MSC #2	MW [mg]	55	200	209	74
	\pm Stabw [mg]	95	22	91	16

Erklärung

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden in den Jahren 2009 bis 2014 im Hämatologisch-onkologischen Forschungslabor, Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, durchgeführt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden zur Publikation eingereicht.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig erarbeitet sowie verfasst habe und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Ich versichere weiterhin, dass die aus anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet wurden. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen als solche aufgeführt.

Ich versichere, dass die vorliegende Arbeit keiner anderen Universität oder Hochschule zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt wurde.

Ich versichere, dass ich mich zuvor noch nicht um einen Doktorgrad beworben habe.

Miriam Widder

Halle (Saale), den

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich beim Gelingen der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle bedanke ich mich bei Prof. Dr. Hans-Joachim Schmoll und Prof. Dr. Carsten Müller-Tidow, Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die Möglichkeit, dieses interessante Thema an Ihrer Klinik bearbeiten zu können.

Bei Prof. Dr. Ralf Anton Benndorf, Institut für Pharmazie, Abteilung Klinische Pharmazie und Pharmakotherapie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, bedanke ich mich ganz herzlich für die Bereitschaft zur Betreuung meiner Dissertation an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I und das entgegengebrachte Interesse an meinem Thema.

Ein besonderer Dank gebührt PD Dr. med. Lutz P. Müller, Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für das stetige Interesse an meiner Arbeit und die hilfreichen Diskussionen und Denkansätze. Weiterhin bedanke ich mich sehr für sein entgegengebrachtes Vertrauen.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. rer. nat. Thomas Müller, Hämatologisch-onkologisches Forschungslabor, Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die stetige Bereitschaft zur anregenden wissenschaftlichen Diskussion. Vielen Dank zudem für die vielen praktischen Tipps beim Erlernen neuer Techniken wie der Tierversuche!

Bedanken möchte ich mich weiterhin ganz herzlich bei Frau Dr. Susanne Unverzagt, Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für Ihre unermüdliche Hilfe bei der Berechnung des gemischt-linearen Modells.

Ein großer Dank geht des Weiteren an Frau Prof. Dr. Claudia Wickenhauser, Institut für Pathologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für Ihre Zeit bei der Begutachtung der vielen histologischen Färbungen und dem entscheidenden Hinweis, dass MSC zur Erhöhung der Mitoserate in HCT8-Xenografen führen. Damit hat Sie maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Bei meinen Kollegen der „AG Müller“ bedanke ich mich herzlich für das tolle Arbeitsklima! Vielen Dank an Dr. rer. nat. Jana Lützkendorf für Ihre Hilfe in praktischer und theoretischer Hinsicht. Dr. rer. nat. Henrike Caysa, Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, danke ich ganz herzlich für die Hilfe und Geduld bei den Tierversuchen und bei statistischen Fragen. Besonders bedanken möchte ich mich bei Franziska Reipsch für Ihre tatkräftige Unterstützung bei meinen Versuchen, egal zu welcher Tageszeit!

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie, Juana, Fabian und Christian, die auch die anstrengenden Etappen mit mir gegangen sind und dabei immer an mich geglaubt und mich in allen Lebenslagen liebevoll unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 13.05.1985
Geburtsort: Bad Frankenhausen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

09/91 – 06/95 Grundschule Wiehe
09/95 – 06/03 Staatliches Gymnasium Klosterschule Rossleben, Abitur

Studium

10/03 – 10/08 Studium Biochemie an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
04/08 – 10/08 Diplomarbeit am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle,
Abteilung Naturstoff-Biotechnologie, zum Thema
„Charakterisierung einer 12-Hydroxyjasmonat-Sulfotransferase
aus Tomate sowie ihrer Überexpressionslinien“
10/08 Erlangung des akademischen Grades Diplom-Biochemikerin
durch Urkunde und Zeugnis der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

Beruf und Weiterbildung

01/05 – 12/05	Studentische Hilfskraft, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle; Abteilung Naturstoff-Biotechnologie
12/08 – 04/09	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Heinrich-Pette-Institut Hamburg; Arbeitsgruppe Viruspathogenese
seit 05/09	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Klinik für Innere Medizin IV, Hämatologisch-onkologisches Forschungslabor, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Universitätsklinikum Halle/Saale

Zusatzqualifikationen

04/10	Erwerb Sachkundenachweis „Tierschutz / Versuchstierkunde“
08/14	Erwerb Zertifikat „Weiterbildungskurs GMP“

Miriam Widder

Halle (Saale), den

Publikationsliste

Artikel

Koppensteiner H, Höhne K, Gondim MV, Gobert F, Widder M, Gundlach S, Heigele A, Kirchhoff F, Winkler M, Benaroch P, Schindler M (2014) Lentiviral Nef suppresses iron uptake in a strain specific manner through inhibition of Transferrin endocytosis. *RETROVIROLOGY* 11:1.

Mueller LP, Luetzkendorf J, Widder M, Nerger K, Caysa H, Mueller T (2011) TRAIL-transduced multipotent mesenchymal stromal cells (TRAIL-MS-C) overcome TRAIL resistance in selected CRC cell lines *in vitro* and *in vivo*. *CANCER GENE THERAPY* 18:229–239

Kurze C, Le Conte Y, Dussaubat C, Erler S, Kryger P, Lewkowski O, Mueller T, Widder M, Moritz RF (2015) Genetic manipulation of apoptosis in host-parasite coevolution in honeybees? [Manuskript zur Begutachtung für Publikation eingereicht]

Widder M, Luetzkendorf J, Caysa H, Unverzagt S, Wickenhauser C, Benndorf RA, Schmoll HJ, Mueller-Tidow C, Mueller T, Mueller LP (2015) Multipotent mesenchymal stromal cells promote tumor growth in distinct colorectal cancer cells by a β 1 integrin-dependent mechanism. [Manuskript zur Begutachtung für Publikation eingereicht]

Tagungsbeitrag

Widder M, Caysa H, Luetzkendorf J, Schmoll HJ, Mueller-Tidow C, Mueller T, Mueller LP. „Multipotent mesenchymal stromal cells specifically support tumor formation of colorectal carcinoma cells by a β 1-integrin dependent mechanism.“ DGHO Jahrestagung 2014 Hamburg; *Oncology Research and Treatment* 37 (Suppl. 5) V353