

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. med. C. Müller-Tidow)

## **Spezifischer Einfluss multipotenter Stromazellen auf die Zytostatikasensitivität kolorektaler Karzinomzellen**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Ala Jamous  
geboren am 11.02.1988 in Dresden

Betreuer: PD Dr. med. L. P. Müller

Gutachter: PD Dr. med. L. P. Müller  
Prof. Dr. med. W. Ballhausen  
Prof. Dr. med. W. Wagner (Aachen)

12.07.2016

30.01.2017

## REFERAT

Nicht-maligne transformierte Zellen sind aktive Protagonisten in der Kanzerogenese. Ihr Einfluss auf Tumorzellen umschließt die Förderung von Wachstum, Malignisierung und Metastasierung sowie die Vermittlung von Resistenzen gegenüber Tumorthapeutika. In Karzinomen konnte die Vermittlung dieser Effekte durch tumorassoziierter Fibroblasten, welche u. a. aus multipotenten Stromazellen (MSC) hervorgehen, gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zytostatikasensitivität von MSC und der Einfluss von MSC auf die Zytostatikasensitivität, die Proliferation und die Morphologie kolorektaler Karzinomzellen untersucht. Als Vergleichskontrolle dienten humane Kolonfibroblasten. Es wurden Modelle der direkten Kokultur sowie konditionierte Medien von MSC und Kolonfibroblasten jeweils im Monolayer und im dreidimensionalen Sphäroidmodell angewandt. Als Zytostatikum wurde 5-Fluorouracil (5-FU) verwendet. Mittels Zellzyklusanalyse und Ermittlung der  $IC_{50}$  der Tumorzellen wurde deren Zytostatikasensitivität untersucht.

Für MSC konnte im Vergleich zu Kolonfibroblasten und Tumorzellen eine erhöhte Resistenz gegenüber diversen Zytostatika gezeigt werden. Im Monolayer wurde bei Präsenz von MSC und Kolonfibroblasten eine erhöhte 5-FU-Resistenz der Tumorzelllinie HCT8 gezeigt, jedoch nicht der Tumorzelllinie DLD1. Die Kolonfibroblasten vermittelten diese Resistenz über die basale Sekretion löslicher Faktoren und über die Suppression bzw. Verzögerung des 5-FU-bedingten Zellzyklusarrests der HCT8-Zellen. Dies erfolgte ebenfalls durch konditioniertes Medium der MSC. In der direkten Kokultur mit MSC war die 5-FU-Resistenz der HCT8-Zellen jedoch nicht mit der Modulierung des Zellzyklus assoziiert. Daher wird der Übergang von MSC in einen alterierten Zustand angenommen, mit einer Resistenzvermittlung über weitere Mechanismen, die über die basale Sekretion löslicher Faktoren hinausgehen. Im Sphäroidmodell der DLD1-Zellen wurde keine Resistenzvermittlung durch MSC und Kolonfibroblasten beobachtet, jedoch eine Zunahme der Sphäroidgröße. Darüber hinaus zeigten Tumorzellen bei direkter und indirekter Kokultur mit MSC und Kolonfibroblasten morphologische Veränderungen, welche bei der epithelial-mesenchymalen Transition gesehen werden.

Zusammenfassend vermitteln MSC einen Tumorzellen-spezifischen und im Vergleich zu humanen Kolonfibroblasten differentiellen Einfluss auf die 5-FU-Sensitivität von kolorektalen Karzinomzellen. Die Identifikation der zugrundeliegenden Mechanismen könnte therapeutische Zielstrukturen aufzeigen und mittels neuer Therapeutika zur Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber Tumorthapeutika beitragen.

Jamous, Ala: Spezifischer Einfluss multipotenter Stromazellen auf die Zytostatikasensitivität kolorektaler Karzinomzellen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 75 Seiten, 2016

**INHALTSVERZEICHNIS**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>   | <b>V</b>  |
| <b>1 Einleitung</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Multipotente Stromazellen  | 1         |
| 1.1.1 Charakterisierung der MSC und ihre Stammzeleigenschaften   | 1         |
| 1.1.2 Vorkommen von MSC im humanen Organismus, ihre physiologische Funktion und die Isolierung für medizinische Zwecke | 2         |
| 1.2 Das kolorektale Karzinom (CRC)   | 2         |
| 1.2.1 Medizinische Bedeutung des CRC   | 2         |
| 1.2.2 Karzinogenese und Pathophysiologie des CRC   | 3         |
| 1.2.3 Therapieoptionen bei der Behandlung des CRC  | 4         |
| 1.3 Die Rolle des Tumorstromas in der Kanzerogenese  | 5         |
| 1.3.1 Zusammensetzung des Tumorstromas   | 5         |
| 1.3.2 Beteiligung der MSC am Tumorstroma und speziell im CRC   | 6         |
| 1.3.3 Multizelluläre Sphäroide als Modell der Tumor-Stroma-Interaktion und der Therapeutikawirksamkeit                 | 7         |
| 1.4 Tumorthapeutika und zelluläre Reaktionsmechanismen   | 8         |
| 1.4.1 Zellzyklusregulation   | 8         |
| 1.4.2 Wirkung von 5-Fluorouracil   | 8         |
| 1.4.3 Resistenzentstehung gegenüber Tumorthapeutika  | 9         |
| <b>2 Zielstellung</b>  | <b>11</b> |
| <b>3 Material und Methodik</b>   | <b>12</b> |
| 3.1 Materialien  | 12        |
| 3.1.1 Zellen   | 12        |
| 3.1.2 Antikörper   | 12        |
| 3.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Zytostatika  | 12        |
| 3.1.4 Formulierung verwendeter Medien, Puffer und Lösungen   | 13        |
| 3.1.5 Verbrauchsmaterialien  | 14        |
| 3.1.6 Geräte und Software  | 14        |

---

---

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.2      | Zellkultur im Monolayer  | 15        |
| 3.2.1    | Herkunft der MSC   | 15        |
| 3.2.2    | Kultivierung der Tumorzellen, CCD18 und MSC  | 15        |
| 3.2.3    | Kryokonservierung und Auftauen von Zellen  | 16        |
| 3.2.4    | Gewinnung konditionierter Medien   | 16        |
| 3.2.5    | Direkte zweidimensionale Kokultur von CRC-Zellen und Stromazellen  | 16        |
| 3.3      | SRB-Assay  | 17        |
| 3.3.1    | Prinzip des SRB-Assays   | 17        |
| 3.3.2    | Wachstumskinetik   | 17        |
| 3.3.3    | Zytotoxizitätsanalyse von MSC und CCD18  | 18        |
| 3.3.4    | Zytotoxizitätsanalyse von CRC-Zellen in konditionierten Medien   | 19        |
| 3.3.5    | Bestimmung von $IC_{50}$ und $IC_{90}$   | 19        |
| 3.4      | Zellkultur im Sphäroidmodell   | 19        |
| 3.4.1    | Prinzip der Generierung von Sphäroiden   | 19        |
| 3.4.2    | Direkte dreidimensionale Kokultur von CRC-Zellen und Stromazellen  | 20        |
| 3.4.3    | Dreidimensionale Kultur von CRC-Zellen in konditionierten Medien   | 20        |
| 3.4.4    | Bestimmung der Sphäroidgröße mittels APH-Assay   | 20        |
| 3.5      | Durchflusszytometrische Analysen   | 21        |
| 3.5.1    | Prinzip der Durchflusszytometrie   | 21        |
| 3.5.2    | Auftrennung von CRC-Zellen und Stromazellen nach direkter zweidimensionaler Kokultur                         | 21        |
| 3.5.3    | Zellzyklusanalyse unter Auftrennung von CRC-Zellen und Stromazellen nach direkter zweidimensionaler Kokultur | 22        |
| 3.6      | Statistische Analyse   | 23        |
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse</b>  | <b>24</b> |
| 4.1      | Zytostatikasensitivität von MSC und CCD18  | 24        |
| 4.1.1    | Wachstumskinetiken von MSC und CCD18   | 24        |
| 4.1.2    | MSC zeigen im Vergleich zu CCD18 eine erhöhte 5-FU-Resistenz   | 24        |
| 4.1.3    | MSC zeigen im Vergleich zu CCD18 eine erhöhte Oxaliplatin- und Cisplatin-Resistenz                           | 25        |
| 4.1.4    | MSC zeigen im Vergleich zu CCD18 keine veränderte Etoposid-Sensitivität                                      | 25        |

---

---

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 4.1.5    | MSC zeigen im Vergleich zu CCD18 und ausgewählten Tumorzellen eine Resistenz gegenüber diversen Zytostatika                           | 26        |
| 4.2      | Wachstumsverhalten und 5-FU-Sensitivität von CRC-Zellen bei direkter und indirekter Kokultur mit MSC und CCD18 im Monolayer           | 27        |
| 4.2.1    | MSC und CCD18 vermitteln bei direkter Kokultur mit HCT8-Zellen eine 5-FU-Resistenz  | 27        |
| 4.2.2    | MSC und CCD18 vermitteln bei direkter Kokultur mit DLD1-Zellen eine Wachstumsförderung, die unter 5-FU-Behandlung persistiert         | 29        |
| 4.2.3    | Konditionierte Medien von MSC und CCD18 vermitteln ein differentielles Wachstumsverhalten von HCT8- und DLD1-Zellen                   | 31        |
| 4.3      | Wachstumsverhalten und 5-FU-Sensitivität von CRC-Zellen bei direkter und indirekter Kokultur mit MSC und CCD18 im Sphäroidmodell      | 33        |
| 4.3.1    | MSC und CCD18 bilden in direkter Kokultur und bei 5-FU-Behandlung Sphäroide mit DLD1-Zellen   | 34        |
| 4.3.2    | Konditionierte Medien von MSC und CCD18 vermitteln eine Wachstumsförderung von DLD1-Sphäroiden, die unter 5-FU-Behandlung persistiert | 36        |
| 4.4      | Zellzyklusanalyse von CRC-Zellen bei direkter und indirekter Kokultur mit MSC und CCD18 und Behandlung mit 5-FU                       | 37        |
| 4.4.1    | CCD18 supprimieren im Gegensatz zu MSC den 5-FU-bedingten Zellzyklusarrest von HCT8-Zellen in direkter Kokultur                       | 37        |
| 4.4.2    | Konditionierte Medien von MSC und CCD18 supprimieren den 5-FU-bedingten Zellzyklusarrest von HCT8-Zellen                              | 40        |
| <b>5</b> | <b>Diskussion</b>   | <b>42</b> |
| 5.1      | Wesentliche Resultate   | 42        |
| 5.2      | Die spezifische Zytostatikaresistenz von MSC gegenüber CCD18  | 43        |
| 5.3      | Die spezifische Vermittlung einer Wachstumsförderung der CRC-Zellen durch MSC und CCD18   | 44        |
| 5.4      | MSC und CCD18 bewirken eine spezifische Therapeutikaresistenz von CRC-Zellen  | 46        |
| 5.4.1    | Die klinische Bedeutung der Therapeutikaresistenz im CRC-Modell   | 46        |
| 5.4.2    | Die Aktivierung von Stromazellen durch Tumorzellen und Tumorthapeutika  | 47        |

---

|   |           |
|---|-----------|
| Inhaltsverzeichnis  | IV        |
| 5.4.3 Die Mediatoren einer Therapeutikaresistenz und die beteiligten Signalwege   | 49        |
| 5.4.4 Eine mögliche Therapeutikaresistenz durch eine antagonistisierende Wirkung der Stromazellen   | 50        |
| 5.5 Das Sphäroidmodell zur Untersuchung des Einflusses von Stromazellen auf das Wachstumsverhalten und die Zytostatikasensitivität von CRC-Zellen | 51        |
| 5.6 Die Veränderung der Morphologie der CRC-Zellen als Zeichen einer möglichen epithelial-mesenchymalen Transition                                | 53        |
| 5.7 Stärken und Schwächen der Arbeit  | 55        |
| <b>6 Zusammenfassung</b>  | <b>57</b> |
| <b>Literaturverzeichnis</b>   | <b>58</b> |
| <b>Thesen</b>   | <b>70</b> |
| <b>Anlagen</b>  | <b>72</b> |
| Abbildungen und Tabellen  |           |
| Tabellarischer Lebenslauf   |           |
| Selbstständigkeitserklärung   |           |
| Erklärung über frühere Promotionsversuche   |           |
| Danksagung  |           |

---

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Enzymbezeichnungen, Länder, SI-Einheiten sowie Chemikalien, Puffer und Medien werden hier nicht aufgeführt. In der englischsprachigen Fachliteratur gängige Termini sowie deren Abkürzungen werden bei erstmaliger Erwähnung erklärt und darauffolgend verwendet.

|                      |  |
|----------------------|--|
| 5-FdUMP              | 5-Fluordesoxyuridinmonophosphat  |
| 5-FdUTP              | 5-Fluordesoxyuridintriphosphat   |
| 5-FU                 | 5-Fluorouracil   |
| 5-FUTP               | 5-Fluorouridintriphosphat  |
| A. dest.             | Aqua destillata  |
| Abb.                 | Abbildung  |
| ABC                  | ATP-bindende Kasette ( <i>ATP binding cassette</i> )                             |
| AK                   | Antikörper   |
| APH                  | saure Phosphatase ( <i>acidic phosphatase</i> )                                  |
| ATCC                 | <i>American Type Culture Collection</i>  |
| bFGF                 | basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor ( <i>basic fibroblast growth factor</i> ) |
| BSA                  | bovines Serumalbumin   |
| CCD18                | humane Kolonfibroblasten, CCD-18Co   |
| CD                   | Differenzierungscluster ( <i>cluster of differentiation</i> )                    |
| DDP                  | Cisplatin, cis-diamin(dichloro)platin(II)  |
| Cdk                  | Cyclin-abhängige Kinase ( <i>cyclin-dependend-kinase</i> )                       |
| CFU-F                | <i>colony-forming-units fibroblasts</i>  |
| CIMP                 | CpG-Insel-Methylierungsphänotyp  |
| CKI                  | Cdk-Inhibitor  |
| CM                   | konditioniertes Medium ( <i>conditioned medium</i> )                             |
| CRC                  | kolorektales Karzinom ( <i>colorectal carcinoma</i> )                            |
| CRC+CM <sub>SZ</sub> | CRC-Zellen kultiviert in Stromazellen-CM   |
| CRC+SZ               | CRC-Zellen in direkter Kokultur mit Stromazellen                                 |
| CTx                  | Chemotherapie, Tumorthapeutikum  |
| DNA                  | Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )                          |
| DsRed                | Rotes Fluoreszenzprotein ( <i>Discosoma red fluorescent protein</i> )            |
| EGF                  | Epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> )                   |
| EMT                  | Epithelial-mesenchymale Transition   |
| EZM                  | Extrazellulärmatrix  |

---

---

|          |  |
|----------|--|
| FACS     | <i>fluorescence activated cell sorting</i>                           |
| FAP      | familiäre adenomatöse Polyposis coli                                 |
| FGF      | Fibroblasten-Wachstumsfaktor ( <i>fibroblast growth factor</i> )     |
| FITC     | Fluorescein-isothiocyanat  |
| FKS      | fetales Kälberserum  |
| FSC      | Vorwärtsstreulicht ( <i>forward scatter</i> )                        |
| GFP      | Grün fluoreszierendes Protein  |
| HLA      | humanes Leukozytenantigen  |
| HGF      | Hepatozyten-Wachstumsfaktor ( <i>hepatocyte growth factor</i> )      |
| HNPCC    | Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom                      |
| IC       | inhibitorische Konzentration ( <i>inhibitory concentration</i> )     |
| KGF      | Keratinozyten Wachstumsfaktor ( <i>keratinocyte growth factor</i> )  |
| MSC      | multipotente Stromazelle, mesenchymale Stammzelle                    |
| MW       | Mittelwert   |
| <i>n</i> | Stichprobenumfang  |
| NEAA     | nicht-essenzielle Aminosäuren ( <i>nonessential amino acids</i> )    |
| NRG-1    | Neuregulin-1   |
| OD       | optische Dichte  |
| PDT      | Populationsverdopplungszeit ( <i>population doubling time</i> )      |
| PI       | Propidiumiodid   |
| PIFA     | Platin-induzierte Fettsäuren ( <i>platinum-induced fatty acids</i> ) |
| PKI      | Proteinkinase-Inhibitor  |
| pNPP     | para-Nitrophenylphosphat   |
| RKI      | Robert Koch Institut   |
| RNA      | Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )                         |
| RNase    | Ribonuklease   |
| RT       | Raumtemperatur   |
| SD       | Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )                     |
| SDF-1    | <i>stromal cell-derived factor 1</i>                                 |
| SF       | löslicher Faktor ( <i>soluble factor</i> )                           |
| SRB      | Sulforhodamin B  |
| SSC      | Seitwärtsstreulicht ( <i>sideward scatter</i> )                      |
| SZ       | Stromazellen   |
| Tab.     | Tabelle  |
| TAF      | tumorassoziierte Fibroblasten  |
| TGCT     | testikulärer Keimzelltumor ( <i>testicular germ-cell tumor</i> )     |

---



---

|      |  |
|------|--|
| TGF  | Transformierender Wachstumsfaktor ( <i>transforming growth factor</i> )                |
| TNF  | Tumornekrosefaktor   |
| UTP  | Uridintriphosphat  |
| VEGF | vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor ( <i>vascular endothelial growth factor</i> ) |
| wt   | Wildtyp  |

---

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Multipotente Stromazellen

#### 1.1.1 Charakterisierung der MSC und ihre Stammzelleigenschaften

Friedenstein *et al.* (1966) erwähnten als erste Stromazellen des murinen Knochenmarks, welche *in vivo* in der Lage waren, osteogen zu differenzieren. Das klonale und plastikadhärente Wachstum dieser Zellen *in vitro* führte zur Bezeichnung *colony-forming-units-fibroblasts* (CFU-F) (Friedenstein *et al.* 1970). Durch die Entdeckung ihrer multipotenten Differenzierbarkeit in Chondrozyten und weitere mesodermale Zellpopulationen erfolgte die Namensänderung in „mesenchymale Stammzellen“ (MSC) (Caplan 1991). In den folgenden Jahren wurde das Vorkommen von MSC in verschiedenen Geweben gezeigt. Die fehlende generelle Nachweisbarkeit von Stammzelleigenschaften aller isolierten MSC führte letztlich zur Bezeichnung „multipotente Stromazellen“. Der Begriff mesenchymale Stammzelle bleibt aktuell der Subpopulation mit Stammzelleigenschaften vorbehalten, während das Akronym MSC beide Zellpopulationen umschließt (Horwitz *et al.* 2005).

Für die Definition der MSC wurden von Dominici *et al.* (2006) als Minimalkonsensus folgende Eigenschaften empfohlen:

- (1) die Plastikadhärenz der Zellen
- (2) die Oberflächenexpression von CD73, CD90, CD105 bei 95 % der Zellen sowie das Fehlen der hämatologischen Antigene CD34, CD45, CD14 oder CD11b, CD79 $\alpha$  oder CD19 sowie HLA-DR bei 98 % der Zellen
- (3) die Differenzierung in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten *in vitro*

Als Oberflächenmarker finden sich zudem CD29, CD44, CD51, CD166 und Stro-1 (Kidd *et al.* 2008) und weitere, deren Expression teilweise mit dem Differenzierungspotential der MSC korreliert. Ein unikater Marker wurde bisher jedoch nicht gefunden (Pevsner-Fischer *et al.* 2011).

Die Differenzierbarkeit der MSC umschließt gegenwärtig mehr Zellpopulationen als im Minimalkonsensus gefordert, so u. a. Myozyten (Wakitani *et al.* 1995). Aber auch die Transdifferenzierung über die Keimblattgrenzen hinweg konnte gezeigt werden, u. a. in neuronale Zellen (Koh *et al.* 2008), Astrozyten (Kopen *et al.* 1999), kardiale Zellen (Pijnappels *et al.* 2008), Insulin-produzierende Zellen (Dave *et al.* 2012) und Hepatozyten (Bornstein *et al.* 2012).

---

### 1.1.2 Vorkommen von MSC im humanen Organismus, ihre physiologische Funktion und die Isolierung für medizinische Zwecke

MSC bilden einen Anteil von 0,001 bis 0,01 % der nukleären Zellen des Knochenmarks (Pittenger *et al.* 1999). Sie konnten ebenfalls aus dem Skelettmuskel (Jackson *et al.* 2010), Bindegewebe der Haut (Vaculik *et al.* 2012), Nabelschnurblut (Bieback *et al.* 2004; Lee *et al.* 2004) und Fettgewebe (Zuk *et al.* 2001) isoliert werden. Es wird angenommen, dass sie als Perizyten des Gefäßsystems in allen Geweben vorkommen (Crisan *et al.* 2008). Die Zirkulation im peripheren Blut ist dagegen umstritten (Fox *et al.* 2007), wurde jedoch bei Patienten mit Malignomen beschrieben (Bian *et al.* 2009; Roodhart *et al.* 2011). Weiterhin gelten MSC als resistent gegenüber Tumorthérapeutika und können selbst nach myeloablativer Chemotherapie aus dem Knochenmark isoliert werden (Mueller *et al.* 2006).

Aus den bisherigen Untersuchungen zur Biologie der MSC folgert Caplan, dass MSC für den Gewebshaushalt des adulten Mesenchyms zuständig sind und dieser Funktion insbesondere als Perizyten der Gewebskapillaren nachkommen (Caplan und Correa 2011). Ebenso konnte über die Integration der MSC in inflammatorische Areale eine Beteiligung am Entzündungsgeschehen gezeigt werden. Dabei wirkten sie angiogenetisch, antiinflammatorisch, immunmodulatorisch, zytoprotektiv und gewebsregenerierend (Singer und Caplan 2011; DiMarino *et al.* 2013). Durch ihre geringe Expression von kostimulatorischen Molekülen und HLA-I sowie der fehlenden HLA-II Expression gelten MSC als immunologisch privilegiert. Weiterhin nehmen sie Einfluss auf das angeborene und erworbene Immunsystem (English 2013).

Als wichtigstes Verfahren zur Isolierung von MSC zählt die Knochenmarksaspiration mit anschließender Dichtegradientenzentrifugation, Selektion plastikadhärenter MSC und Expansion (Mueller *et al.* 2006). *Ex vivo* durchlaufen MSC abhängig vom Alter des Spenders mindestens 15 Populationsverdopplungen mit nur geringer spontaner Differenzierung (Digirolamo *et al.* 1999; Pittenger *et al.* 1999).

## 1.2 Das kolorektale Karzinom (CRC)

### 1.2.1 Medizinische Bedeutung des CRC

Im Jahr 2012 war das CRC weltweit mit ca. 1,4 Mio. Neuerkrankten die dritthäufigste Krebserkrankungen (Ferlay *et al.* 2015). Im selben Zeitraum traten laut Zentrum für Krebsregisterdaten in Deutschland insgesamt ca. 62 000 neue maligne Erkrankungen des Darms auf. Damit bilden sie nach Prävalenz die zweithäufigste Krebserkrankung bei Frauen und die dritthäufigste bei Männern (Lebenszeitrisiko 5,7 % bzw. 6,9 %) (RKI 2015).

---

An malignen Erkrankungen des Darms nimmt das CRC den überwiegenden Anteil ein, wobei beim CRC zu ca. zwei Drittel das Kolon und ca. einem Drittel das Rektum betroffen ist. Als Risikofaktoren für die Entstehung des CRC zählen Ernährungs- und Lebensgewohnheiten, die vorwiegend in den Industrienationen vorzufinden sind, womit auch die höhere Prävalenz in diesen Ländern begründet wird. Zu den Risikofaktoren zählen Alkohol- und Tabakkonsum, der regelmäßige Verzehr von rotem Fleisch, ballaststoffarme Ernährung, Bewegungsmangel, vorwiegend sitzende Tätigkeit und Adipositas (Khan *et al.* 2010).

Mit einem mittleren Erkrankungsalter über 70 Jahren ist das CRC eine Erkrankung des älteren Menschen. Durch die relative 5-Jahresüberlebensrate von ca. 63 % über alle Tumorstadien und für beide Geschlechter ist das CRC als Krebserkrankung mit mittlerer Prognose einzustufen (RKI 2015).

### 1.2.2 Karzinogenese und Pathophysiologie des CRC

Mehrheitlich handelt es sich beim CRC um Adenokarzinome. In 95 % der Fälle tritt es durch neu erworbene Genmutationen auf und wird daher als sporadisches CRC bezeichnet. Hierbei findet sich in einem Fünftel der Fälle eine familiäre Häufung, einem definierten hereditären Syndrom sind diese jedoch nicht zuzuordnen. Dagegen findet sich bei 5 % der Patienten mit CRC eine hereditäre Ursache. Am häufigsten treten die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre nicht-polypöse CRC auf (HNPCC, Lynch-Syndrom) (Al-Sohaily *et al.* 2012). Weiterhin ist die Entwicklung eines CRC aus einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung möglich (Andersen und Jess 2013). Bestimmte Mutationen sind bei dem sporadischen und familiären CRC anzutreffen, sodass die Betrachtung betroffener Zielstrukturen hier gemeinsam erfolgt.

Den Grundstein zum Verständnis der Entstehung eines CRC bildet die Adenom-Karzinom-Sequenz, der eine Abfolge mehrerer genetischer Veränderungen zugrunde liegt (Vogelstein *et al.* 1988). Die Neoplasie entsteht durch die mutationsbedingte Aktivierung von Proto-onkogenen oder die Deaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Zur Bildung eines invasiven Karzinoms ist die Mutation weiterer vier bis fünf Gene nötig, wobei nicht die Reihenfolge des Auftretens der Mutationen das biologische Verhalten des Tumors bestimmt, sondern deren Akkumulation (Fearon und Vogelstein 1990). Da die Mutationen Gene der Zellwachstumsregulierung betreffen, spricht man vom *gatekeeper pathway*.

Jüngere Entdeckungen der molekularen Veränderungen im CRC ergänzen die Vorstellung der pathologischen Abläufe um die epigenetische Promotor-Hypermethylierung (CpG-Insel-Methylierungsphänotyp) sowie die Mikrosatelliteninstabilität, ausgelöst durch defekte *mismatch-repair*-Gene (ursächlich betroffen bei der HNPCC). Die Promotor-Hyper-

---

methylierung führt zur verminderten Expression betroffener Genprodukte, vorwiegend Tumorsuppressorgene, während *mismatch-repair*-Genedefekte zur Akkumulation weiterer Genmutationen führen (Al-Sohaily *et al.* 2012). Aufgrund des Verlustes der Genomstabilität bei *mismatch-repair*-Genmutationen spricht man vom *caretaker pathway*.

Beim sporadischen CRC findet sich eine Mikrosatelliteninstabilität in ca. 15 % der Fälle (Walther *et al.* 2009), weshalb davon ausgegangen wird, dass *gatekeeper* und *caretaker pathway* in der Karzinogenese des CRC gemeinsam betroffen sein können (Arends 2013).

Ein häufig anzutreffender Pathomechanismus im *gatekeeper pathway* ist der Verlust eines Allels und damit der Heterozygotie (*loss of heterozygosity*) des betroffenen Gens. Als mögliche betroffene Strukturen sollen hervorgehoben werden:

- *APC* Tumorsuppressorgen mit  $\beta$ -Catenin/Wnt-Signalweg; betroffen bei 90 % der CRC-Patienten (Walther *et al.* 2009) und früh in der Adenomentstehung aberrant (Gaedcke *et al.* 2011), ursächlich defekt bei der FAP
- *TP53* Tumorsuppressorgen, betroffen bei 75 % der CRC-Patienten und als Schlüsselmutation beim Übergang vom Adenom zum Karzinom angesehen (Al-Sohaily *et al.* 2012)
- *KRAS* Protoonkogen mit dem am selben Signalweg beteiligten *BRAF*-Gen; zeitig in der Adenom-Karzinom-Sequenz mutiert, betroffen bei 30 – 60 % der CRC- und Adenompatienten (Al-Sohaily *et al.* 2012)

Die Betrachtung molekularer Veränderungen beim CRC-Patienten ist daher klinisch relevant zur pathologischen Bewertung der Tumordignität mit der daraus resultierenden Therapieplanung.

### 1.2.3 Therapieoptionen bei der Behandlung des CRC

Zur Behandlung des CRC stehen stadienabhängig die Tumorchirurgie, die Strahlentherapie und die internistisch-onkologische Therapie zur Verfügung. Die Einteilung des Befundes erfolgt anhand der UICC-Klassifikation. Zeigen sich keine Fernmetastasen und lässt der Lokalbefund eine kurative Entfernung zu, wird eine radikale Resektion angestrebt. Stadienabhängig erfolgt die Gabe adjuvanter oder neoadjuvanter Chemotherapie. Bei Metastasierung oder einem ausgeprägtem Befund kann durch neoadjuvante Chemotherapie ein *downstaging* bzw. *downsizing* versucht werden, um die Operabilität herzustellen. Ist dies nicht möglich, können Lokalverfahren angewendet (z. B. Kryotherapie, Radiotherapie) oder ein palliatives Vorgehen mit Chemotherapie eingeschlagen werden (DGHO Leitlinie des CRC unter [www.onkopedia.com](http://www.onkopedia.com) [24.04.2016]).

Seit 5-Fluorouracil (5-FU) in den 1950ern synthetisiert wurde, war es fast 40 Jahre lang das einzige zugelassene Therapeutikum für das fortgeschrittene CRC und der adjuvanten Chemotherapie von CRC-Frühestadien. Die klinische Ansprechrate war bei Monotherapie gering, weshalb 5-FU zusammen mit weiteren Zytostatika appliziert wurde. Die Kombination mit Leucovorin und Irinotecan (FOLFIRI-Schema), bzw. Leucovorin und Oxaliplatin (FOLFOX-Schema) sowie die Modifikation der Darreichungsform und der Therapieintervalle, verbesserten die Ansprechraten im metastasierten CRC deutlich, so dass die mittlere Überlebenszeit über die letzten Jahrzehnte gesteigert werden konnte.

An modernen Therapeutika werden gegenwärtig zusätzlich monoklonale Antikörper eingesetzt. So führt die Anwendung des anti-VEGF Antikörpers Bevacizumab zu einer Verlängerung des Gesamtüberlebens. Abhängig vom molekulargenetischen Status des Tumors werden des Weiteren anti-EGFR Antikörper (Cetuximab, Panitumumab) bei Patienten mit Wildtyp-*KRAS* angewandt mit einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens. Rückgrat der CRC-Therapie bleibt jedoch 5-FU (Longley *et al.* 2003; Chu 2007).

### 1.3 Die Rolle des Tumorstromas in der Kanzerogenese

#### 1.3.1 Zusammensetzung des Tumorstromas

Ein Tumor setzt sich zusammen aus heterogen maligne-transformierten Tumorzellen sowie dem Tumorstroma, bestehend aus Extrazellulärmatrix (EZM), nicht-maligne-transformierten Zellen der direkten Nachbarschaft und eingewanderten nicht-maligne-transformierten Zellen. Im Tumor herrschen daher organähnliche Strukturen, wobei nicht-maligne-transformierte Zellen und EZM eine abnormale Komposition und Funktion zeigen (Egeblad *et al.* 2010). Grundlage der dynamischen Wechselwirkung im Tumor ist die Kommunikation aller beteiligten Zellen und der EZM vor allem über Zelladhäsionsmoleküle und lösliche Faktoren. So konnte ein aktiver Beitrag des Tumorstromas insbesondere an der Tumorentstehung und -progression aufgezeigt werden. Die Vielfalt Tumorstroma-vermittelter Effekte umschließt die epithelial-mesenchymale-Transition (EMT) und die Modulation von Migrations-, Invasions- und Metastasierungsverhalten der Tumorzellen sowie Neovaskularisierung, Apoptosereduktion und Therapeutikaresistenz (CTx-Resistenz) (Meads *et al.* 2009; Ungefroren *et al.* 2011).

Das Tumorstroma besteht u. a. aus Gewebsfibroblasten, tumorassoziierten Fibroblasten (TAF), tumorassoziierten Makrophagen, Endothelzellen sowie Zellen des Immunsystems (Pollard 2004; Tripathi *et al.* 2012). Der Großteil der Tumorstromazellen wird durch TAF gebildet, deren Herkunft u. a. aus Gewebsfibroblasten und stromalen Progenitorzellen angenommen wird (Tripathi *et al.* 2012; Paraiso und Smalley 2013).

---

### 1.3.2 Beteiligung der MSC am Tumorstroma und speziell im CRC

Eine Rekrutierung von MSC in das Tumorstroma wird aus dem Knochenmark, dem benachbarten Fettgewebe und den Perizyten des Gefäßsystems angenommen (Kidd *et al.* 2008; Hanahan und Coussens 2012). Für die Rekrutierung wird ein durch die Tumore exprimiertes Zytokinprofil ähnlich entzündlicher Prozesse verantwortlich gemacht (Johann und Müller 2015). MSC differenzieren u. a. in Zellen mit TAF-typischen Merkmalen und können sich darüber an der Bildung des Tumorstromas (Spaeth *et al.* 2009; Quante *et al.* 2011; Kidd *et al.* 2012) aber auch als Endothelzellen und Perizyten am Gefäßsystem des Tumors beteiligen (Barcellos-de-Souza *et al.* 2013). In der Mehrzahl der experimentellen Tumormodelle wurde ein fördernder Einfluss der MSC auf Angiogenese, Tumorformierung und Tumorwachstum (Shinagawa *et al.* 2010), Migration, Invasion und Metastasierung (Karnoub *et al.* 2007) sowie auf Apoptose- und CTx-Resistenz (Roodhart *et al.* 2011) gezeigt. Damit beeinflussen MSC alle *hallmarks of cancer* (Hanahan und Weinberg 2011).

Der Mechanismus MSC-vermittelter Effekte auf Tumorzellen wird weitestgehend über lösliche Faktoren angenommen (Houthuijzen *et al.* 2012; Zimmerlin *et al.* 2013), wobei sich eine Abhängigkeit von den verwendeten MSC-Zellzahlen und Zellrelationen, den Kulturbedingungen, der Herkunft der MSC und dem experimentellen Modell zeigte (Lazennec und Jorgensen 2008; Luetzkendorf *et al.* 2010; Klopp *et al.* 2011). Die Abhängigkeit dieser Effekte wiederum von der Art der Tumorzellen sowie der daran beteiligten Mechanismen wurden in nur wenigen Modellen untersucht (Mishra *et al.* 2008; Borghese *et al.* 2013; Jacamo *et al.* 2014). Weiterhin sind Exosomentransfers durch MSC und deren Bedeutung Gegenstand aktueller Diskussionen (Katsuda *et al.* 2013; Lavoie und Rosu-Myles 2013).

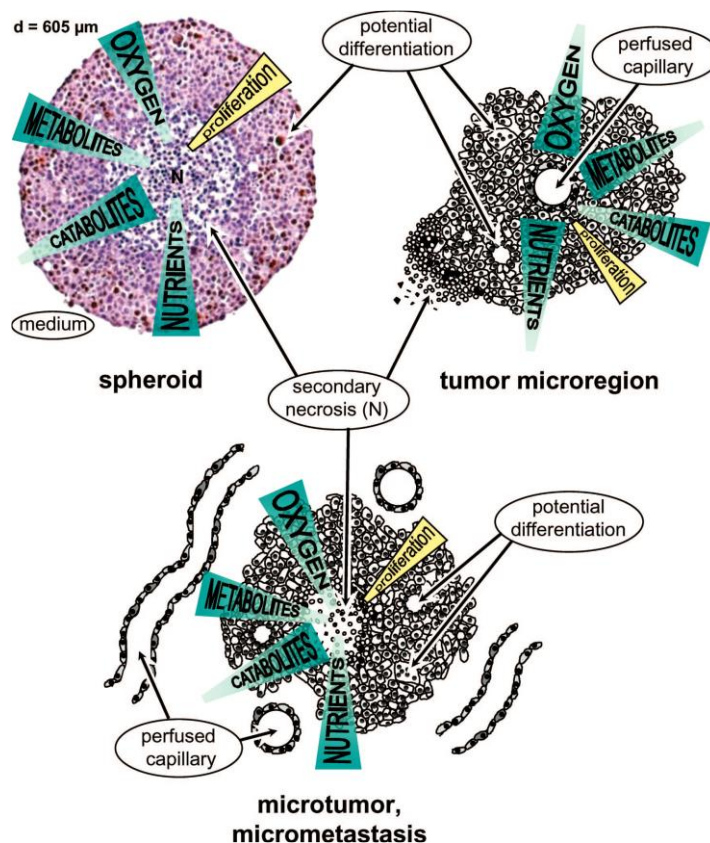
Speziell für das CRC wurde gezeigt, dass MSC aus Tumorresektaten isoliert werden können (Lin *et al.* 2013). Aggressivere Krankheitsverläufe und ein verringertes Überleben sind im CRC mit erhöhten stromalen Markern in Resektaten assoziiert (Henry *et al.* 2007; Tsujino *et al.* 2007; Nishida *et al.* 2012). Für klinisch metastasenfreie CRC-Patienten konnte weiterhin gezeigt werden, dass im Knochenmarksaspirat quieszente Tumorzellen vorzufinden sind (Pantel *et al.* 1993). Das Mikromilieu im Bereich metastasierter Tumorzellen wird vermutlich durch nicht-maligne-transformierte Zellen bereitgestellt und als prämetastatische bzw. metastatische Nische bezeichnet. Die Beteiligung von MSC an diesen Nischen konnte bereits gezeigt werden (Li *et al.* 2012). Die Komposition sowie die Bedeutung dieser Nischen für das Metastasenwachstum sind ebenfalls Gegenstand aktueller Untersuchungen (Barcellos-de-Souza *et al.* 2013).

---

### 1.3.3 Multizelluläre Sphäroide als Modell der Tumor-Stroma-Interaktion und der Therapeutikawirksamkeit

Die komplexen Interaktionen der Zellen eines Tumors im menschlichen Körper sind durch *in vitro* Monolayer-Experimente oft nur unzureichend abzubilden. Ein anerkanntes Bindeglied zwischen den klassischen *in vitro* und *in vivo* Versuchen stellt hingegen das Sphäroidmodell dar (Kunz-Schughart 1999).

Die Generierung von Sphäroiden erfolgt mittels *liquid overlay*-Verfahren, um die Adhärenz der Zellen an der Zellkulturoberfläche zu unterbinden. Die Aggregation der Zellen erfolgt unter Bildung von EZM und Ausbildung von interzellulären und Zell-Matrix-Interaktionen. Im Sphäroidquerschnitt herrschen inhomogene Bedingungen, welche durch diverse Gradienten bestimmt werden. Dies qualifiziert multizelluläre Sphäroide als Modell für avaskuläre Tumorregionen bzw. Mikrometastasen (Abb. 1) (Friedrich *et al.* 2007a; 2007b). Die Verwendung von Mischsphäroiden ermöglicht darüber hinaus die Untersuchung von Tumor-Stroma-Interaktionen (Sasser *et al.* 2007; Klopp *et al.* 2010).



**Abb. 1. Multizelluläre Sphäroide zeigen pathophysiologische Eigenschaften und Wachstumscharakteristika von Mikrometastasen und avaskulären Tumorregionen.** Aus Friedrich *et al.* (2007a).

Da Zellproliferation vorwiegend im oberflächennahen Bereich der Sphäroide stattfindet (Fayad *et al.* 2009) und nicht-proliferierende Tumorzellen im Sphäroidzentrum eine CTx-



Resistenz aufwiesen (Mellor *et al.* 2005), eignen sich Sphäroide ebenso zur Untersuchung von Therapeutikawirksamkeit. So konnten Hirschhaeuser *et al.* (2010) die Überlegenheit des Sphäroidmodells gegenüber zweidimensionalen *in vitro* Methoden in der Prädiktion der CTx-Sensitivität *in vivo* zeigen.

## 1.4 Tumortherapeutika und zelluläre Reaktionsmechanismen

### 1.4.1 Zellzyklusregulation

Die Teilung der Zelle verläuft im Zellzyklus vereinfacht über vier Phasen: G<sub>1</sub>, S und G<sub>2</sub> (Gap<sub>1</sub>, Synthese, Gap<sub>2</sub>, diese bilden zusammen die Interphase) sowie M (Mitose). Die Phasenübergänge G<sub>1</sub>/S und G<sub>2</sub>/M sind durch Regulatorproteine gesteuert, welche bei unzureichenden Voraussetzungen einen Arrest des Zellzyklus bewirken. Bei Akkumulation hinreichender zellulärer, mitochondrialer, chromosomaler oder genetischer Schäden ist der Übergang in den programmierten Zelltod (Apoptose) möglich. Die größte Gruppe der Regulatorproteine besteht aus Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), ihren Aktivatoren den Cyclinen sowie CDK-Inhibitoren (Vermeulen *et al.* 2003; Malumbres und Barbacid 2009). Ein weiteres, essentiell an der Zellzyklusregulation beteiligtes Protein ist p53, welches bei DNA-Schäden akkumuliert, u. a. über den CDK-Inhibitor p21 zum Zellzyklusarrest führt und bei zusätzlicher Zellschädigung den Übergang in die Apoptose reguliert (Vousden und Prives 2009).

Um den Zelltod von Tumorzellen herbeizuführen, werden verschiedene Tumortherapeutika angewendet, welche über verschiedene Mechanismen zum Teil direkt im Zellzyklus interferieren, zum Teil über die Akkumulation von Zellschäden zur Apoptose führen.

### 1.4.2 Wirkung von 5-Fluorouracil

Aufgrund der Strukturähnlichkeit mit den Pyrimidinbasen wirkt 5-FU als Antimetabolit in der RNA- und DNA-Synthese. Intrazellulär wird es in 5-Fluordesoxyuridinmonophosphat (5-FdUMP), 5-Fluordesoxyuridintriphosphat (5-FdUTP) und 5-Fluorouridintriphosphat (5-FUTP) umgewandelt. Die Zytotoxizität erfolgt über mehrere Wege (Longley *et al.* 2003):

- RNA-Schäden entstehen durch den Einbau von 5-FUTP anstelle von Uridintriphosphat (UTP).
  - DNA-Schäden entstehen sowohl durch Einbau von 5-FdUTP, als auch durch Inhibition der Thymidylatsynthase durch 5-FdUMP. Letzteres führt zu einer verminderten Thyminproduktion und einem Ungleichgewicht im Nukleotidhaushalt. Dies bedingt
-

Störungen der DNA-Synthese und DNA-Reparatur, die bei Akkumulation zur Apoptose führen.

Abhängig von der Dosis und dem p53-Mutationsstatus führt 5-FU zu einem G<sub>1</sub>- oder G<sub>2</sub>-Arrest oder zur Bildung aberranter Mitosen mit anschließender Apoptose (sog. „mitotische Katastrophe“) (Pizzorno *et al.* 1995; Yoshikawa *et al.* 2001). Eine Resistenz gegenüber 5-FU kann durch erhöhte Expression der Thymidylatsynthase, erhöhte 5-FU-Inaktivierung durch die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase, erhöhten Efflux, verringerten Influx, dem Verlust der p53-Funktion sowie die Überexpression anti-apoptotischer Proteine (z. B. Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1) entstehen (Longley und Johnston 2005; Saleh *et al.* 2013).

#### 1.4.3 Resistenzentstehung gegenüber Tumortherapeutika

Resistenzen gegenüber Tumortherapeutika werden für das Therapieversagen bei über 90 % der Patienten mit metastasierten Erkrankungen verantwortlich gemacht (Longley und Johnston 2005). Sie lassen sich einteilen nach intrinsischen Resistenzen der Tumorzellen und extrinsischen, vermittelt durch das Tumorstroma.

Mechanismen intrinsischer Resistenzen umfassen die verminderte Aufnahme, vermehrte Ausschleusung (Influx/Efflux) und die intrazelluläre Inaktivierung der Therapeutika. Weiterhin führen aberrante Signalkaskaden, Veränderungen der Therapeutika-Zielstrukturen und die Reparatur Therapeutika-bedingter Schäden zur Apoptoseresistenz oder zur unkontrollierten Proliferation (Longley und Johnston 2005).

Zu den Mechanismen der extrinsischen Resistenz zählt zum einen die verminderte Distribution der Therapeutika, abhängig von der Kapillarendichte und -durchlässigkeit, dem Gewebedruck und anatomischen Besonderheiten. Zum anderen nimmt das Tumorstroma protektiven Einfluss auf den Metabolismus der Tumorzellen und moduliert intrazelluläre Signalkaskaden und Detoxifikationsmechanismen (Martinez-Outschoorn *et al.* 2011; McMillin *et al.* 2013).

Eine weitere Untergliederung kann in vorbestehende und erworbene CTx-Resistenzen erfolgen. Erworbene CTx-Resistenzen entstehen zumeist über längere Zeit durch genetische Veränderungen der Tumorzellen, z. B. durch einen Selektionsdruck unter Tumortherapie. Eine Form der vorbestehenden CTx-Resistenz wird durch das Tumorstroma vermittelt, indem Tumorzellen vorübergehend vor Apoptose geschützt werden. Sie wird relativ schnell durch lösliche Faktoren und Zelladhäsionsmoleküle des Tumorstromas vermittelt. Bei der Vermittlung durch Zelladhäsionsmoleküle führt der Integrin-vermittelte Kontakt mit der EZM oder den zellulären Nachbarn zur CTx-Resistenz. Hierbei finden sich vorwiegend nicht-transkriptionale Mechanismen, z. B. die Degradierung von Apoptose-Induktoren oder die

---

Stabilisierung von Apoptose-Suppressoren und Zellzyklus-Regulatorproteinen. Im Gegensatz dazu agiert die durch lösliche Faktoren vermittelte CTx-Resistenz überwiegend über Veränderungen der Transkription der Tumorzellen (Meads *et al.* 2009; Holohan *et al.* 2013)

Diese Einteilungen ermöglichen mechanistische Untergliederungen von CTx-Resistenz. Im Tumor sind sie nicht strikt zu trennen und kommen nebeneinander vor. Die Inhibition der Tumorstroma-vermittelten Resistenz auf transkriptionaler und nicht-transkriptionaler Ebene bietet die Möglichkeit, den Erfolg einzelner Applikationen von Tumorthapeutika zu steigern. Im Weiteren kann dadurch die Heterogenisierung und Malignisierung der Tumorzellen durch eine erworbene CTx-Resistenz unterbunden und der Erfolg weiterer CTx-Applikationen erhöht werden.

---

## 2 ZIELSTELLUNG

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit lagen keine Daten zum Einfluss von MSC auf die CTx-Sensitivität von Tumorzellen im CRC vor. Es war bekannt, dass MSC in Tumore integrieren und an der Bildung des Tumorstromas teilnehmen, sowie dass das Tumorstroma Einfluss auf die CTx-Sensitivität von Tumorzellen nimmt. Für eine MSC-vermittelte CTx-Resistenz lagen Daten in Modellen hämatologischer Malignome vor, sodass sich folgende Hypothesen für die vorliegende Arbeit und das CRC-Modell ergaben:

- MSC weisen eine spezifische CTx-Resistenz gegenüber humanen Kolonfibroblasten auf.
- Im Vergleich zu humanen Kolonfibroblasten, vermitteln MSC eine spezifische 5-FU-Resistenz von CRC-Zellen, abhängig von der CRC-Zelllinie.
- Zur Übertragbarkeit auf die *in vivo* Situation kann die Vermittlung der 5-FU-Resistenz im Sphäroidmodell nachvollzogen werden.
- Die Vermittlung der 5-FU-Resistenz der CRC-Zellen erfolgt durch MSC-sezernierte Faktoren und über die Modulation des Zellzyklus der CRC-Zellen.

Daraus ergaben sich folgende Arbeitsschritte:

- Die Zytostatikasensitivität von MSC und Kolonfibroblasten sollte anhand diverser Zytostatika verglichen werden.
  - Die Vermittlung einer 5-FU-Resistenz der CRC-Zellen durch MSC und Kolonfibroblasten sollte sowohl im zweidimensionalen Monolayer als auch im dreidimensionalen Sphäroidmodell untersucht werden. Zur differenzierenden Analyse sollte die direkte Kokultur verschiedener CRC-Zelllinien mit MSC und Kolonfibroblasten erfolgen sowie die indirekte Kokultur der CRC-Zellen mit konditionierten Medien. Im Monolayer sollten weiterhin die morphologischen Veränderungen der CRC-Zellen bei direkter und indirekter Kokultur beurteilt und verglichen werden.
  - Über die Analyse von Zellzyklusveränderungen der CRC-Zellen nach direkter und indirekter Kokultur sollten mögliche beteiligte Mechanismen der Vermittlung einer 5-FU-Resistenz aufgezeigt werden.
-

### 3 MATERIAL UND METHODIK

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden primäre Zellen und kommerziell erhältliche Zelllinien (Tab. 1) sowie transgen modifizierte Zellderivate verwendet. Hierzu lagen in der Arbeitsgruppe lentiviral transduzierte DsRed-exprimierende Klone der CRC-Zelllinien HCT8 und DLD1 sowie lentiviral transduzierte, GFP-exprimierende MSC und CCD18 vor. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die entsprechenden Klone der CRC-Zelllinien die Charakteristika des Wildtyps beibehielten sowie die GFP-Markierung der MSC keinen Einfluss auf die Konsensus-Kriterien genommen hatte (Daten nicht gezeigt). Daher wird im Folgenden bei der Darstellung der Zellen auf den Zusatz des Transgens verzichtet, insofern es zum Verständnis der Methode nicht notwendig ist.

**Tab. 1. Verwendete Zellen**

| Zellen   | Herkunft  | Referenz                     |
|----------|---|------------------------------|
| MSC      | humane primäre MSC, aus Knochenmark isoliert      | Mueller <i>et al.</i> (2006) |
| CCD-18Co | humane Fibroblasten des Kolon                     | ATCC Nr. CRL-1459            |
| 2101EP   | humane testikuläre Keimzelltumor (TGCT)-Zelllinie | Andrews <i>et al.</i> (1980) |
| DLD1     | humane CRC-Zelllinie                              | ATCC Nr. CCL-221             |
| COLO205  | humane CRC-Zelllinie                              | ATCC Nr. CCL-222             |
| HCT8     | humane CRC-Zelllinie                              | ATCC Nr. CCL-244             |

ATCC: American Type Culture Collection

##### 3.1.2 Antikörper

Die verwendeten Primärantikörper sowie die entsprechenden Isotypenkontrollen sind mit Angabe des Herstellers und der verwendeten Verdünnung Tab. 2 zu entnehmen.

**Tab. 2. Verwendete Antikörper**

| Antikörper                      | Klon   | Hersteller                     | Verdünnung |
|---------------------------------|--------|--------------------------------|------------|
| <i>Primärantikörper</i>         |        |                                |            |
| Maus anti-CD13 FITC             | WM-47  | Dako (Hamburg, D)              | 1:1        |
| Maus anti-CD105 FITC            | SN6    | AbD Serotec (Düsseldorf, D)    | 1:1        |
| <i>Isotypenkontrolle</i>        |        |                                |            |
| Maus anti-IgG <sub>1</sub> FITC | MOPC21 | BD Biosciences (Heidelberg, D) | 1:1        |

##### 3.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Zytostatika

Die verwendeten Chemikalien, Reagenzien sowie Zytostatika können in Tab. 3 nachvollzogen werden.

**Tab. 3. Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Zytostatika**

| Chemikalien und Reagenzien                                | Hersteller   |
|---|--|
| Agarose SeaKem LE   | Lonza Group AG (Basel, CH)                               |
| Aqua destillata   | B. Braun (Melsungen, D)                                  |
| Dimethylsulfoxid  | Merck (Darmstadt, D)                                     |
| Dulbeccos PBS 10x ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> | PAA Laboratories (Pasching, A)                           |
| Essigsäure  | Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)                           |
| Ethanol 96 %  | Sigma-Aldrich  |
| FACS-Flow   | BD Biosciences   |
| FACS-Rinse  | BD Biosciences   |
| FACS-Clean  | BD Biosciences   |
| Fetales Kälberserum (FKS)                                 | Invitrogen (Darmstadt, D),<br>PAN Biotech (Aidenbach, D) |
| MEM   | PAA Laboratories   |
| Natriumazetat   | Sigma-Aldrich  |
| Natriumazid   | Carl Roth (Darmstadt, D)                                 |
| Natriumhydroxid   | Sigma-Aldrich  |
| Nichtessenzielle Aminosäuren 100x                         | PAA Laboratories   |
| Penicillin/Streptomycin 100x                              | PAA Laboratories   |
| Propidiumiodid  | Sigma-Aldrich  |
| p-Nitrophenylphosphat                                     | Sigma-Aldrich  |
| RNase A   | Sigma-Aldrich  |
| RPMI 1640 mit L-Glutamin                                  | PAA Laboratories, Sigma-Aldrich                          |
| Sodium-Pyruvat 100 mM                                     | PAA Laboratories   |
| Sulforhodamin B (SRB)                                     | Sigma-Aldrich  |
| Trichloressigsäure (TCA)                                  | Carl Roth  |
| Tris  | Carl Roth  |
| Triton X-100  | Sigma-Aldrich  |
| Trypsin-EDTA 1x   | PAA Laboratories   |

| Zytostatika    | Lösungsmittel und Hersteller              |
|----------------|---|
| 5-Fluorouracil | in Dimethylformamid, Sigma-Aldrich        |
| Cisplatin      | in Dimethylformamid, Sigma-Aldrich        |
| Etoposid       | in Dimethylformamid, Axxora (Lörrach, D)  |
| Oxaliplatin    | in 5 % Glukose in A. dest., Sigma-Aldrich |
| Vincristin     | in A. dest., Sigma-Aldrich                |

### 3.1.4 Formulierung verwendeter Medien, Puffer und Lösungen

In Tab. 4 sind Formulierungen verwendeter Medien, Puffer und Lösungen angegeben.

**Tab. 4. Verwendete Medien, Puffer und Lösungen**

| Zellkultur  |   |
|---|---|
| <i>Konservierungsmedium</i>                             | FKS + 10 % Dimethylsulfoxid   |
| <i>Kultivierungsmedium für Stromazellen (SZ-Medium)</i> | MEM + 15 % FKS (PAN Biotech) + 1 % NEAA<br>+ 1 % Sodium-Pyruvat + 1 % Penicillin/Streptomycin |

|   |   |
|---|---|
| <i>Kultivierungsmedium für Tumorzellen (CRC-Medium)</i> | RPMI 1640 + 10 % FKS (Invitrogen)<br>+ 1 % Penicillin/Streptomycin                  |
| <i>PBS</i>  | A. dest. + 10 % Dulbeccos PBS 10x   |
| <b>SRB-Assay</b>  |   |
| <i>TCA-Fixierlösung</i>                                 | 10 % TCA in A. dest. (w/v)  |
| <i>Tris-Pufferlösung</i>                                | 10 mM Tris in A. dest., pH 10,0   |
| <i>SRB-Färbelösung</i>                                  | 0,4 % SRB (w/v)+ 1 % Essigsäure (v/v) in A. dest                                    |
| <b>Sphäroide</b>  |   |
| <i>APH-Assay-Puffer</i>                                 | 3 % Natriumazetat (w/v) + 0,2 % pNPP (w/v)<br>+ 0,1 % Triton X-100 (v/v) in A. dest |
| <b>Zellzyklusanalyse</b>                                |   |
| <i>Färbepuffer</i>                                      | 2 % FKS (v/v) + 0,01 % Natriumazid (w/v) in PBS                                     |

### 3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Die Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Eppendorf AG (Hamburg, D), Carl Roth GmbH und VWR International (Darmstadt, D) bezogen. Zellkulturverbrauchsmaterialien (Zentrifugenröhrchen, Kulturflaschen, Petrischalen, Testplatten, serologische Pipetten etc.) wurden von Techno Plastic Products (Trasadingen, CH) bezogen. Spezielle Materialien sind unter der jeweiligen Methode aufgeführt.

### 3.1.6 Geräte und Software

Hier nicht genannte Geräte, die im Weiteren verwendet wurden (Laminar-Flow Werkbänke, Vortexer, Analysewaagen sowie Inkubations-, Kühl- und Gefrierschränke) entsprechen den üblichen Laborstandards. Weitere verwendete Geräte sowie Software sind Tab. 5 zu entnehmen.

**Tab. 5. Verwendete Geräte und Software**

| Gerät                            | Hersteller                           |
|----------------------------------|--------------------------------------|
| FACScan                          | BD Biosciences                       |
| FACSCalibur                      | BD Biosciences                       |
| Kamera AxioCam                   | Carl Zeiss (Jena, D)                 |
| Mikroskop Axiovert 25 CA         | Carl Zeiss                           |
| Mikroskop Axiovert 40 CFL        | Carl Zeiss                           |
| Plate reader Spectra Rainbow SLT | Tecan LabInstruments (Männedorf, CH) |
| Plate washer PW96 SLT            | Tecan LabInstruments                 |
| Zentrifuge Labofuge 400          | Heraeus Instruments (Hanau, D)       |

| Software                  | Hersteller                           |
|---------------------------|--------------------------------------|
| Adobe Photoshop           | Adobe Systems (München, D)           |
| Adobe Reader              | Adobe Systems                        |
| AxioVision LE             | Carl Zeiss                           |
| Cell Quest                | BD Biosciences                       |
| Cyflagic                  | Cyflo Ltd (Turku, FIN)               |
| Endnote X7                | Thomson Reuters (New York City, USA) |
| IBM SPSS Statistics 20    | IBM (Ehningen, D)                    |
| Microsoft Excel 2013      | Microsoft Corporation (Redmond, USA) |
| Microsoft Powerpoint 2013 | Microsoft Corporation                |
| Microsoft Word 2013       | Microsoft Corporation                |

## 3.2 Zellkultur im Monolayer

### 3.2.1 Herkunft der MSC

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten MSC stammen aus Knochenmark-Aspiraten freiwilliger Spender, die durch ärztliche Mitarbeiter der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg gewonnen wurden. Dies geschah nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis der Spender. Für dieses Studienprotokoll lag ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg 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 Aufbereitung der MSC erfolgte über Dichtegradienten-Zentrifugation (Böyum 1967) anhand etablierter Protokolle durch die Arbeitsgruppe PD Dr. med. L. P. Müller, hämatologisch-onkologisches Forschungslabor, Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Mueller *et al.* 2006).

### 3.2.2 Kultivierung der Tumorzellen, CCD18 und MSC

Die CRC-Zelllinien HCT8 und DLD1 sowie deren DsRed-transgene Derivate wurden in CRC-Medium (3.1.4) kultiviert. Bei 80 – 90 % Konfluenz erfolgte die Passagierung der CRC-Zellen über Dekantieren des Mediums, Spülen mit PBS, Zugabe von Trypsin und anschließender Inkubation bei 37 °C. Nach Ablösen der Zellen erfolgte die Neutralisierung des Trypsins durch Zugabe des doppelten Volumens an Medium und die Überführung eines Suspensionsanteils in ein neues Kulturgefäß bzw. die Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer und Setzen einer bestimmten Zellzahl. Der Mediumwechsel erfolgte mindestens dreimal wöchentlich. MSC und CCD18 sowie deren GFP-transgene Derivate wurden mit SZ-Medium (3.1.4) kultiviert. MSC wurden nach dem Auftauen und Passagieren zu 200 Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert, CCD18 zu 5000 Zellen/cm<sup>2</sup>. MSC wurden bei 50 %



Konfluenz passagiert, CCD18 bei 80 – 100 % Konfluenz. Der Mediumwechsel erfolgte für MSC zweimal, für CCD18 dreimal wöchentlich.

Die Arbeiten an den Zellkulturen wurden unter Laminar-Flow Sicherheitswerkbänken durchgeführt. Medien und Lösungen wurden bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert und zur Verwendung in einem Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung.

### 3.2.3 *Kryokonservierung und Auftauen von Zellen*

Die Konservierung von Zellen über einen längeren Zeitraum erfolgte in flüssigem Stickstoff. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, Medium zugegeben, bei 1300 rpm zentrifugiert, in Konservierungsmedium (3.1.4) resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt, bei -80 °C zwischengelagert und anschließend in den Stickstofftank überführt. Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, die Zellsuspension im jeweiligen Kultivierungsmedium im Überschuss aufgenommen, bei 1300 rpm zentrifugiert, dekantiert und schließlich im Kultivierungsmedium resuspendiert und ausplattiert. Am Folgetag erfolgte ein Mediumwechsel.

### 3.2.4 *Gewinnung konditionierter Medien*

Zur Gewinnung konditionierter Medien wurden MSC und CCD18 jeweils für 48 h zu 4000 Zellen/cm<sup>2</sup> mit 0,4 ml/cm<sup>2</sup> frischem CRC-Medium inkubiert. Anschließend wurde dieses Medium gesammelt und filtriert (0,22 µm, Millipore, Eschborn, D). Das konditionierte Medium (CM<sub>MSC</sub> bzw. CM<sub>CCD18</sub>) wurde bei 4 °C aufbewahrt bzw. bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert und innerhalb einer Woche aufgebraucht.

### 3.2.5 *Direkte zweidimensionale Kokultur von CRC-Zellen und Stromazellen*

Die 2D-Kokultur erfolgte in 6-Loch-Platten. Die verwendeten Zellpopulationen umfassten MSC der Passage 2 bis 6, CCD18 der Passage 5 bis 10, DLD1 und HCT8, sowohl im Wildtyp (wt), als auch GFP-Stromazellen bzw. DsRed-CRC-Zellen. Als Zytostatikum wurde 5-FU verwendet (Endkonzentrationen für DLD1-Kokulturen: 2 µM, 3 µM und 10 µM; für HCT8-Kulturen zusätzlich 5 µM). Für die unbehandelte Kontrollgruppe und die Behandlungsgruppen wurden folgende Ansätze geführt: CRC-Zellen in Monokultur (CRC), mit MSC (CRC+MSC) und mit CCD18 (CRC+CCD18).

Das Setzen der Zellen erfolgte an Tag 0 getrennt, um eine vorzeitige Aggregation von CRC-Zellen mit Stromazellen zu verhindern: Zuerst wurden Stromazellen mit 4000 Zellen/cm<sup>2</sup> in die vorgesehenen Kavitäten vorgelegt und nach 4 h CRC-Zellen mit 4000 Zellen/cm<sup>2</sup> zugegeben. An Tag 1 wurde das Medium dekantiert, mit PBS gespült und 5-FU-haltiges CRC-

Medium für die Behandlungsgruppen, bzw. 5-FU-freies CRC-Medium für die Kontrollgruppe zugegeben. An Tag 4 erfolgte die Probengewinnung über Verwerfen des Mediums, Ablösen der Zellen mit Trypsin, Überführen der Zellen in Rundboden-FACS-Röhrchen (BD Biosciences) und Ermittlung der Gesamtzellzahl mittels Neubauer Zählkammer. Zur Ermittlung der CRC-Zellen- und Stromazellen-Anteile der Gesamtpopulation erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Zellsuspensionen (3.5.2). Mit den daraus gewonnenen Zellpopulationsverhältnissen wurde der Anteil der CRC-Zellen an der Gesamtzellzahl berechnet.

Zur Normierung der CRC-Zellzahlen wurden Zellzahlen der unbehandelten monokultivierten CRC-Ansätze auf 100 % gesetzt und die CRC-Zellzahl der weiteren Ansätze darauf skaliert. Die Mittelwerts- und Standardabweichungsberechnungen sowie die Auftragung in Balkendiagrammen erfolgten mittels Microsoft Excel.

### **3.3 SRB-Assay**

#### *3.3.1 Prinzip des SRB-Assays*

Der SRB-Assay ist ein Standardverfahren in der Beurteilung der Zytotoxizität von Substanzen (Skehan *et al.* 1990). Er basiert auf der festen Bindung des Farbstoffs Sulforhodamin B (SRB) an zelluläres Protein. Die gebundene Farbstoffmenge wird kolorimetrisch bestimmt und korreliert linear mit der Zellzahl.

Die Zellkultivierung erfolgte in 96-Loch-Mikrotiterplatten zu definierten Konditionen. Nach Beendigung der Kultivierung wurde das Medium dekantiert und die Zellen bei 4 °C mit TCA-Fixierlösung (3.1.4) für mind. 2 h fixiert. Anschließend wurde fünfmalig im Plate washer mit A. dest gespült. Danach erfolgt die Färbung im sauren Milieu mit SRB-Färbelösung (3.1.4) für 30 min bei RT. Das ungebundene SRB wurde durch fünfmaliges Spülen mit 1 % Essigsäure im Plate washer entfernt. Nach Lufttrocknung der Platten erfolgte die Solubilisierung des Farbstoffes im basischen Milieu mit 100 µl Tris-Pufferlösung (3.1.4). Nach 45 min Einwirkzeit wurde die optische Dichte (OD) des Farbstoffs pro Kavität bei 570 nm im Plate reader bestimmt. Die OD wird einheitslos angegeben und soll zur Sicherung der linearen Korrelation von Proteinmenge und Zellzahl nicht den absoluten Zahlenwert 2 überschreiten.

#### *3.3.2 Wachstumskinetik*

Zur Durchführung der Zytotixizitätsanalyse war es notwendig, Zellkonzentrationen zu ermitteln, welche ein uneingeschränktes Wachstum über den Kultivierungszeitraum zulassen. Dafür wurden an Tag 0 Stromazellen in 96-Loch-Mikrotiterplatten spaltenweise

---

in aufsteigender Zelldichte (600 – 1200 Zellen pro Kavität) gesetzt. Als Leerwert (LW) diente eine zellfreie Spalte mit SZ-Medium. In Tagesabständen erfolgte von Tag 1 bis Tag 5 das Abstoppen je einer Platte und die Durchführung des SRB-Assay (3.3.1). Die Auftragung der OD abzüglich des LW über die Zeit ergab somit die Wachstumskinetik. Ebenfalls konnte aus diesen Daten die Populationsverdopplungszeit (PDT) zwischen zwei Zeitpunkten  $t_1$  und  $t_2$  (Differenz  $\Delta t$ ) mit folgender Formel berechnet werden:

$$PDT = \Delta t \frac{\lg 2}{\lg(OD_{t_2} - LW_{t_2}) - \lg(OD_{t_1} - LW_{t_1})}$$

Die optimalen Zellzahlen zur Zytotoxizitätsanalyse von DLD1- und HCT8-Zellen waren bekannt aus Arbeiten der Arbeitsgruppe Dr. rer. nat. T. Müller, hämatologisch-onkologisches Forschungslabor, Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

### 3.3.3 Zytotoxizitätsanalyse von MSC und CCD18

Diese Analyse erfolgte mit der unter 3.3.2 ermittelten optimalen Zelldichte. Folgende Zytostatika wurden verwendet: Cisplatin, Oxaliplatin, Etoposid (Konzentrationsbereich jeweils 0,01 – 100  $\mu\text{M}$ ), 5-FU (0,1 – 1000  $\mu\text{M}$ ) und Vincristin (0,3 – 3000 nM).

An Tag 0 wurden Stromazellen in 96-Loch-Mikrotiterplatten in 100  $\mu\text{l}$  SZ-Medium pro Kavität gesetzt. An Tag 1 erfolgte die Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  CTx-haltigem Medium mit doppelter CTx-Zielkonzentration. Dabei wurde je eine Spalte (8 Kavitäten) mit einer Konzentration beschickt. Pro Platte wurden je eine Spalte als unbehandelte Kontrolle (Stromazellen in SZ-Medium ohne CTx) und eine Spalte als Leerwert (SZ-Medium ohne Zellen) mitgeführt.

Für die 24 h-Behandlung wurde an Tag 2 das CTx-haltige Medium dekantiert, die Kavitäten mit PBS gespült und die Zellen mit frischem CTx-freiem SZ-Medium für weitere 72 h kultiviert. Für die 96 h-Behandlung erfolgte bis zu Tag 5 kein Mediumwechsel. An Tag 5 wurde für beide Behandlungsgruppen der SRB-Assay durchgeführt (3.3.1).

Das Zellüberleben wurde prozentual zur unbehandelten Kontrolle skaliert. Die Darstellung erfolgte gegen die Zytostatikakonzentration (halblogarithmisch) mit Microsoft Excel. Zur Darstellung der relativen Resistenz von MSC und CCD18 erfolgte der Vergleich mit den sensitiven Tumorzelllinien COLO205 und 2102EP. Die Zytotoxizitätskurven der COLO205 und 2102EP stammen aus Daten der Arbeitsgruppe Dr. rer. nat. T. Müller, hämatologisch-onkologisches Forschungslabor, Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

### 3.3.4 Zytotoxizitätsanalyse von CRC-Zellen in konditionierten Medien

Die Plattierung der CRC-Zellen erfolgte analog zu 3.3.3 in 96-Loch-Mikrotiterplatten. An Tag 0 wurden HCT8 zu 800 Zellen pro Kavität bzw. DLD1 zu 2000 Zellen pro Kavität in 100 µl CM<sub>MSC</sub> oder CM<sub>CCD18</sub> gesetzt. Parallel dazu erfolgte der Ansatz von Kontrollplatten unter Verwendung von CRC-Medium. An Tag 1 wurde 100 µl 5-FU-haltiges CM<sub>MSC</sub> oder CM<sub>CCD18</sub> bzw. CRC-Medium zugegeben (Endkonzentrationen 0,1 µM – 300 µM 5-FU). An Tag 4 wurde der SRB-Assay durchgeführt und das Zellüberleben analog zu 3.3.3 ermittelt und aufgetragen.

### 3.3.5 Bestimmung von IC<sub>50</sub> und IC<sub>90</sub>

IC<sub>50</sub> und IC<sub>90</sub> bezeichnen inhibitorische Konzentrationen, bei denen eine Substanz im betrachteten Zeitraum die Anzahl der zu analysierenden Zellen um 50 % bzw. 90 %, verglichen zur unbehandelten Kontrolle, reduziert. Die IC konnten für die direkte 2D-Kokultur (3.2.5) und die Zytotoxizitätsanalysen (3.3.3 und 3.3.4) errechnet werden. Sie wurden mittels der Schnittpunktformel für halblogarithmische Auftragungen ermittelt:

$$IC_x = K_1 (K_1/K_2)^{\frac{100\% - x - S_1}{S_1 - S_2}}$$

Die am jeweiligen IC<sub>x</sub> anliegende niedrigere Zytostatikakonzentration wird K<sub>1</sub>, die höhere K<sub>2</sub> bezeichnet. S<sub>1</sub> und S<sub>2</sub> bezeichnen das dazugehörige Zellüberleben in Prozent. Die Auftragung der einzelnen IC in der Zytotoxizitätsanalyse der Stromazellen erfolgte in Boxplot-Graphiken um Ausreißer und Extremwerte zu ermitteln. Diese wurden in der anschließenden Mittelwertberechnung ausgeschlossen (Anhang 2).

Zur IC<sub>50</sub>-Berechnung der direkten und indirekten 2D-Kokulturen wurde jeweils die unbehandelte Kontrolle (CRC, CRC+MSC oder CRC+CCD18) auf 100 % gesetzt und das konzentrationsabhängige Zellüberleben darauf skaliert.

## 3.4 Zellkultur im Sphäroidmodell

### 3.4.1 Prinzip der Generierung von Sphäroiden

Dreidimensionale multizelluläre Tumorzellsphäroide können durch Verhindern der Zelladhäsion am Plattenboden mittels *liquid overlay* Verfahren generiert werden (Yuhás *et al.* 1977). Hierfür wurden 96-Loch-Mikrotiterplatten mit flüssiger 60 °C warmer 1 % Agarose zu 70 µl pro Kavität beschichtet. Nach anschließender Aushärtung der Agarose waren die Platten sofort verwendbar bzw. steril abgepackt bei 4 °C haltbar.

### 3.4.2 Direkte dreidimensionale Kokultur von CRC-Zellen und Stromazellen

Die Ausplattierung von CRC-Zellen und Stromazellen erfolgte gemeinsam an Tag 0 mit 3000 CRC-Zellen  $\pm$  750 Stromazellen in 100  $\mu$ l CRC-Medium pro Kavität. Für die Kontroll- und Behandlungsgruppen ergaben sich je 1 Spalte (8 Kavitäten) CRC, CRC+MSC und CRC+CCD18. An Tag 1 erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ l 5-FU-haltigem bzw. -freiem CRC-Medium (Endkonzentrationen 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M 5-FU).

An Tag 4 wurde die Größe der Sphäroide bestimmt. Dazu wurden unter dem Auflichtmikroskop vier Sphäroide pro Spalte fotografiert und Längen- und Breitendurchmesser mittels der Software AxioVision ausgemessen. Zur Auswertung der Sphäroidgröße wurde die Fläche, als Ellipse approximiert, herangezogen. Analog zur 2D-Kokultur erfolgte die Darstellung normiert auf die Sphäroidfläche unbehandelter monokultivierter CRC-Sphäroide.

### 3.4.3 Dreidimensionale Kultur von CRC-Zellen in konditionierten Medien

An Tag 0 wurden 3000 CRC-Zellen pro Kavität mit 100  $\mu$ l CRC-Medium bzw.  $CM_{MSC}$  und  $CM_{CCD18}$  in Agarose-beschichteten 96-Loch-Mikrotiterplatten gesetzt. An Tag 1 erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ l 5-FU-freiem CRC-Medium bzw.  $CM_{MSC}$  oder  $CM_{CCD18}$  in den unbehandelten Gruppen, sowie Zugabe von 100  $\mu$ l 5-FU-haltigem CRC-Medium bzw.  $CM_{MSC}$  und  $CM_{CCD18}$  in den Behandlungsgruppen (Endkonzentrationen 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M 5-FU). An Tag 4 wurden Sphäroidflächen analog zu 3.4.2 bestimmt.

### 3.4.4 Bestimmung der Sphäroidgröße mittels APH-Assay

Der APH-Assay wurde als Routineverfahren zur Zytotoxizitätsanalyse für Sphäroide entworfen (Friedrich *et al.* 2009) und für die alternative Bestimmung der Sphäroidgröße herangezogen. Er basiert auf dem Umsatz des Farbstoffs pNPP zu p-Nitrophenol durch die lysosomale saure Phosphatase. Die Menge des umgesetzten Farbstoffes korreliert dabei mit der Anzahl vitaler Zellen.

Zur Durchführung wurden die Sphäroide in unbeschichtete 96-Loch-Mikrotiterplatten überführt. Als Leerwert (LW) diente eine mit CRC-Medium befüllte Spalte. Es wurde 10 min bei 1300 rpm zentrifugiert, das Medium entfernt, 200  $\mu$ l PBS pro Kavität zugegeben, erneut zentrifugiert und 100  $\mu$ l pro Kavität entfernt. Danach erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ l APH-Assay-Puffer (3.1.4) pro Kavität und Inkubation für 90 min bei 37 °C. Anschließend wurden 10  $\mu$ l NaOH pro Kavität zugegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Dies führte zur Hydrolyse von p-Nitrophenol zu p-Nitrophenolat mit einem Farbumschlag. Dieser konnte bei 405 nm im Plate reader gemessen werden. Die Auswertung erfolgte analog zur Zytotoxizitätsanalyse mittels SRB-Assay (3.3.3).

Die ermittelten Größen der Sphäroide über Diameter- und APH-Bestimmung korrelierten miteinander, sodass fortan alleinig die Sphäroidfläche zur Größenbestimmung herangezogen wurde (Anhang 7).

### 3.5 Durchflusszytometrische Analysen

#### 3.5.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein automatisiertes Verfahren zur Messung der Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften von Partikeln (im Folgenden Zellen und Zelltrümmer). Die Probe wird in Suspension gegeben, die Partikel treten in den Kanal einer Küvette ein und werden nacheinander am Messbereich eines Lasers vorbeigeführt. Die Brechung des Laserstrahls am Partikel erzeugt im flachen Winkel ein Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) und im rechten Winkel ein Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC), welche detektiert und diesem Partikel als Eigenschaft zugeschrieben werden. Die Intensität des FSC ist hauptsächlich durch die Größe des Partikels bestimmt, während die des SSC ein Maß für Granularität und Vesikelgehalt einer Zelle sowie Größe und Struktur des Zellkerns darstellt. Um Zellpopulationen voneinander abzugrenzen, erfolgt die Messung vieler Zellen ( $> 10^4$ ). Durch Markierung bestimmter Zelleigenschaften (z. B. CD-Antigene) mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern und die Messung derer Intensitäten ist es möglich, Zellpopulationen weiter aufzutrennen. Weitere Färbungen ermöglichen z. B. die Darstellung des RNA- und DNA-Gehaltes der Zelle. Die Auftragung in Punktwolkendiagrammen (*dot-plots*) ermöglicht die Gegenüberstellung der Intensitäten zweier gemessener Eigenschaften, die Auftragung in Histogrammen die Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Intensität einer gemessenen Eigenschaft.

Die Messungen wurden an FACScan und FACSCalibur Durchflusszytometern mit der Software Cell Quest durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Cyflogic. Im Folgenden sind die verwendeten durchflusszytometrischen Analysen beschrieben.

#### 3.5.2 Auftrennung von CRC-Zellen und Stromazellen nach direkter zweidimensionaler Kokultur

Um den Anteil der CRC-Zellen nach direkter Kokultur mit Stromazellen (3.2.5) zu ermitteln, wurden DsRed-CRC-Zellen verwendet. Da die Intensität der DsRed-Expression der verwendeten HCT8-Zellen zur Auftrennung der Kokulturen zu gering war, erfolgte eine Antikörperfärbung der Stromazellen mit anti-CD13 oder anti-CD105 zur besseren Diskriminierung. Dafür wurden die Proben bei 1300 rpm zentrifugiert, die Zellpellets mit

---

10  $\mu$ l FITC-konjugiertem Primärantikörper pro  $10^6$  Zellen resuspendiert (3.1.2) und 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde mit PBS gespült, zentrifugiert, in PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert. Die spezifischen Geräteeinstellungen wurden mit Isotypenkontrollen vorgenommen und im Verlauf einer Messung nicht verändert.

### 3.5.3 Zellzyklusanalyse unter Auftrennung von CRC-Zellen und Stromazellen nach direkter zweidimensionaler Kokultur

Die Quantifizierung des DNA-Gehalts einer Zelle ist über die Färbung mit Propidiumiodid (PI) möglich. Das PI-Histogramm einer Zellpopulation lässt aufgrund des unterschiedlichen DNA-Gehaltes in den jeweiligen Zellzyklusphasen Aussagen über die Verteilung der Zellzyklusphasen  $G_{0/1}$ , S und  $G_2/M$  sowie über den Anteil apoptotischer Zellen in der sub $G_1$ -Phase zu. Da PI keine Zellmembranen penetriert, werden die Zellen mit Ethanol permeabilisiert. Des Weiteren bindet PI ebenso an RNA. Um dies zu verhindern werden die Zellen mit RNase behandelt.

PI wird ebenso wie DsRed im Fl-2 Kanal detektiert, weshalb wt-CRC-Zellen anstelle von DsRed-CRC-Zellen verwendet wurden. Die Probengewinnung erfolgte analog zu 3.2.5. Abweichend davon wurde das überstehende Medium nicht verworfen, sondern zur Gewinnung flottierender Zellen zentrifugiert. Die Zellzyklusanalyse unter Auftrennung der Kokultur basiert auf einer Antikörperfärbung der Stromazellen, wie in 3.5.2 beschrieben, mit anschließender PI-Färbung. Dazu wurden die Proben mit anti-CD105-FITC inkubiert, zweimalig mit PBS gespült und bei 1300 rpm zentrifugiert. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 2 ml -20 °C kaltem 70 % Ethanol und anschließender Lagerung der Proben bei 4 °C für mind. 1 h. Nach Dekantieren des Ethanol erfolgte ein Spülschritt mit 2 ml Färbepuffer (3.1.4), Zentrifugation, Resuspendieren der Proben in 100  $\mu$ l RNase A (1 mg/ml) und Inkubation für 30 min bei 37 °C. Zur Färbung der DNA erfolgte die Zugabe von Färbepuffer mit 20  $\mu$ g/ml PI und Inkubation für 30 min bei RT im Dunkeln. Anschließend wurden die Proben im Durchflusszytometer analysiert.

Das PI-Signal wurde in Signalbreite (PI-W) und Signalfläche (PI-A) aufgeschlüsselt. Die Auftragung von PI-W über PI-A erlaubt Zelldoubletten, die bei der Ethanolfixierung entstehen, aus der Zellzyklusanalyse auszuschließen. Nach Subtraktion der FITC-gefärbten Stromazellen erfolgte die Auftragung von PI-A der CRC-Zellen im Histogramm. Die spezifischen Geräteeinstellungen wurden mit Isotypenkontrollen vorgenommen und im Verlauf einer Messung nicht verändert.

Zur Zellzyklusanalyse von CRC-Zellen mit  $CM_{MSC}$  und  $CM_{CCD18}$  erfolgte das Vorgehen analog, jedoch ohne die zur Markierung von Stromazellen vorgesehene Antikörperfärbung.

---

### 3.6 Statistische Analyse

Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mittels kommerzieller Software errechnet. Es wurden Microsoft Excel und SPSS für weitergehende statistische Analysen verwendet (3.1.6). Die Signifikanzanalyse erfolgte bei zwei Stichproben mittels *t*-Test oder modifiziertem *t*-Test, abhängig vom *Levene*-Test (unabhängige Stichproben, beidseitig).

Für Signifikanzanalysen bei drei Stichproben erfolgte der *Shapiro-Wilk*-Test auf Normalverteilung mit anschließender einfaktorieller ANOVA-Testung und *Levene*-Test auf Varianzhomogenität. Da in den vorliegenden Fällen keine Varianzhomogenität vorlag, wurde post-hoc *Fisher's-LSD*-Test zur Bestimmung statistisch signifikanter Unterschiede verwendet. Bei einem p-Wert kleiner 0,05 wurden die Stichproben als sich signifikant unterscheidend betrachtet.

---



## 4 ERGEBNISSE

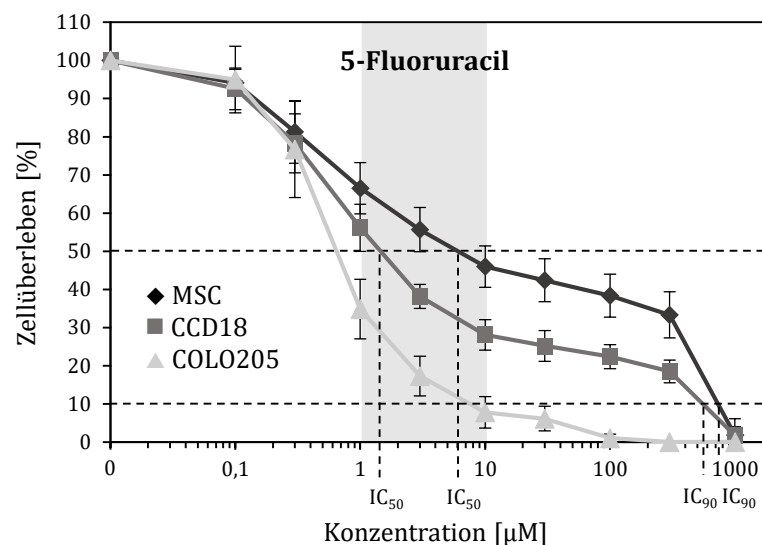
### 4.1 Zytostatikasensitivität von MSC und CCD18

#### 4.1.1 Wachstumskinetiken von MSC und CCD18

MSC und CCD18 zeigten bis zu einer Zelldichte von 2.900 Zellen/cm<sup>2</sup> ein uneingeschränktes Wachstum in den Wachstumskinetiken über 5 Tage (Anhang 1). Daher wurde diese Zelldichte für die folgenden Zytotoxizitätsanalysen und Berechnungen der IC<sub>50</sub> und IC<sub>90</sub> ausgewählt. Zur Veranschaulichung einer relativen Resistenz der MSC bzw. CCD18 wurden Zytotoxizitätskurven sensitiver Tumorzelllinien hinzugefügt. So erfolgte für 5-FU und Oxaliplatin der Vergleich mit der CRC-Zelllinie COLO205, da diese CTx Anwendung im CRC finden. Für Cisplatin und Etoposid erfolgte der Vergleich mit der TGCT-Zelllinie 2102EP, da diese CTx beim testikulären Keimzelltumor angewendet werden.

#### 4.1.2 MSC zeigen im Vergleich zu CCD18 eine erhöhte 5-FU-Resistenz

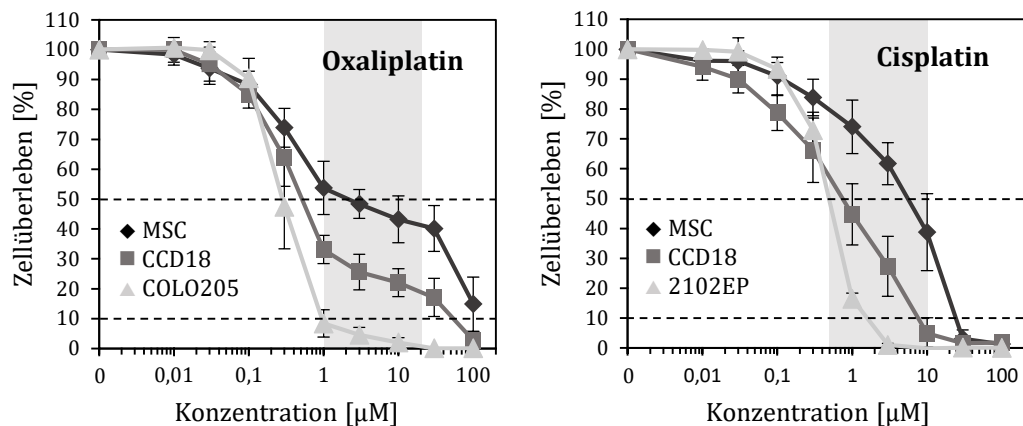
MSC und CCD18 zeigten im Vergleich zur Tumorzelllinie COLO205 eine Resistenz bei Behandlung mit 5-FU über 96 h. Hohe Konzentrationen bis zu 300 µM 5-FU wurden toleriert, ohne dass der IC<sub>90</sub> erreicht wurde, wohingegen die IC<sub>90</sub> der COLO205 zwischen 3 – 10 µM lag. Ebenso erkennbar war eine erhöhte IC<sub>50</sub> der MSC im Vergleich zu CCD18 (Vgl. Tab. 6). Bei 1000 µM 5-FU waren keine MSC und CCD18 mehr nachweisbar, sodass anhand der verwendeten Konzentrationen zwar rechnerisch die IC<sub>90</sub> ermittelt werden konnten, eine sichere Unterscheidung jedoch nicht gegeben ist (Abb. 2).



**Abb. 2. MSC zeigen eine 5-FU-Resistenz im Vergleich zu CCD18 und sensitiven Tumorzellen.** Behandlung mit 5-FU über 96 h, der therapeutisch relevante Konzentrationsbereich (Vgl. Tab. 6) ist grau unterlegt. Exemplarisch sind die IC<sub>50</sub> und IC<sub>90</sub> der MSC und CCD18 eingetragen. MW ± SD; n = 6 für MSC und CCD18, n = 10 für COLO205.

#### 4.1.3 MSC zeigen im Vergleich zu CCD18 eine erhöhte Oxaliplatin- und Cisplatin-Resistenz

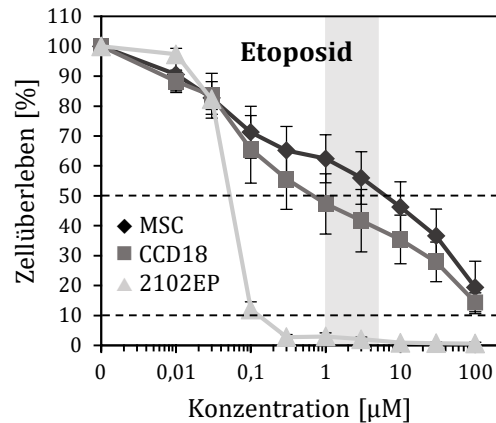
MSC und CCD18 zeigten im Vergleich zu COLO205 bzw. 2102EP eine Resistenz bei Behandlung mit Oxaliplatin bzw. Cisplatin über 96 h. Für Oxaliplatin zeigte sich ein Kurvenverlauf vergleichbar den 5-FU-Zytotoxizitätskurven. Hohe Konzentrationen bis 30  $\mu\text{M}$  Oxaliplatin wurden von MSC und CCD18 toleriert, ohne dass für MSC die  $\text{IC}_{90}$  erreicht wurde, während COLO205 eine  $\text{IC}_{90}$  von ca. 1  $\mu\text{M}$  zeigten. Weiterhin war eine deutlich höhere  $\text{IC}_{50}$  der MSC gegenüber CCD18 erkennbar (Vgl. Tab. 6). Für Cisplatin zeigten sich ebenfalls erhöhte  $\text{IC}_{50}$  und  $\text{IC}_{90}$  der MSC und CCD18 gegenüber der Tumorzelllinie 2102EP sowie erhöhte  $\text{IC}_{50}$  und  $\text{IC}_{90}$  der MSC gegenüber CCD18 (Vgl. Tab. 6, Abb. 3).



**Abb. 3. MSC zeigen eine Oxaliplatin- und Cisplatin-Resistenz im Vergleich zu CCD18 und sensitiven Tumorzellen.** Behandlung über 96 h mit jeweils Oxaliplatin und Cisplatin, der therapeutisch relevante Konzentrationsbereich (Vgl. Tab. 6) ist grau hinterlegt. MW  $\pm$  SD; Oxaliplatin:  $n = 7$  für MSC,  $n = 6$  für CCD18,  $n = 5$  für COLO205; Cisplatin:  $n = 6$  für MSC und CCD18,  $n = 3$  für 2102EP.

#### 4.1.4 MSC zeigen im Vergleich zu CCD18 keine veränderte Etoposid-Sensitivität

MSC und CCD18 zeigten bei Behandlung mit Etoposid über 96 h einen sichtbaren, jedoch nicht signifikanten Unterschied ihrer  $\text{IC}_{50}$ . Bis zur maximal verwendeten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  wurde die  $\text{IC}_{90}$  nicht erreicht. Im Vergleich zur sensitiven Tumorzelllinie 2102EP waren erhöhte  $\text{IC}_{50}$  und  $\text{IC}_{90}$  der MSC und CCD18 erkennbar (Vgl. Tab. 6, Abb. 4).



**Abb. 4. MSC und CCD18 zeigen eine Etoposid-Resistenz im Vergleich zu sensitiven Tumorzellen.** Behandlung mit Etoposid über 96 h, der therapeutisch relevante Konzentrationsbereich (Vgl. Tab. 6) ist grau hinterlegt. MW  $\pm$  SD;  $n = 6$  für MSC,  $n = 6$  für CCD18,  $n = 6$  für 2102EP.

#### 4.1.5 MSC zeigen im Vergleich zu CCD18 und ausgewählten Tumorzellen eine Resistenz gegenüber diversen Zytostatika

Die Berechnung der  $IC_{50}$  und  $IC_{90}$  erfolgte für jeden Versuchsdurchgang einzeln. Die explizite Darstellung der 24 h Behandlungen von MSC und CCD18 erfolgt nicht, da keine relevanten Unterschiede zu den 96 h Behandlungen gezeigt werden konnten (Einzelwerte in Anhang 2). Anhand der verwendeten Konzentrationen konnte die  $IC_{90}$  für Etoposid nicht erreicht werden. Für die Behandlung mit Oxaliplatin konnten  $IC_{90}$  in 3 Einzelversuchen ermittelt werden, so dass diese zur Mittelwertbestimmung und Signifikanzanalyse herangezogen wurden. Bei der hier nicht dargestellten Behandlung mit Vincristin konnten die  $IC_{50}$  und  $IC_{90}$  von MSC und CCD18 anhand der verwendeten Konzentrationen nicht ermittelt werden. Jedoch zeigte sich eine Resistenz von MSC und CCD18 gegenüber sensiblen Tumorzellen (Anhang 3).

**Tab. 6. Zusammenfassung der  $IC_{50}$  und  $IC_{90}$  der MSC und CCD18 bei 96 h Behandlung mit diversen Zytostatika.** Dargestellt sind MW  $\pm$  SD der IC sowie therapeutische Konzentrationen der verwendeten Zytostatika. \*  $p < 0,05$  für MSC vs. CCD18 der jeweiligen Behandlungsgruppe;  $n \geq 3$ .

|                        |           | 96 h Behandlung    |                  | therapeutische Konzentrationen                   |
|------------------------|-----------|--------------------|------------------|--|
|                        |           | MSC                | CCD18            |  |
| 5-FU [ $\mu$ M]        | $IC_{50}$ | 5,0 $\pm$ 2,2 *    | 1,3 $\pm$ 0,4    | 1 – 10 $\mu$ M<br>Yoshikawa <i>et al.</i> (2001) |
|                        | $IC_{90}$ | 730,1 $\pm$ 28,9 * | 536,1 $\pm$ 38,5 |  |
| Oxaliplatin [ $\mu$ M] | $IC_{50}$ | 2,4 $\pm$ 1,7 *    | 0,5 $\pm$ 0,1    | 1 – 20 $\mu$ M<br>Gamelin <i>et al.</i> (1997)   |
|                        | $IC_{90}$ | 85,5 $\pm$ 12,8 *  | 60,0 $\pm$ 16,1  |  |
| Cisplatin [ $\mu$ M]   | $IC_{50}$ | 6,3 $\pm$ 3,3 *    | 0,7 $\pm$ 0,2    | 0,5 – 10 $\mu$ M<br>Hanada <i>et al.</i> (2001)  |
|                        | $IC_{90}$ | 23,7 $\pm$ 3,4 *   | 6,7 $\pm$ 1,5    |  |
| Etoposid [ $\mu$ M]    | $IC_{50}$ | 10,2 $\pm$ 11,9    | 2,0 $\pm$ 2,8    | 1 – 5 $\mu$ M<br>Braybrooke <i>et al.</i> (2003) |
|                        | $IC_{90}$ | > 100              | > 100            |  |

Bei Behandlung mit 5-FU, Oxaliplatin und Cisplatin war anhand der signifikant erhöhten  $IC_{50}$  und  $IC_{90}$  eine Resistenz der MSC gegenüber CCD18 erkennbar (Tab. 6). Darüber hinaus zeigte sich bei allen verwendeten CTx eine Resistenz von MSC und CCD18 gegenüber sensiblen Tumorzelllinien, sowie eine Resistenz von MSC und CCD18 in den therapeutisch relevanten Konzentrationsbereichen.

#### **4.2 Wachstumsverhalten und 5-FU-Sensitivität von CRC-Zellen bei direkter und indirekter Kokultur mit MSC und CCD18 im Monolayer**

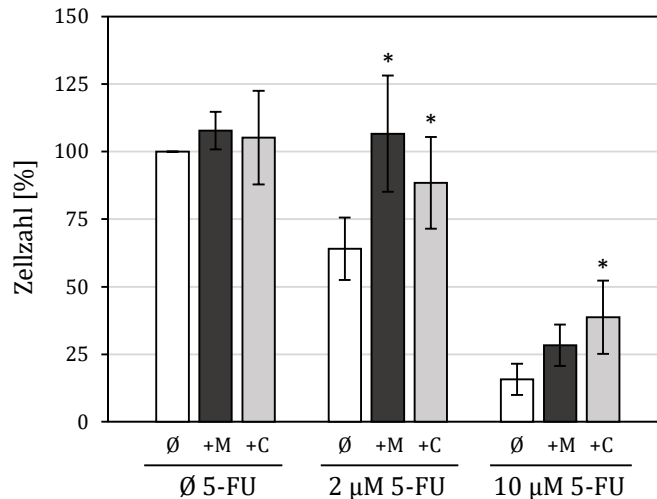
Über die direkte Kokultur der CRC-Zelllinien HCT8 und DLD1 mit Stromazellen als auch indirekt mittels konditionierter Medien der Stromazellen wurde der Einfluss von MSC und CCD18 auf die 5-FU-Sensitivität der CRC-Zellen untersucht.

Anhand der verwendeten 5-FU-Konzentrationen in der direkten Kokultur, als auch dem breiten Konzentrationsbereich der indirekten Kokultur war die Berechnung der  $IC_{50}$  zur Quantifizierung der 5-FU-Sensitivität möglich. Für die direkten Kokulturen wurde  $2 \mu\text{M}$  5-FU als Konzentration nahe der  $IC_{50}$  der CRC-Zellen sowie  $10 \mu\text{M}$  5-FU nahe der  $IC_{90}$  dargestellt. Die Toleranz dieser Konzentrationen durch MSC und CCD18 war aus 4.1.2 bekannt. Über qualitative Betrachtungen der Morphologie der CRC-Zellen wurden weitere Gemeinsamkeiten und Unterschiede des Einflusses der MSC und CCD18 bzw. ihrer konditionierten Medien auf CRC-Zellen herausgearbeitet.

##### *4.2.1 MSC und CCD18 vermitteln bei direkter Kokultur mit HCT8-Zellen eine 5-FU-Resistenz*

Die DsRed-Expression der verwendeten DsRed-HCT8-Zellen war zu gering um mittels Durchflusszytometrie eine sichere Trennung der Zellpopulationen zu ermöglichen. Daher erfolgte die Detektion von MSC und CCD18 mittels Antikörpermarkierung (Anhang 4). DsRed-HCT8-Zellen ließen sich dadurch nicht markieren (Anhang 5).

Anhand der Balkendiagramme (Abb. 5) ist zu erkennen, dass MSC und CCD18 ohne Behandlung mit 5-FU keinen Einfluss auf die HCT8-Zellzahlen hatten. Bei Behandlung mit  $2 \mu\text{M}$  5-FU betrug die Reduktion der HCT8-Zellzahl in den HCT8-Monokulturen ca. 40 %. Im Vergleich dazu zeigten HCT8+MSC-Kokulturen und HCT8+CCD18-Kokulturen höhere HCT8-Zellzahlen. Bei Behandlung mit  $10 \mu\text{M}$  5-FU zeigten HCT8-Monokulturen eine Reduktion der HCT8-Zellzahl um ca. 85 %. Im Vergleich dazu zeigten HCT8+MSC-Kokulturen höhere HCT8-Zellzahlen, wobei dieser Effekt bei HCT8+CCD18-Kokulturen sogar signifikant ausgeprägt war. Anhand dieser Daten ist ein deutlicher Einfluss der MSC und CCD18 auf die 5-FU-Sensitivität der HCT8-Zellen erkennbar.



**Abb. 5. MSC und CCD18 vermitteln bei direkter Kokultur eine 5-FU-Resistenz von HCT8-Zellen.** Gezeigt sind MW  $\pm$  SD normierter Zellzahlen der DsRed-positiven und CD13-negativen Zellen, welche HCT8-Zellen darstellen; 5-FU-Behandlung über 72 h. Ø - HCT8, +M - HCT8+MSC, +C - HCT8+CCD18. \*  $p < 0,05$  vs. HCT8-Monokultur der jeweiligen Behandlungsgruppe; unbehandelt mit  $n = 8$ ; 2  $\mu\text{M}$  mit  $n = 6$ ; 10  $\mu\text{M}$  mit  $n = 5$ .

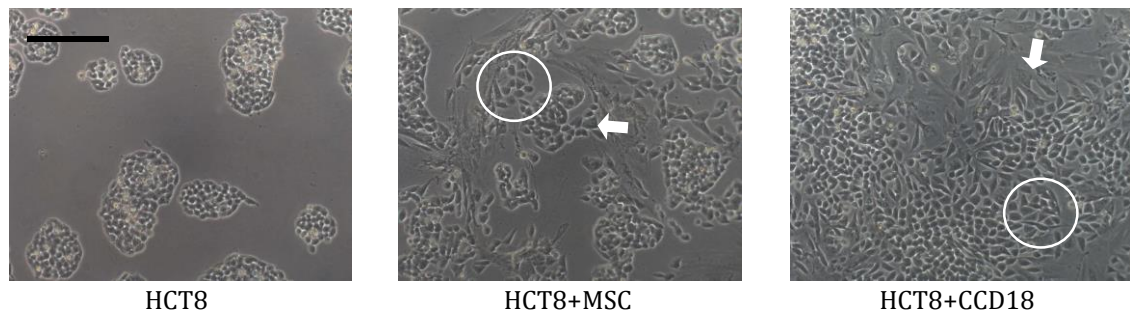
Des Weiteren zeigte die Berechnung der  $\text{IC}_{50}$  signifikant höhere Werte für kokultivierte HCT8-Zellen im Vergleich zu HCT8-Monokulturen (Tab. 7).

**Tab. 7. Errechnete  $\text{IC}_{50}$  für HCT8-Zellen bei direkter Kokultur mit MSC und CCD18 bei 5-FU-Behandlung über 72 h.**  $p$  vs. HCT8-Monokultur.

|                        | $\text{IC}_{50}$ für 5-FU |     |         |
|------------------------|---------------------------|-----|---------|
|                        | Mittelwert                | SD  | $p$     |
| HCT8 ( $n = 5$ )       | 4,2 $\mu\text{M}$         | 1,5 | -       |
| HCT8+MSC ( $n = 5$ )   | 7,2 $\mu\text{M}$         | 0,7 | 0,002   |
| HCT8+CCD18 ( $n = 4$ ) | 7,7 $\mu\text{M}$         | 1,1 | < 0,001 |

Die Morphologie der HCT8-Zellen zeigte weiterhin qualitative Veränderungen bei direkter Kokultur mit Stromazellen. HCT8-Zellen wuchsen in Monokultur in Kolonien runder Zellen. In Kokultur mit MSC umwuchsen MSC die HCT8-Zellen und legten sich septenartig um die Kolonien, wohingegen CCD18 diffus innerhalb und zwischen den Kolonien vorzufinden waren. Bei Kokultur mit MSC und CCD18 kam es zu einer Zunahme polygonaler und spindelförmiger HCT8-Zellen mit Auflockerung und Aufbrechen der Koloniestrukturen sowie einer Zunahme des interzellulären Abstandes. Diese Veränderungen traten bei Präsenz von CCD18 deutlicher hervor als mit MSC.

Bei Behandlung mit 5-FU nahm die Koloniegröße der HCT8-Zellen in Monokultur ab und bei 10  $\mu\text{M}$  5-FU waren flottierende Zellen erkennbar. Die beschriebenen morphologischen Veränderungen der HCT8-Zellen in Kokultur mit MSC und CCD18 persistierten auch bei Behandlung mit 5-FU (Abb. 6), flottierende Zellen traten jedoch deutlich weniger auf.

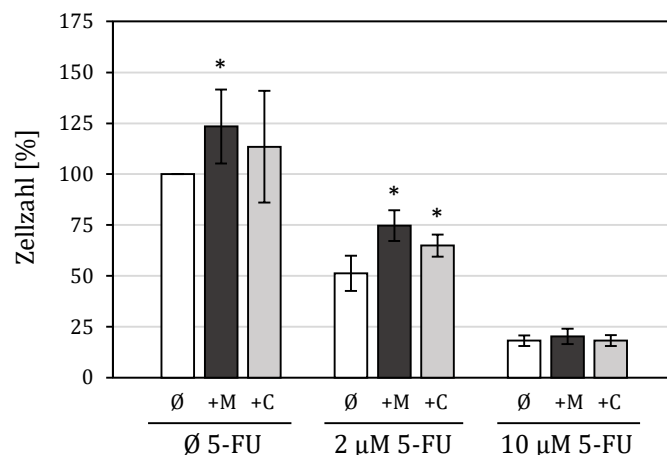


**Abb. 6. Morphologische Veränderungen von HCT8-Zellen bei direkter Kokultur mit MSC und CCD18 und 5-FU-Behandlung.** Exemplarisch gezeigt sind Phasenkontrastaufnahmen bei 100facher Vergrößerung. Die Photographien wurden nach 72 h Behandlung mit 2  $\mu\text{M}$  5-FU erstellt. Pfeile zeigen ein Aufbrechen der Koloniestruktur, Kreise veränderte Zellmorphologie. Der Maßstabsbalken entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.2 MSC und CCD18 vermitteln bei direkter Kokultur mit DLD1-Zellen eine Wachstumsförderung, die unter 5-FU-Behandlung persistiert

Da DsRed-DLD1-Zellen aufgrund ihrer hohen DsRed-Expression in der Durchflusszytometrie sicher von MSC und CCD18 abgrenzbar waren, wurde auf eine zusätzliche Antikörpermarkierung analog zu 4.2.1 verzichtet. Das Vorgehen zur Auftrennung von DsRed-DLD1-Zellen und MSC bzw. CCD18 kann in Anhang 6 nachvollzogen werden.

Anhand des Balkendiagramms (Abb. 7) ist erkennbar, dass ohne 5-FU-Behandlung MSC eine Zunahme der DLD1-Zellzahl vermitteln, jedoch nicht CCD18. Bei Behandlung mit 2  $\mu\text{M}$  5-FU betrug die Reduktion der DLD1-Zellzahl in DLD1-Monokulturen ca. 50 %. Im Vergleich dazu zeigten DLD1+MSC-Kokulturen und DLD1+CCD18-Kokulturen höhere DLD1-Zellzahlen. Bei Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  5-FU war die DLD1-Zellzahl von DLD1-Zellen in Monokultur sowie in Kokultur mit MSC und CCD18 gleichermaßen um ca. 80 % reduziert.



**Abb. 7. MSC und CCD18 vermitteln bei direkter Kokultur eine Wachstumsförderung von DLD1-Zellen, die unter 5-FU-Behandlung persistiert.** Gezeigt sind MW  $\pm$  SD normierter Zellzahlen der DLD1-Zellen. 5-FU-Behandlung über 72 h. Die Bezeichnung erfolgt analog zu Abb. 5. \*  $p < 0,05$  vs. DLD1-Monokultur der jeweiligen Behandlungsgruppe; unbehandelt mit  $n = 9$ ; 2  $\mu\text{M}$  mit  $n = 6$ ; 10  $\mu\text{M}$  mit  $n = 5$ .

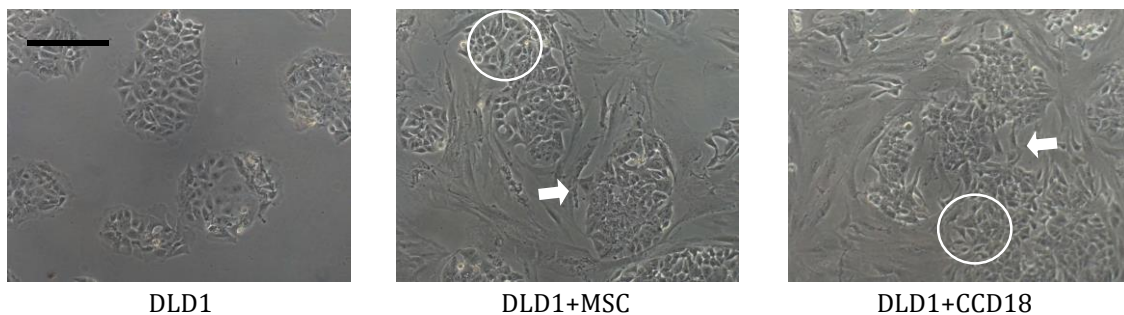
Zusätzlich ergibt sich im Vergleich zu den direkten HCT8-Kokulturen, dass die Wachstumsvorteile von DLD1-Zellen bei Kokultur mit MSC und CCD18 unter Behandlung mit 2  $\mu\text{M}$  5-FU geringer ausfielen und bei 10  $\mu\text{M}$  5-FU nicht mehr nachweisbar waren. Zudem war eine Wachstumsförderung von DLD-Zellen in direkter Kokultur mit MSC ohne 5-FU-Behandlung erkennbar.

Des Weiteren ergab die Berechnung der  $\text{IC}_{50}$  keine Unterschiede zwischen kokultivierten und monokultivierten DLD1-Zellen (Tab. 8).

**Tab. 8. Errechnete  $\text{IC}_{50}$  für DLD1-Zellen bei direkter Kokultur mit MSC und CCD18 bei 5-FU-Behandlung über 72 h. p vs. DLD1-Monokultur.**

|                        | $\text{IC}_{50}$ für 5-FU |     |       |
|------------------------|---------------------------|-----|-------|
|                        | Mittelwert                | SD  | p     |
| DLD1 ( $n = 3$ )       | 2,7 $\mu\text{M}$         | 0,4 | -     |
| DLD1+MSC ( $n = 4$ )   | 3,0 $\mu\text{M}$         | 0,7 | 0,741 |
| DLD1+CCD18 ( $n = 5$ ) | 2,9 $\mu\text{M}$         | 1,1 | 0,790 |

Hinsichtlich der Morphologie von DLD1-Zellen zeigten sich zu den direkten HCT8-Kokulturen vergleichbare Veränderungen. DLD1-Zellen wuchsen in Monokultur in Kolonien mit polygonalen Zellen im Randbereich, die sich zum Koloniezentrum hin verdichteten. Kokultivierte MSC und CCD18 arrangierten sich septenartig um die Kolonien und ein Aufbrechen der Koloniegrenzen mit spindelförmigen DLD1-Zellen im Randbereich war erkennbar. DLD1-Zellen im Koloniezentrum wurden in Kokultur mit MSC und CCD18 polygonaler.



**Abb. 8. Morphologische Veränderungen von DLD1-Zellen bei direkter Kokultur mit MSC und CCD18 und 5-FU-Behandlung.** Exemplarisch gezeigt sind Phasenkontrastaufnahmen bei 100-facher Vergrößerung. Die Photographien wurden nach 72 h Behandlung mit 2  $\mu\text{M}$  5-FU erstellt. Pfeile zeigen ein Aufbrechen der Koloniestruktur, Kreise veränderte Zellmorphologie. Der Maßstabsbalken entspricht 200  $\mu\text{m}$ .

Bei 5-FU-Behandlung kam es zu einer Auflockerung der DLD1-Kolonien in der DLD1-Monokultur mit besserer Abgrenzbarkeit der DLD1-Zellen im Koloniezentrum. Weiterhin bildeten sich blasenartig erscheinende DLD1-Zellen mit angereichertem Zytoplasma. DLD1-



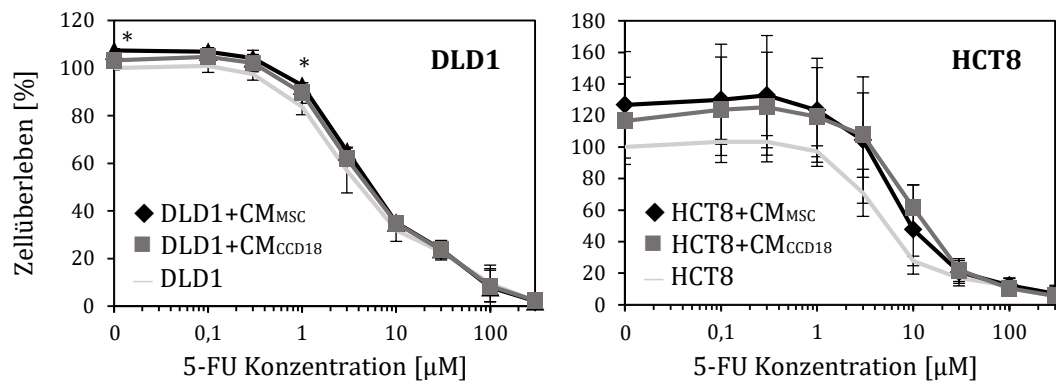
Zellen in Kokultur mit MSC und CCD18 wiesen weiterhin die im unbehandelten Zustand beschriebenen morphologischen Veränderungen auf (Abb. 8). Blasenartige Zellen waren jedoch seltener zu beobachten.

Um die Effektoren der MSC- und CCD18-vermittelten 5-FU-Resistenz und Wachstumsförderung näher einzugrenzen wurde im Folgenden der Einfluss konditionierter Medien von MSC und CCD18 auf das Wachstumsverhalten, die Morphologie und die 5-FU-Sensitivität von HCT8- und DLD1-Zellen untersucht.

#### 4.2.3 Konditionierte Medien von MSC und CCD18 vermitteln ein differentielles Wachstumsverhalten von HCT8- und DLD1-Zellen

Die Untersuchung des Einflusses konditionierter Medien von MSC und CCD18 ( $CM_{MSC}$  und  $CM_{CCD18}$ ) auf die 5-FU-Sensitivität der Zelllinien HCT8 und DLD1 erfolgte über einen breiten Konzentrationsbereich (0,1 – 300  $\mu$ M 5-FU) mittels SRB-Assay.

Es konnte keine Erhöhung des Zellüberlebens von DLD1-Zellen durch  $CM_{MSC}$  und  $CM_{CCD18}$  vergleichbar der direkten Kokultur mit MSC und CCD18 (Vgl. 4.2.2) gezeigt werden. Bis zu einer 5-FU-Konzentration von 3  $\mu$ M war für DLD1-Zellen in Kultur mit  $CM_{MSC}$  und  $CM_{CCD18}$  lediglich geringe Steigerungen des Zellüberlebens erkennbar, verglichen mit DLD1-Zellen ohne CM (Abb. 9).



**Abb. 9. Konditionierte Medien von MSC und CCD18 vermitteln eine relevante Wachstumsförderung und 5-FU-Resistenz von HCT8-Zellen jedoch nicht von DLD1-Zellen.** Gezeigt sind  $MW \pm SD$  der normierten SRB-Signale. 5-FU-Behandlung über 72 h. \*  $p < 0,05$  für DLD1+ $CM_{MSC}$  vs. DLD1 ohne CM;  $n = 3$ .

Für HCT8-Zellen war eine Erhöhung des Zellüberlebens in Kultur mit  $CM_{MSC}$  und  $CM_{CCD18}$  ohne Behandlung und bei 5-FU-Konzentrationen von 0,1 – 10  $\mu$ M erkennbar, verglichen zu HCT8-Zellen ohne CM. Ein Signifikanzniveau konnte nicht erreicht werden. Für HCT8+ $CM_{MSC}$ -Kokulturen war von 0 – 1  $\mu$ M 5-FU ein erhöhtes Zellüberleben im Vergleich zu HCT8+ $CM_{CCD18}$ -Kokulturen erkennbar und für HCT8+ $CM_{CCD18}$ -Kokulturen von 3 – 30  $\mu$ M



5-FU ein erhöhtes Zellüberleben im Vergleich zu HCT8+CM<sub>MSC</sub>-Kokulturen (Abb. 9). Dies war vergleichbar den Untersuchungen in direkter Kokultur (Vgl. 4.2.1).

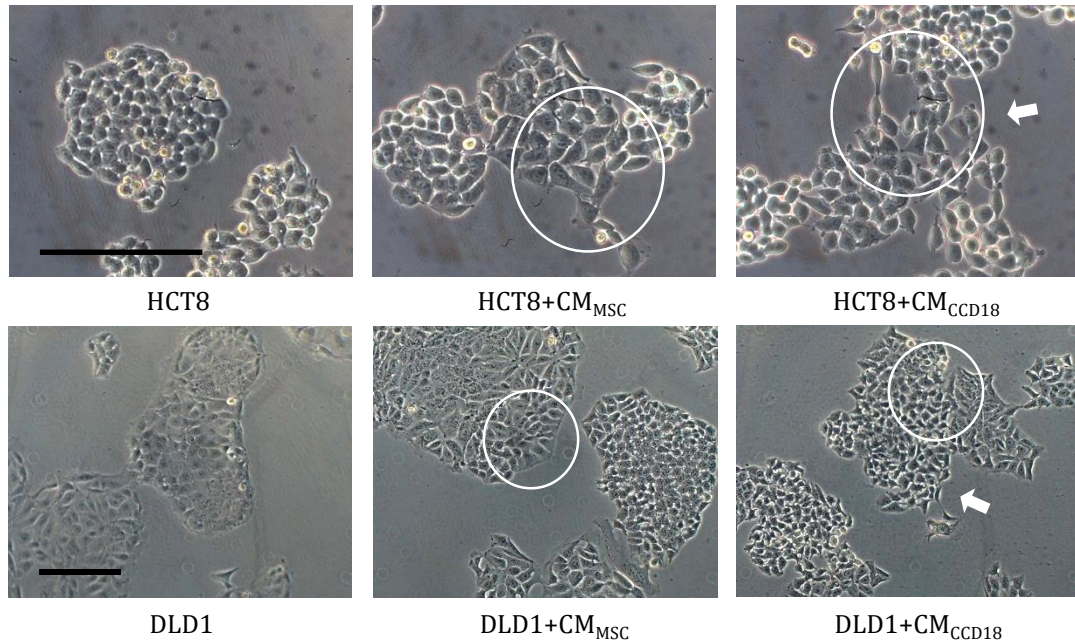
In der Berechnung der IC<sub>50</sub> zeigte sich für DLD1-Zellen mit CM<sub>MSC</sub> und CM<sub>CCD18</sub> keine Erhöhung der IC<sub>50</sub>, verglichen zu DLD1-Zellen ohne CM. Für HCT8-Zellen führte CM<sub>CCD18</sub> zu einer signifikanten Erhöhung der IC<sub>50</sub>, verglichen zu HCT8+CM<sub>MSC</sub>-Kokulturen und HCT8-Zellen ohne CM. Weiterhin führte CM<sub>MSC</sub> bei HCT8-Zellen ebenfalls zu einer Erhöhung der IC<sub>50</sub>, verglichen zu HCT8-Zellen ohne CM, ohne jedoch ein Signifikanzniveau zu erreichen (Tab. 9).

**Tab. 9. Errechnete IC<sub>50</sub> für 5-FU von DLD1- und HCT8-Zellen in konditionierten Medien von MSC und CCD18.** 5-FU-Behandlung über 72 h. \* p = 0,010 vs. HCT8 ohne CM, † p = 0,045 vs. HCT8+CM<sub>MSC</sub>; n = 3.

|                          | IC <sub>50</sub> für 5-FU |     |       |
|--------------------------|---------------------------|-----|-------|
|                          | Mittelwert                | SD  | Sign. |
| DLD1                     | 4,1 µM                    | 1,4 |       |
| DLD1+CM <sub>MSC</sub>   | 4,7 µM                    | 0,2 |       |
| DLD1+CM <sub>CCD18</sub> | 4,8 µM                    | 0,5 |       |
| HCT8                     | 5,2 µM                    | 1,0 |       |
| HCT8+CM <sub>MSC</sub>   | 7,1 µM                    | 2,1 |       |
| HCT8+CM <sub>CCD18</sub> | 11,1 µM                   | 2,4 | * †   |

DLD1- und HCT8-Zellen zeigten bei Kultivierung in CM<sub>MSC</sub> und CM<sub>CCD18</sub> morphologische Veränderungen vergleichbar zu den direkten Kokulturen. Bei Behandlung mit 5-FU traten in den HCT8+CM<sub>MSC</sub>- und den HCT8+CM<sub>CCD18</sub>-Kulturen ein spindelförmiges und polygonales Zellbild der HCT8-Zellen auf (Kreise in Abb. 10), verglichen mit HCT8-Zellen ohne CM. Ein Aufbrechen der Koloniestruktur war für HCT8-Zellen ohne CM und für die HCT8+CM<sub>MSC</sub>-Kulturen nicht erkennbar. Für die HCT8+CM<sub>CCD18</sub>-Kulturen war ein Aufbrechen der Koloniestruktur nur angedeutet (Kreise in Abb. 10).

DLD1-Zellen zeigten bei Kultivierung in CM<sub>MSC</sub> in geringem Maß und in CM<sub>CCD18</sub> in deutlicherem Maß ein polygonaleres und spindelförmigeres Zellbild, verglichen mit DLD1-Zellen ohne CM. Bei den DLD1-CM<sub>CCD18</sub>-Kulturen war das Aufbrechen der Kolonieränder erkennbar, jedoch nicht bei den DLD1-CM<sub>MSC</sub>-Kulturen und den DLD1-Kulturen ohne CM. Ebenso zeigten DLD1-Zellen ohne CM bei Behandlung mit 5-FU eine Zunahme blasenartiger Zellen. Dies war bei DLD1-Zellen in Kultur mit CM<sub>MSC</sub> und CM<sub>CCD18</sub> sowie 5-FU-Behandlung nicht erkennbar (Abb. 10).



**Abb. 10. Morphologische Veränderungen von HCT8- und DLD1-Zellen in konditionierten Medien von MSC und CCD18 bei 5-FU-Behandlung.** Exemplarisch gezeigt sind Phasenkontrastaufnahmen von HCT8- (200-fache Vergrößerung) und von DLD1-Zellen (100-fache Vergrößerung). Die Photographien wurden nach 48 h Behandlung mit 2  $\mu$ M 5-FU erstellt. Pfeile zeigen ein Aufbrechen der Koloniestruktur, Kreise veränderte Zellmorphologie. Der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu$ m.

Zusammenfassend wurde der in der direkten Kokultur erkennbare Effekt der MSC und CCD18 auf die 5-FU-Resistenz von DLD1-Zellen nicht in demselben Maß durch  $CM_{MSC}$  und  $CM_{CCD18}$  vermittelt. Für HCT8-Zellen zeigten sich wachstumsfördernde Einflüsse durch  $CM_{MSC}$  und  $CM_{CCD18}$ , sowie die Vermittlung einer 5-FU-Resistenz durch  $CM_{CCD18}$  und angedeutet durch  $CM_{MSC}$ . Die morphologischen Veränderungen von DLD1- und HCT8-Zellen waren durch  $CM_{MSC}$  und  $CM_{CCD18}$  zu einem Teil entsprechend den direkten Kokulturen reproduzierbar.

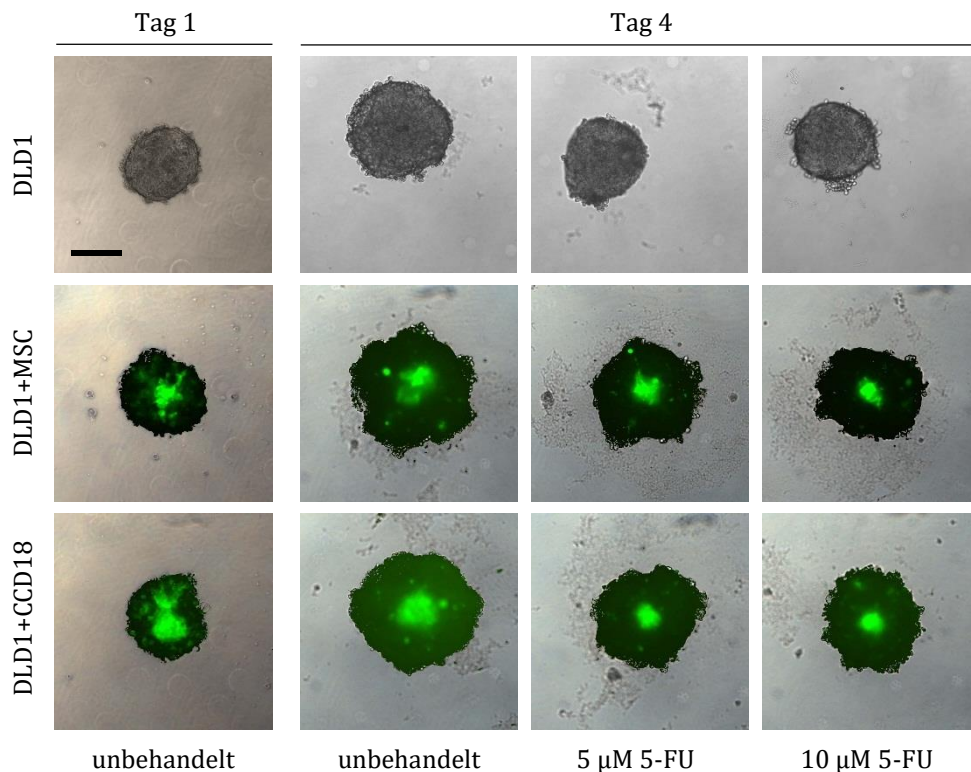
#### 4.3 Wachstumsverhalten und 5-FU-Sensitivität von CRC-Zellen bei direkter und indirekter Kokultur mit MSC und CCD18 im Sphäroidmodell

Untersuchungen der Arbeitsgruppe ergaben, dass DLD1- und HCT8-Zellen sich in der Fähigkeit zur Bildung von Sphäroiden unterscheiden. So bildeten HCT8-Zellen lediglich in direkter Kokultur mit MSC Sphäroide, jedoch nicht in Monokultur oder in Kokultur mit CCD18 (Widder *et al.* 2015). Daher erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit alleinig die Betrachtung von DLD1-Sphäroiden.

#### 4.3.1 MSC und CCD18 bilden in direkter Kokultur und bei 5-FU-Behandlung Sphäroide mit DLD1-Zellen

Für DLD1-Zellen konnten in Mono- und Kokultur Sphäroide generiert werden. Es wurden wt-DLD1 verwendet und neben wt- auch GFP-MSC und GFP-CCD18, um die Verteilung der Stromazellen im Sphäroid zu untersuchen.

Über den gesamten Versuchszeitraum blieben die Sphäroide sowohl unbehandelt als auch bei Behandlung mit 5-FU intakt und die GFP-Signale der GFP-MSC und GFP-CCD18 waren überwiegend im Sphäroidzentrum nachweisbar (Abb. 11). Mikroskopisch konnte nicht eindeutig zugeordnet werden, ob das Signal von vitalen, apoptotischen oder nekrotischen MSC und CCD18 stammte. In der Arbeitsgruppe durchgeführte Histologien deuteten jedoch auf die Anwesenheit von intakten MSC und CCD18 im Sphäroidzentrum hin (Widder *et al.* 2015).

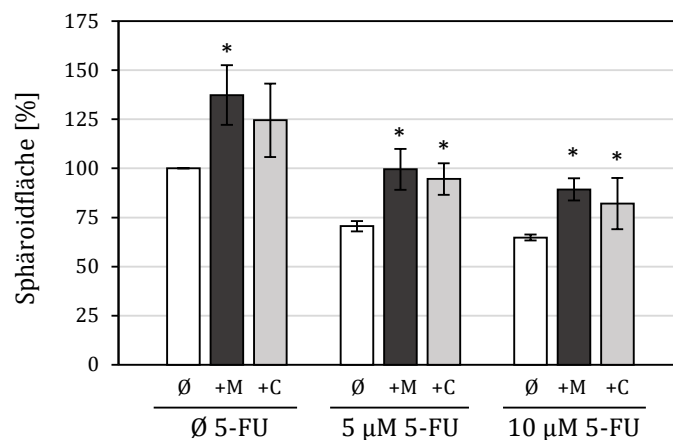


**Abb. 11. Nachweis von GFP-MSC und GFP-CCD18 innerhalb der DLD1-Sphäroide über den gesamten Versuchszeitraum und bei 5-FU-Behandlung.** Gezeigt ist die Lokalisierung von GFP-MSC und GFP-CCD18 innerhalb der Sphäroide über das Zusammenlegen von GFP-Signal-Aufnahmen und Phasenkontrastaufnahmen. 50-fache Vergrößerung, der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Sphäroidgröße über Diameter und APH-Assay ermittelt und als Kenngröße genutzt, um Aussagen über das Wachstum der Sphäroide und deren Ansprechen auf Behandlung mit 5-FU zu treffen. Die verwendeten Methoden zur

Größenbestimmung zeigten sich gleichwertig (Anhang 7), sodass fortan die Größenbestimmung über die Diameter erfolgte. Zum Größenvergleich wurden die Gesamtsphäroidflächen normiert auf die unbehandelte DLD1-Monokultur skaliert. Bei Versuchsende erfolgte keine Auftrennung der Zellpopulationen.

DLD1-Shäroide wiesen bei Kokultur mit MSC und CCD18 bereits unbehandelt größere Sphäroidflächen auf. Bei Behandlung mit 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M 5-FU zeigte sich eine Flächenreduktion sowohl der DLD1-Sphäroide in Monokultur als auch bei Kokultur mit MSC und CCD18. Die Sphäroidflächen der mit MSC und CCD18 kokultivierten DLD1-Sphäroide waren unter Behandlung mit 5-FU weiterhin größer als die Sphäroidflächen der monokultivierten DLD1-Sphäroide (Abb. 12).



**Abb. 12. DLD1-Zellen bilden bei direkter Kokultur mit MSC und CCD18 unbehandelt und bei 5-FU-Behandlung größere Sphäroide.** 5-FU-Behandlung über 72 h. Dargestellt sind MW  $\pm$  SD normierter Sphäroidflächen, die Bezeichnung erfolgt analog zu Abb. 7. \*  $p < 0,05$  vs. DLD1-Monokultur der jeweiligen Behandlungsgruppe;  $n = 4$ .

Da aufgrund der fehlenden Auftrennung der Zellen nach Versuchsende keine alleinige Betrachtung des DLD1-Anteils am Gesamtsphäroid erfolgte, wurden relative Reduktionen der Sphäroidflächen berechnet, skaliert auf die jeweiligen unbehandelten Kontrollen (Ø 5-FU in Abb. 12). Es zeigten sich leichte Zunahmen der relativen Sphäroidflächen der mit MSC und CCD18 kokultivierten DLD1-Sphäroide, verglichen mit monokultivierten DLD1-Sphäroiden (Tab. 10). Diese erreichten jedoch kein Signifikanzniveau.

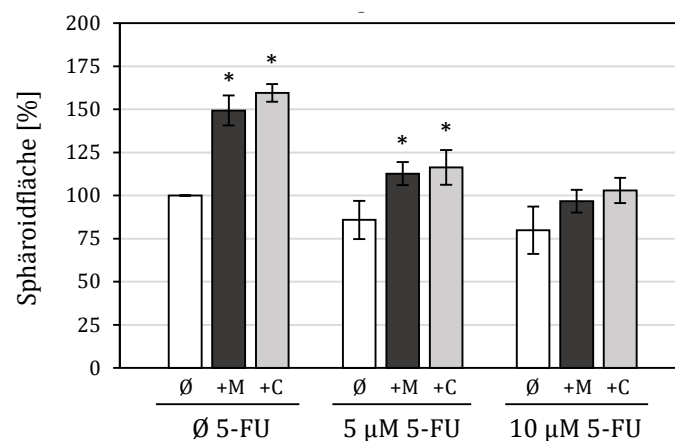
**Tab. 10. Relative Sphäroidflächen von DLD1-Sphäroiden bei direkter Kokultur mit MSC und CCD18 und 5-FU-Behandlung.** 5-FU-Behandlung über 72 h. MW  $\pm$  SD der relativen Sphäroidfläche skaliert auf unbehandelte Kontrollen der jeweiligen Kultivierungsgruppe.  $n = 4$ .

|            | unbehandelt | relative Sphäroidfläche bei<br>Behandlung mit 5-FU |                  |
|------------|-------------|--|------------------|
|            |             | 5 $\mu$ M  | 10 $\mu$ M       |
| DLD1       | 100 %       | 70,6 $\pm$ 2,6 %                                   | 64,8 $\pm$ 1,5 % |
| DLD1+MSC   | 100 %       | 72,6 $\pm$ 4,0 %                                   | 65,3 $\pm$ 4,3 % |
| DLD1+CCD18 | 100 %       | 76,7 $\pm$ 8,6 %                                   | 66,0 $\pm$ 4,9 % |

Zusammengefasst nehmen MSC und CCD18 an der Sphäroidbildung mit DLD1-Zellen teil. Die Flächenzunahme der mit MSC und CCD18 kokultivierten DLD1-Sphäroide konnte jedoch keiner bestimmten Zellpopulation zugeordnet werden. Daher konnte die Vermittlung einer 5-FU-Resistenz durch MSC und CCD18 nicht sicher ausgeschlossen werden. Im Weiteren sollte der Einfluss löslicher Faktoren von MSC und CCD18 auf DLD1-Sphäroide untersucht werden.

#### 4.3.2 Konditionierte Medien von MSC und CCD18 vermitteln eine Wachstumsförderung von DLD1-Sphäroiden, die unter 5-FU-Behandlung persistiert

DLD1-Sphäroide zeigten unbehandelt signifikant größere Sphäroidflächen bei Kultivierung mit  $CM_{MSC}$  und  $CM_{CCD18}$ , verglichen mit DLD1-Sphäroiden ohne CM. Bei Behandlung mit 5-FU kam es zu einer Reduktion der Sphäroidflächen aller Kultivierungsgruppen. Dabei waren die Flächen der DLD1+ $CM_{MSC}$ - und DLD1+ $CM_{CCD18}$ -Sphäroide weiterhin signifikant größer als die der DLD1-Sphäroide ohne CM. Bei Behandlung mit 10  $\mu M$  5-FU wurde sowohl mit  $CM_{MSC}$  als auch  $CM_{CCD18}$  nicht länger signifikant größere Sphäroidflächen erreicht (Abb. 13).



**Abb. 13. Konditionierte Medien von MSC und CCD18 vermitteln eine Wachstumsförderung von DLD1-Sphäroiden, die unter 5-FU-Behandlung persistiert.** 5-FU-Behandlung über 72 h. Dargestellt sind MW  $\pm$  SD normierter Sphäroidflächen. +M und +C bezeichnet die Kultivierung im jeweiligen CM, Ø die Kultivierung ohne CM. \*  $p < 0,05$  vs. DLD1 ohne CM der jeweiligen Behandlungsgruppe;  $n = 3$ .

Zur Untersuchung der Vermittlung einer 5-FU-Resistenz durch  $CM_{MSC}$  und  $CM_{CCD18}$  erfolgte die Berechnung der relativen Flächenreduktion, skaliert auf die jeweiligen unbehandelten Kontrollen (Ø 5-FU in Abb. 13). Bei Behandlung mit 5  $\mu M$  und 10  $\mu M$  5-FU zeigten DLD1-Sphäroide ohne CM eine geringere Flächenreduktion im Vergleich zu DLD1+ $CM_{MSC}$ - und DLD1+ $CM_{CCD18}$ -Sphäroiden, ohne ein Signifikanzniveau zu erreichen (Tab. 11).

**Tab. 11. Relative Sphäroidflächen von DLD1-Sphäroiden in konditionierten Medien von MSC und CCD18 bei 5-FU-Behandlung.** 5-FU-Behandlung über 72 h. MW  $\pm$  SD der relativen Sphäroidfläche skaliert auf unbehandelte Kontrollen der jeweiligen Kultivierungsgruppe.  $n = 3$ .

|                          | unbehandelt | relative Sphäroidfläche bei<br>Behandlung mit 5-FU |                   |
|--------------------------|-------------|--|-------------------|
|                          |             | 5 $\mu$ M  | 10 $\mu$ M        |
| DLD1                     | 100 %       | 85,8 $\pm$ 11,1 %                                  | 79,9 $\pm$ 13,7 % |
| DLD1+CM <sub>MSC</sub>   | 100 %       | 75,8 $\pm$ 8,1 %                                   | 65,0 $\pm$ 7,1 %  |
| DLD1+CM <sub>CCD18</sub> | 100 %       | 73,0 $\pm$ 7,9 %                                   | 64,5 $\pm$ 4,5 %  |

Zusammengefasst fand sich bei Kultivierung von DLD1-Sphäroiden mit CM<sub>MSC</sub> und CM<sub>CCD18</sub> eine Zunahme der Sphäroidfläche im Vergleich zu DLD1-Sphäroiden ohne CM. Dieser CM<sub>MSC</sub>- und CM<sub>CCD18</sub>-vermittelte Wachstumsvorteil blieb unter 5-FU-Behandlung partiell erhalten. Vergleichbar den direkten DLD1-Kokulturen im Monolayer fand sich kein Hinweis auf die Vermittlung einer 5-FU-Resistenz durch CM<sub>MSC</sub> und CM<sub>CCD18</sub>.

#### 4.4 Zellzyklusanalyse von CRC-Zellen bei direkter und indirekter Kokultur mit MSC und CCD18 und Behandlung mit 5-FU

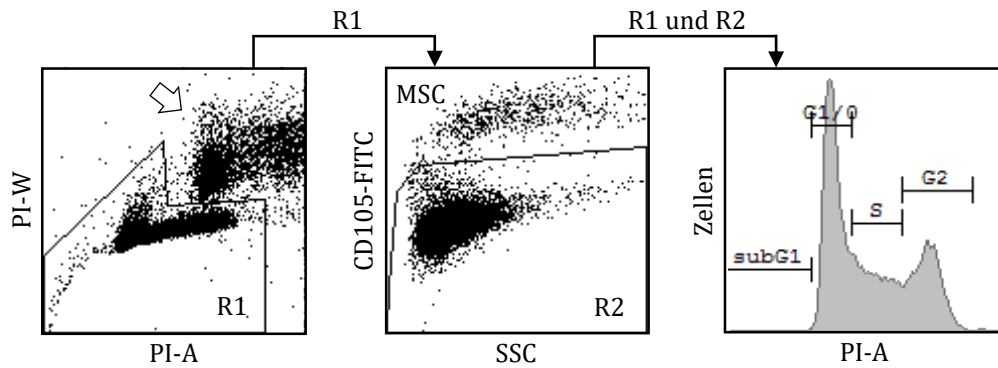
Die Zellzyklusanalysen von DLD1-Zellen zeigten keine Unterschiede der Zellzyklusverteilung zwischen mono- und kokultivierten DLD1-Zellen mit und ohne 5-FU-Behandlung (Anhang 8). Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf die weitergehende Analyse des Zellzyklus von DLD1-Kokulturen verzichtet.

##### 4.4.1 CCD18 supprimieren im Gegensatz zu MSC den 5-FU-bedingten Zellzyklusarrest von HCT8-Zellen in direkter Kokultur

Zur Zellzyklusanalyse von HCT8-Zellen nach direkter Kokultur mit MSC und CCD18 wurden MSC und CCD18 mit anti-CD105-FITC detektiert (Abb. 14). HCT8-Zellen ließen sich nicht mit anti-CD105-FITC detektieren (Anhang 9).

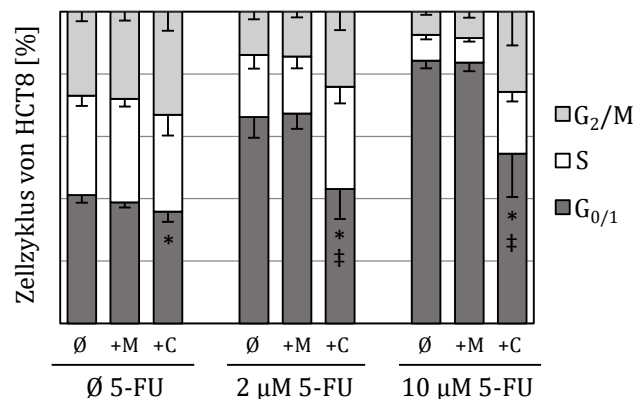
Da die subG<sub>1</sub>-Fraktion, als Korrelat apoptotischer Zellen, mit der verwendeten Methode weder MSC, CCD18 oder HCT8-Zellen zugeordnet werden konnte, wurde sie im Weiteren nicht betrachtet. Sie überstieg in keiner der Proben 5,5 % und es zeigten sich keine Unterschiede der subG<sub>1</sub>-Fraktion innerhalb und zwischen den Behandlungsgruppen (Daten nicht gezeigt).





**Abb. 14. Durchflusszytometrie zur Zellzyklusanalyse von HCT8-Zellen nach direkter Kokultur mit MSC und CCD18.** Exemplarische Darstellung von unbehandelten HCT8+MSC-Kokulturen nach 48 h. Das PI-Signal wurde nach Fläche (PI-A) und Breite (PI-W) aufgetragen um Zelldoubletten (Pfeil) auszuschließen (R1, links). Danach erfolgte die Auftragung von R1 nach SSC und FITC-Signal (Mitte), sodass der Zellzyklus der CD105-negativen HCT8 (R1 und R2) analysiert werden konnte (rechts).

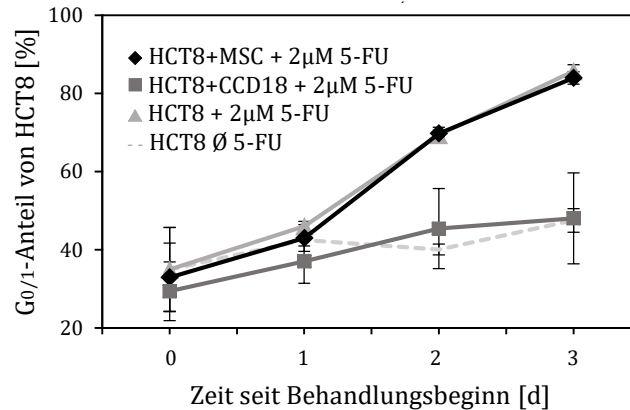
In der unbehandelten Gruppe war der Anteil der HCT8-Zellen in der  $G_{0/1}$ -Phase bei Präsenz von CCD18 reduziert, verglichen mit HCT8-Zellen in Monokultur. Nach Behandlung mit  $2 \mu\text{M}$  5-FU war für HCT8-Zellen in Monokultur und bei Präsenz von MSC ein Anstieg der  $G_{0/1}$ -Phase zu erkennen, welcher bei Präsenz von CCD18 deutlich geringer ausgeprägt war. Nach Behandlung mit  $10 \mu\text{M}$  5-FU zeigte sich für HCT8-Zellen in Monokultur und bei Präsenz von MSC ein weiterer Anstieg der  $G_{0/1}$ -Phase, der bei Präsenz von CCD18 wiederum geringer ausgeprägt war (Abb. 15.).



**Abb. 15. Zellzyklusverteilung von HCT8-Zellen nach direkter Kokultur mit MSC und CCD18 bei 5-FU-Behandlung.** 5-FU-Behandlung für 48 h. Dargestellt sind MW  $\pm$  SD der jeweiligen Zellzyklusphasen. Die Bezeichnung erfolgt analog zu Abb. 5. \*  $p < 0,05$  vs. HCT8 in Monokultur, †  $p < 0,05$  vs. HCT8+MSC der jeweiligen Behandlungsgruppe;  $n = 4$  für Ø 5-FU und  $2 \mu\text{M}$  5-FU,  $n = 3$  für  $10 \mu\text{M}$  5-FU.

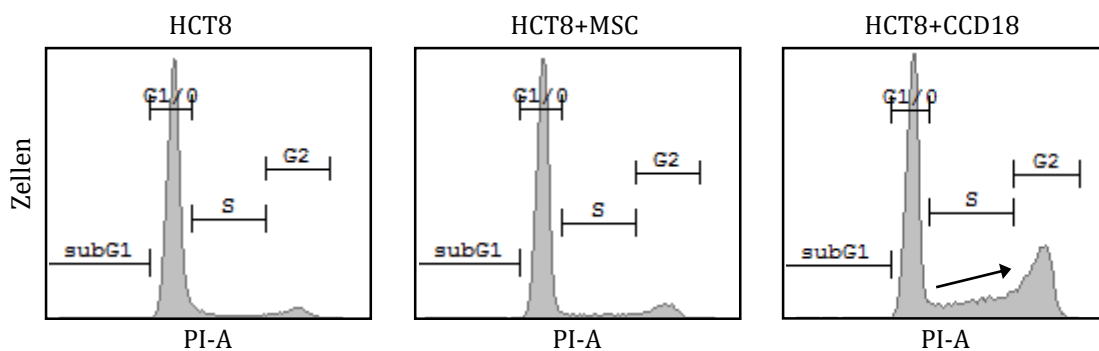
Zur Darstellung des Verlaufs der 5-FU-bedingten Zellzyklusveränderungen der HCT8-Zellen bei Kokultur mit MSC und CCD18 wurden Kinetiken der  $G_{0/1}$ -Phasen aufgetragen. Dabei zeigte sich für unbehandelte HCT8-Zellen eine geringe Zunahme der HCT8-Zellen in der  $G_{0/1}$ -Phase bis Tag 3 nach Behandlungsbeginn. Bei Behandlung mit  $2 \mu\text{M}$  5-FU war ab Tag 2 für HCT8-Zellen in Monokultur und bei Präsenz von MSC eine Akkumulation in der  $G_{0/1}$ -Phase zu erkennen. Bei Präsenz von CCD18 zeigte sich eine geringere Akkumulation der

HCT8-Zellen in der  $G_{0/1}$ -Phase, vergleichbar der Kinetik unbehandelter HCT8-Zellen (Abb. 16). Die Kinetiken der  $G_{0/1}$ -Phasen von unbehandelten HCT8-Zellen in Kokultur mit MSC und CCD18 verhielten sich vergleichbar der von unbehandelten HCT8-Zellen in Monokultur und wurden aus Übersichtsgründen daher nicht abgebildet.



**Abb. 16.** Bei direkter Kokultur verhindern CCD18 im Gegensatz zu MSC die 5-FU-bedingte Akkumulation der HCT8-Zellen in der  $G_{0/1}$ -Phase. 5-FU-Behandlung mit  $2 \mu\text{M}$ .  $n = 3$ .

Bei Behandlung mit  $10 \mu\text{M}$  5-FU war bei Präsenz von CCD18 ein rampenförmiger Anstieg der S-Phase von HCT8-Zellen zu detektieren (Pfeil in Abb. 17). Dies zeigte sich bei HCT8-Zellen in Monokultur und bei Präsenz von MSC nicht und deutet darauf hin, dass CCD18 den Eintritt von HCT8-Zellen in einen 5-FU-bedingten  $G_{0/1}$ - oder  $G_2/M$ -Arrest verzögern.



**Abb. 17.** Histogramme der Zellzyklusverteilung von HCT8-Zellen nach Kokultur mit MSC und CCD18 bei 5-FU-Behandlung. Nach 48 h Behandlung mit  $10 \mu\text{M}$  5-FU. Exemplarische Darstellung eines Versuchs, der Pfeil zeigt einen rampenförmigen Anstieg der S-Phase an.

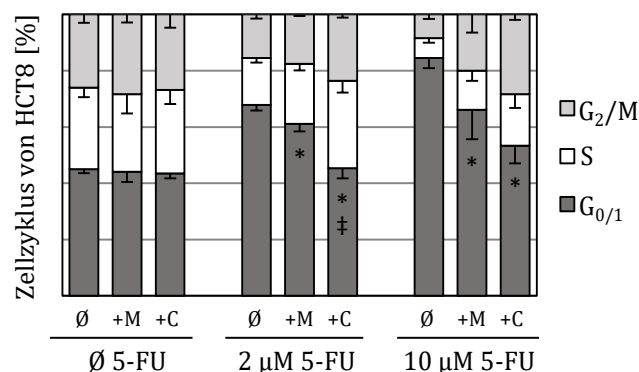
Zusammengefasst führte die Kokultur von HCT8-Zellen mit CCD18 zu einer deutlich geringeren Akkumulation der HCT8-Zellen im 5-FU-bedingten  $G_{0/1}$ -Arrest bei Behandlung mit  $2 \mu\text{M}$  5-FU, bzw. zu einem verzögerten 5-FU-bedingten  $G_{0/1}$ - oder  $G_2/M$ -Arrest bei  $10 \mu\text{M}$  5-FU. Dies ist mit der unter 4.2.1 gezeigten CCD18-vermittelten 5-FU-Resistenz der HCT8-Zellen vereinbar. Im Gegensatz dazu kam es bei Kokultur von HCT8-Zellen mit MSC zu keiner Veränderung der Zellzyklusverteilung der HCT8-Zellen, obwohl die Vermittlung einer 5-FU-Resistenz durch MSC gezeigt werden konnte.



#### 4.4.2 Konditionierte Medien von MSC und CCD18 supprimieren den 5-FU-bedingten Zellzyklusarrest von HCT8-Zellen

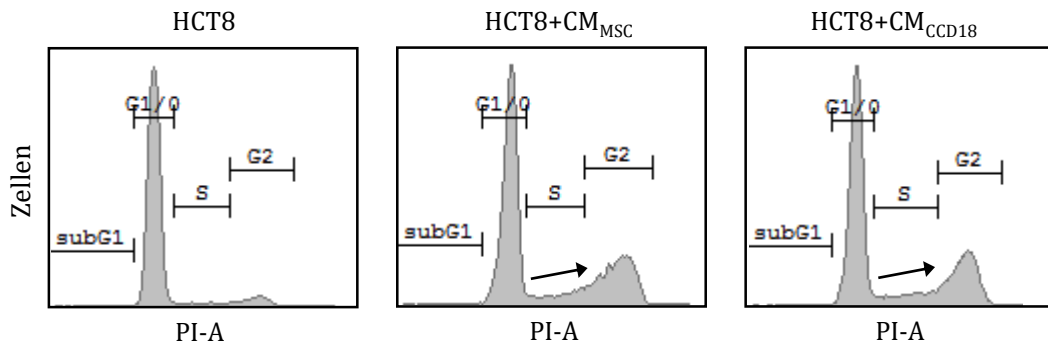
Anhand der Verwendung konditionierter Medien sollte der Einfluss löslicher Faktoren von MSC und CCD18 auf die Zellzyklusverteilung von HCT8-Zellen untersucht werden. Im Vergleich zum Vorgehen unter 4.4.1 entfiel die durchflusszytometrische Auftrennung der Zellpopulationen. Auf die Darstellung der subG<sub>1</sub>-Fraktion wurde wiederum verzichtet, da diese einen Gesamtanteil von 3 % in den einzelnen Proben nicht überstieg und keine Unterschiede innerhalb und zwischen den Behandlungsgruppen aufgezeigt werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Unbehandelt waren keine Unterschiede der Zellzyklusverteilung von HCT8-Zellen mit CM<sub>MSC</sub>, CM<sub>CCD18</sub> oder ohne CM erkennbar. Bei Behandlung mit 2 µM 5-FU kam es bei Kultivierung in CM<sub>MSC</sub> sowie ohne CM zu einem Anstieg der HCT8-Zellen in der G<sub>0/1</sub>-Phase. Jedoch zeigte sich, dass mit CM<sub>MSC</sub> der Anteil von HCT8-Zellen in der G<sub>0/1</sub>-Phase signifikant geringer war als ohne CM. Bei Kultivierung in CM<sub>CCD18</sub> zeigte sich wiederum ein geringerer Anteil von HCT8-Zellen in der G<sub>0/1</sub>-Phase, verglichen mit CM<sub>MSC</sub> und ohne CM. Bei Behandlung mit 10 µM 5-FU traten diese Unterschiede zwischen der Kultivierung mit CM<sub>MSC</sub>, CM<sub>CCD18</sub> und ohne CM noch deutlicher hervor (Abb. 18).



**Abb. 18. Zellzyklusanalyse von HCT8-Zellen in konditionierten Medien von MSC und CCD18 bei 5-FU-Behandlung.** Behandlung mit 5-FU für 48 h. Dargestellt sind MW ± SD der jeweiligen Zellzyklusphasen. Die Bezeichnung erfolgt analog zu Abb. 15. \* p < 0,05 vs. HCT8 ohne CM, † p < 0,05 vs. HCT8+CM<sub>MSC</sub> der jeweiligen Behandlungsgruppe; n = 3 für HCT8 ohne CM und HCT8+CM<sub>CCD18</sub>, n = 2 für HCT8+CM<sub>MSC</sub>.

Bei Behandlung mit 10 µM 5-FU zeigten HCT8-Zellen bei Kultivierung mit CM<sub>MSC</sub> und CM<sub>CCD18</sub> ein rampenförmiges Ansteigen der S-Phase (Pfeile in Abb. 19). Dies war vergleichbar den Histogrammen der direkten HCT8+CCD18-Kokultur mit 10 µM 5-FU (Vgl. Abb. 17) und deutete darauf hin, dass CM<sub>MSC</sub> und CM<sub>CCD18</sub> den Eintritt von HCT8-Zellen in einen 5-FU-bedingten G<sub>0/1</sub>- oder G<sub>2/M</sub>-Arrest verzögern.



**Abb. 19. Histogramme der Zellzyklusverteilung von HCT8-Zellen in konditionierten Medien von MSC und CCD18 bei 5-FU-Behandlung.** Nach 48 h Behandlung mit 10  $\mu$ M 5-FU. Exemplarische Darstellung eines Versuchs, die Pfeile zeigen einen rampenförmigen Anstieg der S-Phase an.

Zusammengefasst führte die direkte Kokultur von HCT8-Zellen mit CCD18 als auch die Kultivierung mit CM<sub>CCD18</sub> zu einer geringeren Akkumulation der HCT8-Zellen in der G<sub>0/1</sub>-Phase bei Behandlung mit 2  $\mu$ M 5-FU, bzw. zu einem verzögerten 5-FU-bedingten G<sub>0/1</sub>- oder G<sub>2</sub>/M-Arrest bei Behandlung mit 10  $\mu$ M 5-FU. Bei der Kultivierung mit CM<sub>MSC</sub> zeigte sich ebenfalls dieser Effekt auf den Zellzyklus von HCT8-Zellen. Dies stellt trotz der geringen Stichprobenzahl für CM<sub>MSC</sub> einen prägnanten Unterschied von MSC gegenüber CCD18 dar und deutet auf eine differentielle Interaktion von MSC bzw. ihrer löslichen Faktoren mit HCT8-Zellen hin.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Wesentliche Resultate

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit konnte bei Behandlung mit 5-FU, Oxaliplatin und Cisplatin eine spezifische Resistenz der MSC gegenüber CCD18 gezeigt werden. Darüber hinaus zeigten MSC und CCD18 eine Zytostatikaresistenz bei klinisch relevanten Konzentrationen diverser Zytostatika, verglichen mit sensitiven Tumorzelllinien.

Im Gegensatz zur CRC-Zelllinie DLD1 konnte für die CRC-Zelllinie HCT8 sowohl bei direkter Kokultur mit MSC und CCD18, als auch durch deren konditionierte Medien die Vermittlung einer 5-FU-Resistenz gezeigt werden. Damit vereinbar wurde der 5-FU-bedingte Zellzyklusarrest von HCT8-Zellen bei direkter Kokultur mit CCD18 sowie bei Kultur mit konditionierten Medien von MSC und CCD18 bei niedrigen 5-FU-Konzentrationen supprimiert bzw. bei höheren Konzentrationen verzögert. Verglichen dazu konnte keine Veränderung des 5-FU-bedingen Zellzyklusarrests bei direkter Kokultur von HCT8-Zellen mit MSC beobachtet werden. Dies zeigt, dass MSC im Gegensatz zu CCD18 eine 5-FU-Resistenz der HCT8-Zellen differentiell über verschiedene Mechanismen vermitteln.

Für DLD1-Zellen wurde eine Wachstumsförderung bei direkter Kokultur mit MSC und CCD18 gezeigt, welche bei 5-FU-Behandlung persistierte. Diese Wachstumsförderung war mittels konditionierter Medien von MSC und CCD18 nicht reproduzierbar. Im Sphäroidmodell zeigte sich eine Größenzunahme der DLD1-Sphäroide sowohl durch direkte Kokultur mit MSC und CCD18, als auch durch deren konditionierte Medien. Diese Größenzunahme persistierte bei 5-FU-Behandlung. Daher wird davon ausgegangen, dass die Vermittlung der Sphäroidgrößenzunahme durch lösliche Faktoren von MSC und CCD18 erfolgt.

Weiterhin wurden bei direkter Kokultur von DLD1- und HCT8-Zellen mit MSC und CCD18, als auch mit deren konditionierten Medien morphologische Veränderungen der CRC-Zellen und ihrer Koloniestrukturen beobachtet. Diese persistierten unter 5-FU-Behandlung. Daher wird von einer Vermittlung dieser morphologischen Veränderungen zum Teil durch lösliche Faktoren der MSC und CCD18 ausgegangen.

Zusammenfassend zeigten MSC und CCD18 abhängig von der CRC-Zelllinie vergleichbare vermittelte Effekte, sowohl bei direkter Kokultur, als auch durch ihre basal sezernierten löslichen Faktoren. MSC zeigten darüber hinaus eine differentielle Vermittlung einer 5-FU-Resistenz, spezifisch abhängig von der CRC-Zelllinie und dem Zellkontakt mit CRC-Zellen.

---

## 5.2 Die spezifische Zytostatikaresistenz von MSC gegenüber CCD18

In der vorliegenden Arbeit wurde die Sensitivität von MSC gegenüber CCD18, als weitere Stromazellen, untersucht. Hierbei zeigte sich eine erhöhte Resistenz der MSC gegenüber CCD18 bei Behandlung mit 5-FU, Oxaliplatin und Cisplatin, gemessen an der  $IC_{50}$  und  $IC_{90}$ . Darüber hinaus waren MSC und CCD18 bei klinisch relevanten Konzentrationen der verwendeten Zytostatika resistent, verglichen mit sensitiven Tumorzelllinien.

Mehrere Arbeitsgruppen konnten bisher vergleichbare Zytotoxizitätsanalysen von MSC bei Behandlung mit 5-FU, Cisplatin, Vincristin und Etoposid zeigen (Li *et al.* 2004; Mueller *et al.* 2006; Liang *et al.* 2011; Kucerova *et al.* 2012). Die unterschiedlichen angewandten Methoden lassen jedoch keinen direkten Vergleich der ermittelten IC zu. In den genannten Arbeiten erfolgte ebenso der Vergleich mit sensitiven Zellen um eine CTx-Resistenz der MSC herauszuarbeiten. Li *et al.* (2004) verglichen die CTx-Sensitivität von MSC mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes, wobei letztere eine höhere Resistenz für Etoposid und Vincristin aufwiesen und eine niedrigere für Busulphan und Cyclophosphamid. In Zusammenschau mit diesen Ergebnissen wird deutlich, dass MSC eine spezifische CTx-Sensitivität besitzen, was durch die Daten der vorliegenden Arbeit untermauert wird.

Es sind diverse Mechanismen beschrieben, die zur CTx-Resistenz von MSC führen. So exprimierten MSC im Vergleich zu Fibroblasten vermehrt Proteine, die an der Wirkung und dem Metabolismus von 5-FU beteiligt sind (u. a. Thymidylatsynthase und ABC-B5) (Kucerova *et al.* 2008) und zu einer 5-FU-Resistenz führen (Longley *et al.* 2003; Longley und Johnston 2005). Ebenso zeigten MSC im Vergleich zu Tumorzellen eine geringere Caspase-9-Aktivierung bei Behandlung mit Apoptose-induzierenden Cisplatin-Konzentrationen (Mueller *et al.* 2006). Unter zytotoxischen Bedingungen mit reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies waren MSC und humane Fibroblasten im Vergleich zu Pankreas- $\beta$ -Zellen resistent, bedingt durch eine erhöhte Expression von Glutathion und weiteren Detoxifikationsproteinen (Valle-Prieto und Conget 2010).

Dass CCD18 in der vorliegenden Arbeit sensitiver erscheinen als MSC könnte mehrere Ursachen haben. So zeigten CCD18 eine geringere Populationsverdopplungszeit gegenüber MSC (Anhang 1) und aus der Literatur ergibt sich, dass proliferierende Zellen eine höhere CTx-Sensitivität besitzen als quieszente Zellen (Mellor *et al.* 2005). Weitergehend könnten die Unterschiede von MSC und CCD18 durch die Analyse von CTx- und Apoptose-Effektoren sowie CTx-bedingten Schäden untersucht werden. Als Zeichen einer erhöhten Resistenz der MSC gegenüber CCD18 sind jedoch die deutlich unterschiedlichen  $IC_{90}$  bei Behandlung mit Oxaliplatin und Cisplatin zu werten. Weiterhin handelt es sich bei MSC im Gegensatz zu CCD18 um eine heterogene Population nativer Zellen, welche neben langsamen auch schnell

---

proliferierende Subpopulationen enthält (Colter *et al.* 2001; Gronthos *et al.* 2003). Daher ist denkbar, dass MSC-Subpopulationen unterschiedlich auf Zytostatika ansprechen und die Gesamtpopulation durch einen quieszenten Anteil resistent erscheint.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten MSC stammen von CTx-behandelten Patienten. Da MSC gesunder Spender auf Etoposid sensitiver reagierten als MSC von CTx-behandelten Spendern (Mueller *et al.* 2006), ist es möglich, dass sich die CTx-Sensitivität von CCD18 und MSC gesunder Spender kaum unterscheiden. Die zugrunde liegenden Mechanismen der Alterierung der CTx-Sensitivität von MSC CTx-behandelter Patienten umschließt womöglich eine Vielzahl zellulärer, genetischer und epigenetischer Veränderungen und sollten zukünftig weiter untersucht werden. Dies kann aus einer weiteren Perspektive zum Verständnis der Entstehung von CTx-Resistenz im Tumor beitragen.

### **5.3 Die spezifische Vermittlung einer Wachstumsförderung der CRC-Zellen durch MSC und CCD18**

Mit der vorliegenden Arbeit konnte ohne 5-FU-Behandlung ein wachstumsfördernder Effekt von MSC bei direkter Kokultur mit DLD1-Zellen, nicht aber bei Präsenz von CCD18 gezeigt werden. HCT8-Zellen zeigten bei direkter Kokultur mit MSC und CCD18 keine Wachstumsförderung. In den indirekten Kokulturen war ein wachstumsfördernder Effekt von MSC- und CCD18-konditionierten Medien auf HCT8-Zellen erkennbar, nicht jedoch auf DLD1-Zellen. Es zeigte sich daher die spezifische Vermittlung einer Wachstumsförderung von MSC und CCD18, abhängig von der CRC-Zelllinie und der Modalität der Kokultur.

Ein Grund für die starke Varianz des wachstumsfördernden Effekts MSC-konditionierter Medien auf HCT8-Zellen könnte in den interindividuellen Unterschieden der verwendeten nativen MSC und ihres sekretorischen Profils liegen (Klopp *et al.* 2011; Kim *et al.* 2014). Arbeiten, die *in vitro* eine Aktivierung der MSC durch Tumorzellen-sezernierte Faktoren zeigten, wiesen ebenfalls auf die quantitative und qualitative Variabilität der sezernierten Faktoren von MSC hin (Martin *et al.* 2010; Kucerova *et al.* 2013).

Die hier ermittelten Einflüsse zeigen bei Präsenz von MSC eine Wachstumsförderung der DLD1-Zellen sowie keine Wachstumsförderung der HCT8-Zellen. Da MSC bei sehr niedrigen Zelldichten optimal expandieren (Neuhuber *et al.* 2008), wird eine parakrine Steuerung ihres Wachstums angenommen (Kim *et al.* 2014). Daher könnten hohe Zelldichten der MSC bei der Gewinnung von konditionierten Medien oder der Zellkontakt von MSC mit Tumorzellen bei direkter Kokultur das sekretorische Profil der MSC zu einer Wachstumsinhibition verschieben (Mele *et al.* 2013). So liegen Arbeiten vor, welche *in vitro* eine MSC-vermittelte Wachstumsinhibition zeigten. Die beteiligten Mechanismen umfassen u. a. eine

---

Zellkontakt-abhängige Akt-Inaktivierung in den Tumorzellen (Khakoo *et al.* 2006) sowie den Zellzyklusarrest der Tumorzellen durch MSC-sezerniertes DKK-1 (Zhu *et al.* 2009) und Oncostatin-M (Wang *et al.* 2012). Andererseits findet sich eine Vielzahl an Arbeiten, welche *in vitro* speziell im CRC-Modell eine MSC-vermittelte Wachstumsförderung untersuchten. Dabei war der Effekt u. a. abhängig von den verwendeten Zelldichten bei direkter Kokultur (Mele *et al.* 2013). Bei indirekter Kokultur konnte durch MSC-sezerniertes IL-6 und NRG-1 die Zunahme der Proliferation, Migration, Invasion und Apoptoseresistenz von CRC-Zellen gezeigt werden (De Boeck *et al.* 2013; Lin *et al.* 2013). Die Komplexität der MSC-Tumorzellen-Interaktionen wird durch Untersuchungen von Waterman *et al.* (2012) erweitert, welche zwei MSC-Subtypen beschrieben, die *in vitro* Wachstum, Migration und Invasion der Tumorzellen gegensätzlich beeinflussten. Anhand der gezeigten Daten in der vorliegenden Arbeit wird daher eine Wachstumsförderung durch MSC angenommen, die zum Teil über basal sezernierte lösliche Faktoren vermittelt wird, Tumorzellen-spezifisch und abhängig von der MSC-Zelldichte ist.

Aktuelle Arbeiten beschreiben die Diskrepanz von Inhibition und Förderung des Tumorzellenwachstums auch *in vivo* (Klopp *et al.* 2011). Dabei stellte sich die Abhängigkeit des MSC-vermittelten Effekts von der Versuchskonstruktion heraus und damit wiederum eine differentielle Interaktion der MSC mit Tumorzellen. So wird bei gleichzeitigem Einbringen von Tumorzellen und MSC im Xenograft mehrheitlich eine über IL-6 und SDF-1 vermittelte Wachstumsförderung beschrieben und als Beitrag der MSC an der Initialphase von Tumorformierung und -proliferation interpretiert (Muehlberg *et al.* 2009; Tsai *et al.* 2011). Eine MSC-vermittelte Modulierung von Tumorzellmigration und Angiogenese im Tumor wird als Förderung der Tumorprogression und Metastasierung interpretiert und erfolgt u. a. über CCL5 (Karnoub *et al.* 2007). Es wird angenommen, dass Tumor-integrierte MSC dabei zu TAF differenzieren und über diesen Phänotyp an der Bildung des Tumorstromas beteiligt sind (Spaeth *et al.* 2009; Quante *et al.* 2011; Kidd *et al.* 2012). Des Weiteren zeigten Ramasamy *et al.* (2007), dass MSC das Tumorzellenwachstum *in vitro* inhibierten, *in vivo* jedoch förderten. Die Kokultur *in vitro* ist daher als stark artifizielles Modell zur Untersuchung des komplexen Verhaltens von MSC *in vivo* zu werten. Zukünftige Arbeiten sollten die Biologie von MSC daher eingehender anhand von *in vivo* Modellen untersuchen.

Aus der Literatur geht hervor, dass Fibroblasten unterschiedlicher Herkunft ebenso Inhibition und Förderung des Tumorzellenwachstums vermitteln können. So förderte CCD18-sezernerter KGF das Wachstum von CRC-Zellen (Visco *et al.* 2009), bzw. vermittelte CCD18-sezernerter HGF Tumorstammzell-Eigenschaften im CRC-Modell (Vermeulen *et al.* 2010). In einem weiteren Tumormodell führte die indirekte Kokultur mit primären

---

Fibroblasten zu einer IL-6-vermittelten Wachstumsförderung (Studebaker *et al.* 2008), wobei IL-6 ebenfalls von CCD18 sezerniert wird (Gruchlik *et al.* 2012). Eine Wachstumsinhibition von CRC-Zellen zeigte sich bei Kokultur mit Hautfibroblasten (Mele *et al.* 2013). Des Weiteren konnten bei indirekter Kokultur mit primären Fibroblasten und TAF keine Veränderungen des Wachstums von CRC-Zellen beobachtet werden (Berdiel-Acer *et al.* 2011). Auch wenn vermutet wird, dass Gewebsfibroblasten an der initialen Tumorstroma-Formierung beteiligt sind (Kidd *et al.* 2008), konnte mittels TAF die Biologie des Tumorstromas differenzierter untersucht werden (Orimo *et al.* 2005; Berdiel-Acer *et al.* 2011). Daher bieten sich MSC als mögliche TAF-Präkursorzellen für zukünftige Untersuchungen ebenso an.

So ergeben sich zusammengefasst gemeinsame Mechanismen und Effektoren von MSC und Fibroblasten bei der Wachstumsförderung von Tumorzellen, wobei MSC anhand der Literatur zu differentieller Interaktion mit Tumorzellen befähigt sind und sich darin von Fibroblasten unterscheiden. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nachvollzogen werden und qualifiziert MSC, insbesondere als Präkursorzellen der TAF, für den Einsatz im Tumorstroma-Modell.

#### **5.4 MSC und CCD18 bewirken eine spezifische Therapeutikaresistenz von CRC-Zellen**

##### *5.4.1 Die klinische Bedeutung der Therapeutikaresistenz im CRC-Modell*

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass zwischen den verwendeten CRC-Zelllinien Unterschiede bei der MSC- und CCD18-vermittelten 5-FU-Resistenz existieren. So wurde bei HCT8-Zellen eine 5-FU-Resistenz bei direkter und indirekter Kokultur mit Stromazellen beobachtet, bei DLD1-Zellen jedoch eine Wachstumsförderung, die unter 5-FU-Behandlung persistierte. Beide CRC-Zelllinien stellen exemplarisch verschiedene Genotypen in der CRC-Karzinogenese dar, da HCT8-Zellen, im Gegensatz zu DLD1-Zellen, ein funktionstüchtiges p53 besitzen (Liu und Bodmer 2006). Die Wirkung von 5-FU wird bei HCT8-Zellen aufgrund ihrer erhöhten Thymidylatsynthase-Expression über die Akkumulation von RNA-Schäden angenommen. Über p53 kommt es schließlich zum Eintritt der HCT8-Zellen in den G<sub>0/1</sub>- und G<sub>2</sub>/M-Arrest (Pizzorno *et al.* 1995). Dieser Zellzyklusarrest der HCT8-Zellen unter 5-FU-Behandlung konnte in der vorliegenden Arbeit nachvollzogen werden.

Weiterhin wurde gezeigt, dass die 5-FU-Resistenz der HCT8-Zellen bei der direkten Kokultur mit MSC mit einer unveränderten Zellzyklusverteilung einhergeht, es bei der Kokultur mit CCD18 bzw. Kultivierung mit CM<sub>MSC</sub> und CM<sub>CCD18</sub> jedoch zu einem ausbleibenden bzw. verzögerten Zellzyklusarrest der HCT8-Zellen kommt. Diese

---

Stromazellen-vermittelte Protektion der Tumorzellen vor einem Zellzyklusarrest zeigten auch weitere Arbeiten (Macanas-Pirard *et al.* 2012; Scherzed *et al.* 2013). Andere Autoren wiederum zeigten, dass ein MSC- bzw. Stromazellen-vermittelter Zellzyklusarrest zu einer CTx-Resistenz führt (Mellor *et al.* 2005; Greco *et al.* 2011; Li *et al.* 2011). Eine CTx-Resistenz kann daher sowohl mit einer Förderung als auch Inhibition der Proliferation von Tumorzellen einhergehen bzw. durch diese bedingt sein.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Mischungsverhältnis der CRC-Zellen zu MSC bzw. CCD18 von 1:1 wird von weiteren Autoren als *in vitro* Modell der invasiven Front bzw. der Metastasierung verwendet, bei dem Tumorzellen auf eine breite Kontaktfläche von Stromazellen treffen (Mele *et al.* 2013). Bei CRC-Patienten stellen Mikrometastasen und Mikroresiduen eine diagnostische und therapeutische Herausforderung dar und sollen durch adjuvante Chemotherapie eradiziert werden. Da die in der vorliegenden Arbeit gezeigte, durch Stromazellen vermittelte 5-FU-Resistenz bei klinisch relevanten 5-FU-Konzentrationen (Yoshikawa *et al.* 2001) auftritt, wird angenommen, dass Stromazellen einen Beitrag zum Therapieversagen bei 5-FU-Behandlung von CRC-Patienten leisten. Die Unterbindung einer Stromazellen-vermittelten CTx-Resistenz könnte daher den Therapieerfolg neoadjuvanter und adjuvanter Chemotherapie steigern.

Die bisher bekannten Aspekte Stromazellen-vermittelter und insbesondere MSC-vermittelter CTx-Resistenz sollen daher im Folgenden vorgestellt und in Zusammenschau mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit diskutiert werden.

#### 5.4.2 Die Aktivierung von Stromazellen durch Tumorzellen und Tumortheraeutika

In der vorliegenden Arbeit wurden Unterschiede der vermittelten 5-FU-Resistenz zwischen direkter und indirekter Kokultur aufgezeigt. Dies weist darauf hin, dass Stromazellen durch den Zellkontakt mit Tumorzellen bzw. deren löslichen Faktoren in einen aktivierten Zustand gelangen können, in dem sie zytoprotektive Substanzen sezernieren. Aus der Literatur gibt es einige Anhalte für diese Hypothese. So zeigten Jacamo *et al.* (2014) eine Aktivierung der MSC durch Leukämiezellen-sezerniertes IL-1 über den Integrinrezeptor VCAM-1 der MSC. Die Aktivierung führte zu einer gesteigerten NF- $\kappa$ B-Aktivität der MSC, einhergehend mit erhöhter Sekretion von IL-6, welches als Mediator von CTx-Resistenz bekannt ist (McMillin *et al.* 2010). Die Blockade der NF- $\kappa$ B-Aktivierung der MSC führte zu einer CTx-Sensitivierung der Tumorzellen. Im *in vitro* Pankreaskarzinommodell von Mürköster *et al.* (2004) konnte eine Aktivierung von Stromazellen durch Tumorzellen-sezerniertes IL-1 $\beta$  gezeigt werden, jedoch ohne die Notwendigkeit des direkten Zellkontakts. Die aktivierten Stromazellen sezernierten NO, welches zu einer gesteigerten

---



IL-1 $\beta$ -Produktion sowie Vincristin-Resistenz der Tumorzellen führte. Die Autoren nahmen eine Aktivierung der Stromazellen über den NF- $\kappa$ B-Signalweg an. Im *in vitro* Prostatakarzinommodell von Borghese *et al.* (2013) konnte eine Aktivierung der MSC durch Tumorzellen-sezerniertes EGF gezeigt werden. Dabei bewirkte die basale Sekretion der MSC bereits eine CTx-Resistenz der Tumorzellen, wobei die Präinkubation der MSC in Tumorzellen-CM zur Verstärkung der vermittelten CTx-Resistenz führte.

Die Unterschiede zwischen der direkten und indirekten Kokultur könnten des Weiteren dadurch erklärt werden, dass eine Aktivierung der Stromazellen durch 5-FU erfolgt, da die konditionierten Medien von unbehandelten Stromazellen stammen. Für diese Hypothese finden sich ebenso Belege in der Literatur. So konnte z. B. von Sun *et al.* (2012) durch CTx eine Aktivierung des NF- $\kappa$ B- und  $\beta$ -Catenin-Signalweges von Stromazellen gezeigt werden. Daraufhin führte Stromazellen-sezerniertes WNT16B zu CTx-Resistenz, EMT und Proliferation der Tumorzellen. Der Zustand der Stromazellen wurde vom Autor als *DNA damage secretory program* bezeichnet und umschloss weitere Stromazellen-sezernierte Faktoren. Roodhart *et al.* (2011) zeigten des Weiteren, dass MSC *in vitro* bei Behandlung mit Platinverbindungen Fettsäuren (*platinum-induced fatty acids*, PIFA) sezernierten, welche bei Injektion in Xenograft-tragende Mäuse zur CTx-Resistenz von CRC-Zellen führten. PIFA schienen die CTx-Resistenz nicht direkt zu vermitteln, sondern über die Aktivierung weiterer Zellen und deren Mediatoren. Da PIFA innerhalb kurzer Zeit nach CTx-Behandlung sezerniert wurden, nahmen die Autoren an, dass diese Form der MSC-Aktivierung und Resistenzvermittlung unabhängig von einer Differenzierung der MSC in TAF stattfand. Aber auch für TAF konnte gezeigt werden, dass sie *in vitro* durch CTx in einen aktivierten Zustand gelangen. Über die Sekretion von IL-17A bewirkten sie wiederum eine Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges von CRC-Zellen, einhergehend mit einer CTx-Resistenz (Lotti *et al.* 2013).

Diese Arbeiten stellen Signalwege der Aktivierung von Stromazellen und insbesondere MSC heraus, welche therapeutisch inhibiert werden können. Neben Interleukinen steht der NF- $\kappa$ B-Signalweg der Tumorzellen als tumortherapeutisches Ziel schon länger im Fokus der Forschung. Klinische Studien fehlen bisher, werden aber in naher Zukunft erwartet (Ben-Neriah und Karin 2011). Die Relevanz des NF- $\kappa$ B-Signalweges der Stromazellen im Tumor und dessen Inhibition sollte daher zukünftig untersucht werden. Weiterhin sollten die Gemeinsamkeiten des sekretorischen Profils der MSC nach Aktivierung durch Tumorzellen und des sogenannten *DNA damage secretory program* genauer analysiert werden.

---

### 5.4.3 Die Mediatoren einer Therapeutikaresistenz und die beteiligten Signalwege

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand der indirekten Kokultur gezeigt, dass bereits basal sezernierte Faktoren von MSC und CCD18 zu einer 5-FU-Resistenz der HCT8-Zellen führen sowie den Zellzyklusarrests von HCT8-Zellen supprimieren bzw. verzögern. Die Identifizierung der an der Entstehung einer CTx-Resistenz beteiligten Mediatoren der Stromazellen und Signalkaskaden der Tumorzellen ist Gegenstand aktueller Arbeiten. So vermittelte MSC- und Stromazellen-sezerniertes SDF-1 über eine reduzierte Caspase-3- und eine erhöhte Bcl-XL-Aktivität der Tumorzellen eine CTx-Resistenz (Hartmann *et al.* 2005; Vianello *et al.* 2010). Weiterhin konnte anhand diverser CTx und Stromazellen eine IL-6-vermittelte CTx-Resistenz gezeigt werden, einhergehend mit einer erhöhten Expression von Akt, NF- $\kappa$ B und Ras in den Tumorzellen (McMillin *et al.* 2010). In weiteren Arbeiten zeigte sich ebenso die Bedeutung des NF- $\kappa$ B-Signalweges der Tumorzellen an der Entstehung einer CTx-Resistenz (Arlt *et al.* 2002; Lotti *et al.* 2013), z. B. bei der epigenetischen Herabregulierung der Caspasen von Tumorzellen (Sebens Mürköster *et al.* 2006; 2008). Bei Stromazellen-vermittelter CTx-Resistenz wurden weiterhin die Modulierung des Wnt- (Yang *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2013) und des STAT3-Signalwegs von Tumorzellen beschrieben (Bewry *et al.* 2008) sowie die Modulierung des mTOR-Signalwegs bei MSC-vermittelter Hypoxieresistenz (Frolova *et al.* 2012). Acharyya *et al.* (2012) konnten *in vivo* zeigen, dass endotheliale und myeloische Zellen über sezerniertes TNF- $\alpha$  und S100-Proteine eine CTx-Resistenz über die Aktivierung von ERK1/2- und p38 der Tumorzellen vermittelten. TNF- $\alpha$  und S100-Proteine wurden ebenso im CRC-Modell als relevant beschrieben (Ichikawa *et al.* 2011), sodass der Beitrag dieser Mediatoren bei der Entstehung einer CTx-Resistenz im CRC weitergehend untersucht werden sollte.

Stromazellen sezernieren ebenfalls Wachstumsfaktoren (GF), welche Einfluss auf die CTx-Resistenz von Tumorzellen nehmen. So führte Stromazellen-sezerniertes HGF bei verschiedenen Tumorzelllinien zu einer CTx-Resistenz gegenüber RAF-Inhibitoren (Straussman *et al.* 2012), wobei die Wirkung zum Teil über den Akt-Signalweg der Tumorzellen vermittelt wird (Wang *et al.* 2009). Bartling *et al.* (2008) vermuteten weiterhin, dass Stromazellen-sezerniertes bFGF eine CTx-Resistenz durch Modulierung der Caspasen vermittelt. Proteinkinase-Inhibitoren (PKI) stellen mögliche Therapeutika zur Inhibition der GF-Signalkaskaden dar. Bei Behandlung von Tumorzellen mit spezifischen PKI konnte jedoch durch die Zugabe diverser Wachstumsfaktoren die CTx-Resistenz wiederhergestellt werden (Wilson *et al.* 2012). Da Stromazellen verschiedene Wachstumsfaktoren sezernieren, wird vermutet, dass die Wirkung spezifischer PKI im Tumor durch die Aktivierung weiterer Signalkaskaden antagonisiert werden könnte. So ist bekannt, dass

---

HGF von MSC und CCD18 sezerniert wird (Göke *et al.* 1998; Neuss *et al.* 2004). Im Hinblick auf die Anwesenheit von MSC im CRC (Lin *et al.* 2013), der Korrelation von HGF mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko im CRC (Kammula *et al.* 2007) und der zukünftig zu erwartenden breiten Anwendung von PKI, u. a. bei CRC-Patienten, wird bereits von Straussman *et al.* (2012) auf die Problematik einer Stromazellen-vermittelten CTx-Resistenz *in situ* hingewiesen. Zukünftige Therapeutika sollten daher *downstream*-Signalproteine der Tumor-Stroma-Interaktionen adressieren, welche von mehreren CTx-Resistenz-Mediatoren moduliert werden und bei der Vermittlung einer CTx-Resistenz als essentiell angesehen werden. Studien mit weiteren Zellen des Tumorstromas (Monozyten, T-Zellen, Makrophagen) sowie Bestandteilen der EZM (Fibronectin, Lamin, Kollagen IV, Tenascin-C) sollten hierfür mit herangezogen werden (Sethi *et al.* 1999; Hazlehurst und Dalton 2001; Miyamoto *et al.* 2004; Shree *et al.* 2011; Tan *et al.* 2011; Nakasone *et al.* 2012). Neben der Vermittlung einer CTx-Resistenz wurde *in vitro* auch MSC- und TAF-vermittelte CTx-Sensitivierung von Tumorzellen beschrieben (Dittmer *et al.* 2011; Kucerova *et al.* 2013). Kucerova *et al.* (2013) fanden dabei eine erhöhte Caspase-Aktivität der Tumorzellen. Die beteiligten Mediatoren blieben jedoch unbekannt. *In vivo* konnten vergleichbare Effekte bisher nicht erhoben werden.

Es wird deutlich, dass Stromazellen über die Modulation von Apoptose, Proliferation und Differenzierung der Tumorzellen eine CTx-Resistenz dieser hervorrufen können. Die Trennung zwischen Stromazellen-vermittelter CTx-Resistenz und Apoptoseresistenz verläuft jedoch unscharf. Im Hinblick auf die in der vorliegenden Arbeit gezeigte 5-FU-Resistenz und die Zellzyklusveränderungen sollten zukünftig auch Zellzyklus-Regulatoren und beteiligte Mediatoren und Signalwege auf Seiten der Tumorzellen und der Stromazellen sowie die Unterschiede bei Verwendung weiterer CTx herausgearbeitet werden.

#### 5.4.4 Eine mögliche Therapeutikaresistenz durch eine antagonisierende Wirkung der Stromazellen

Einige Arbeiten konnten die Entstehung einer CTx-Resistenz über Antagonisierung der CTx-Wirkung durch Stromazellen zeigen. So vermittelten MSC durch die Bereitstellung von Asparagin eine Asparaginase-Resistenz bei ALL-Zellen (Iwamoto *et al.* 2007). Bei Behandlung mit dem Purinanalogen Forodesin konnten Stromazellen die Akkumulation toxischer Metabolite in CLL-Zellen reduzieren (Balakrishnan *et al.* 2010). Ebenso führten Stromazellen über die Modulierung von Influx- (Macanas-Pirard *et al.* 2012) und Efflux-Pumpen (Li *et al.* 2014) der Tumorzellen zu einer CTx-Resistenz. Diese Arbeiten lassen vermuten, dass Stromazellen die Wirkkonzentrationen diverser CTx in Tumorzellen

---

reduzieren können bzw. durch die Bereitstellung von Metaboliten die toxische Wirkung von CTx antagonisieren. Im Hinblick auf die Wirkungsweise von 5-FU könnte z. B. die Bereitstellung von Thymin durch Stromazellen vor zellulären und genetischen Schäden schützen (Longley *et al.* 2003). Zukünftig sollte daher die Modulierung von Influx/Efflux- und Detoxifikationsproteinen durch Stromazellen und insbesondere MSC intensiver untersucht werden sowie die 5-FU-Toxizität anhand der Messung von intrazellulären Nukleinbasen-Konzentrationen und der RNA- und DNA-Inkorporation quantifiziert werden. Die hier aufgeführten Arbeiten untermauern, dass Stromazellen eine über die generelle Apoptoseresistenz hinausgehende spezifische CTx-Resistenz vermitteln können.

### **5.5 Das Sphäroidmodell zur Untersuchung des Einflusses von Stromazellen auf das Wachstumsverhalten und die Zytostatikasensitivität von CRC-Zellen**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bereits die indirekte Kokultur von DLD1-Sphäroiden mit konditionierten Medien von MSC und CCD18 zu einer Größenzunahme der Sphäroide führte, welche unter 5-FU-Behandlung persistierte. Bei direkter Kokultur von DLD1-Zellen und MSC bzw. CCD18 im Sphäroidmodell zeigten sich ebenfalls größere Sphäroide, doch konnte diese Größenzunahme weder den DLD1-Zellen noch MSC bzw. CCD18 alleinig zugeordnet werden. Die Ergebnisse der indirekten Kokultur lassen jedoch vermuten, dass die Größenzunahme der Sphäroide bei der direkten Kokultur nicht allein durch den Volumenanteil von MSC oder CCD18 bedingt sind. Ob die Größenzunahme durch Veränderung der Tumorzell-Morphologie oder Zunahme der Tumorzellen-Proliferation erfolgt, kann anhand der verwendeten Methode nicht festgestellt werden. Unterstützt wird die Annahme einer Größenzunahme durch Tumorzellen-Proliferation jedoch durch die Ergebnisse von u. a. Sasser *et al.* (2007). Diese zeigten, dass abhängig von der Tumorzelllinie bereits ab einem Stromazellen-Anteil von 10 % im Sphäroid eine Wachstumsförderung der Tumorzellen vermittelt wurde sowie, dass Stromazellen-CM zu einem vergleichbaren Effekt führte. Klopp *et al.* (2010) zeigten weiterhin, dass Tumorzellen durch Kokultur mit Stromazellen und Stromazellen-CM eine höhere Anzahl von Sphäroiden sowie größere Sphäroide bilden.

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bildeten HCT8-Zellen in Monokultur sowie bei indirekter Kokultur mit CM<sub>MSC</sub> und CM<sub>CCD18</sub> keine Sphäroide, jedoch bei direkter Kokultur mit MSC und partiell auch mit CCD18. Daher wird ein Einfluss des direkten Zellkontakts von HCT8-Zellen mit MSC und CCD18 auf die Sphäroidformierung angenommen. Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigten, dass HCT8-Zellen aufgrund ihres dysfunktionalen E-Cadherin-Systems in Monokultur keine Sphäroide bilden. Durch

---

die Zugabe von u. a. MSC-sezerniertem EZM konnte dies jedoch überwunden werden. Weiterhin zeigte sich, dass für die Sphäroidformierung die Exprimierung des EZM-Rezeptors  $\beta$ 1-Integrin durch HCT8-Zellen notwendig ist (Widder *et al.* 2015). Unterstützt werden diese Ergebnisse durch weitere Arbeiten mit Tumorzellen-Stromazellen-Mischsphäroiden und dadurch, dass dem Kultivierungsmedium EZM-Bestandteile zur Sphäroidformierung von Tumorzellen zugeben werden (Tsai *et al.* 2011; Thoma *et al.* 2014).

Anhand der durchgeführten Untersuchungen lässt sich zur Sphäroidarchitektur bei direkter Kokultur festhalten, dass sich MSC und CCD18 hauptsächlich im Sphäroidzentrum befinden. Da bei ausreichender Sphäroidgröße im Sphäroidzentrum hypoxische Verhältnisse herrschen (Friedrich *et al.* 2007a; Thoma *et al.* 2014) und MSC im Sphäroid eine Kompaktierung zeigen (Bartosh *et al.* 2010), wird eine veränderte Interaktion von MSC und Tumorzellen im Sphäroidmodell angenommen, verglichen zur Kokultur im Monolayer. Diese Annahme wird durch einige Arbeiten unterstützt. So sezernieren MSC unter Hypoxie zytoprotektive Faktoren, u. a. bFGF und VEGF (Annabi *et al.* 2003; Ohnishi *et al.* 2007) und monokultivierte MSC-Sphäroide sezernierten vermehrt anti-apoptotische und pro-inflammatorische Faktoren (Bartosh *et al.* 2010). Des Weiteren konnte für Tumorzellen-Stromazellen-Mischsphäroide gezeigt werden, dass es zu einer verdichteten interzellulären Architektur mit verminderter Nährstoffdiffusion kommt, einhergehend mit einer verminderten Zellviabilität bei gleichzeitigem Anstieg des Anteils proliferierender Tumorzellen (Amann *et al.* 2014). Diese Ergebnisse zeigen somit einen Einfluss der Stromazellen auf maßgebliche Determinanten der CTx-Wirksamkeit *in vivo*: den Anteil proliferierender Zellen und physikalische Barrieren der CTx-Distribution (Tredan *et al.* 2007; Liao und Reisfeld 2011; Martinez-Outschoorn *et al.* 2011). Zur Stromazellen-vermittelten CTx-Resistenz liegen im Sphäroidmodell bisher jedoch wenige Untersuchungen vor. So konnten Bartling *et al.* (2008) eine Größenzunahme von Tumorzellen-Stromazellen-Sphäroiden gegenüber Tumorzellen-Sphäroiden zeigen, welche unter Paclitaxel-Behandlung persistierte, jedoch nicht unter Cisplatin-Behandlung.

Das Sphäroidmodell ist als Bindeglied zwischen den klassischen *in vitro* und *in vivo* Methoden anzusehen (Kunz-Schughart 1999). In Zusammenschau mit den unter 5.4 genannten Möglichkeiten einer Stromazellen-vermittelten CTx-Resistenz durch lösliche Faktoren und EZM, ist das Sphäroidmodell daher zur Untersuchung dieser komplexen Vorgänge geeignet.

---

## 5.6 Die Veränderung der Morphologie der CRC-Zellen als Zeichen einer möglichen epithelial-mesenchymalen Transition

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass bei direkter und indirekter Kokultur mit MSC und CCD18 die Morphologie von DLD1- und HCT8-Zellen polygonaler und spindelförmiger wurde. Diese morphologischen Veränderungen persistierten unter 5-FU-Behandlung. Eine Veränderung der Zellmorphologie zu spindelförmigen Zellen, die zunehmende interzelluläre Abgrenzbarkeit, der Verlust der Polarität und Pseudopodienbildung werden ebenso während der epithelial-mesenchymalen-Transition (EMT) beobachtet (Yang *et al.* 2006). *In vitro* ist dieser Prozess durch eine Veränderung der Proteinexpression der Tumorzellen gekennzeichnet und wird *in vivo* als essenzieller Prozess in der Embryonalentwicklung und der Gewebsregenerierung angesehen. Bei Tumorpatienten ist das Vorkommen von EMT-Markern im Tumor mit Metastasierung und einem geringeren Überleben assoziiert (Thiery *et al.* 2009; Bastid 2012). Die genaue Bedeutung der EMT und ihre Einordnung in der humanen Biologie sind Gegenstand aktueller Diskussionen (Ledford 2011; Bastid 2012; Ye und Weinberg 2015). Als Hauptinduktoren der EMT gelten IL-6 und TGF- $\beta$  (Sullivan *et al.* 2009; Thiery *et al.* 2009).

Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten morphologischen Veränderungen der Tumorzellen waren bereits durch konditionierte Medien von MSC und CCD18 induzierbar, wenn auch subtiler als bei direkter Kokultur. Für die Kokultur von CRC-Zellen mit CCD18 könnte dies dadurch bedingt sein, dass CCD18 Mediatoren einer EMT, wie bFGF, VEGF und IL-6, bereits basal sezernieren (Day 2005; Koshida *et al.* 2006; Gruchlik *et al.* 2012). Für MSC konnte *in vitro* gezeigt werden, dass membranständiges TGF- $\beta$  eine EMT von CRC-Zellen induziert, jedoch nicht CM<sub>MSC</sub> (Mele *et al.* 2013). Andererseits konnte CM primärer TAF eine EMT von DLD1-Zellen hervorrufen (Berdiel-Acer *et al.* 2011). Weiterhin führte TAF-sezerniertes CCL2 und FGF19 zu einer EMT (Liu *et al.* 2013). Im Mammakarzinom-Modell konnte bei Verwendung von Tumorzellen-CM zur Generierung von CM<sub>MSC</sub> gezeigt werden, dass dieses CM<sub>MSC</sub> eine EMT der Tumorzellen induziert. Somit fand wiederum eine Aktivierung der MSC mit Veränderung ihres sekretorischen Profils statt (Vgl. 5.4.2) (Martin *et al.* 2010; Kucerova *et al.* 2013). In der Arbeit von Kucerova *et al.* (2013) war diese EMT durch Behandlung der Tumorzellen mit einem PKI inhibierbar. Auch im Sphäroidmodell konnte durch Kokultur mit Stromazellen ein Anstieg der EMT-Parameter gezeigt werden (Klopp *et al.* 2010; Amann *et al.* 2014). Aus der Literatur geht daher hervor, dass ein direkter Zellkontakt von Tumorzellen und MSC nicht obligat für die EMT-Induktion notwendig ist, sondern bereits die gegenseitige Aktivierung über lösliche Faktoren ausreicht.

---

Aufgrund des gemeinsamen Auftretens von morphologischen Veränderungen und CTx-Resistenz von CRC-Zellen bei direkter Kokultur mit Stromazellen in der vorliegenden Arbeit wird vermutet, dass sich beide Effekte gegenseitig bedingen. Hierzu gibt es ebenfalls Belege aus der Literatur. So zeigen Zellen, die eine EMT unterlaufen, auch eine Resistenz gegenüber Apoptose und CTx (Singh und Settleman 2010; Miow *et al.* 2015). Begründet wird dies mit dem zur Migration nötigen Austritt aus der Proliferationsphase und der damit einhergehenden verringerten Zytotoxizität verschiedener im Zellzyklus interferierender CTx (Singh und Settleman 2010; Wang *et al.* 2010; Correia und Bissell 2012). Im Zusammenhang mit der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Vermittlung einer 5-FU-Resistenz und den morphologischen Veränderungen der CRC-Zellen sollte daher zukünftig untersucht werden, ob MSC und CCD18 sowohl eine CTx-Resistenz als auch eine EMT über dieselben Signalwege vermitteln. Dabei sollte berücksichtigt werden, inwieweit dies wiederum Teil des *DNA damage secretory program* sein könnte.

Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene Aufbrechen der Koloniestrukturen von HCT8- und DLD1-Zellen kann weiterhin als Zeichen erhöhter Zellmotilität der CRC-Zellen gewertet werden. Eine erhöhte Zellmotilität ist neben der Änderung der Zellmorphologie ebenfalls ein Zeichen der EMT und ließ sich in verschiedenen Arbeiten zur EMT finden. So konnte eine verkürzte Wundschlusszeit (Kucerova *et al.* 2013) und eine erhöhte Invasivität (Berdiel-Acer *et al.* 2011) von CRC-Zellen als Zeichen erhöhter Zellmotilität im Rahmen einer EMT gezeigt werden. In weitere Arbeiten wurde ebenfalls eine erhöhte Zellmotilität von CRC-Zellen in Gegenwart von MSC und CM<sub>MSC</sub> (Shinagawa *et al.* 2010) bzw. durch MSC-sezerniertes NRG-1 (De Boeck *et al.* 2013) beobachtet. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass es sich bei den in der vorliegenden Arbeit gezeigten morphologischen Veränderungen der CRC-Zellen um eine EMT handeln könnte.

Weiterhin kann die gezeigte septenartige Anordnung der MSC um die CRC-Zellkolonien gegenüber dem Mischbild der CRC-Kokulturen mit CCD18 als gerichtete Motilität der MSC bzw. als erhöhte Motilität der CCD18 betrachtet werden. Es ist bekannt, dass MSC über Tumorzellen-sezernierte Faktoren in das Tumorstroma rekrutiert werden (Barcellos-de-Souza *et al.* 2013). So konnte eine Steigerung der MSC-Migration z. B. durch Tumorzellen-sezerniertes CCL5 gezeigt werden (Borghese *et al.* 2013), welches wiederum MSC-sezerniert *in vivo* pro-metastatisch wirkte (Karnoub *et al.* 2007). Menon *et al.* (2007) zeigten *in vitro*, dass MSC als Reaktion auf Rekrutierungssignale der Tumorzellen über autokrine SDF-1-Produktion zur Migration aktiviert werden. Da Stromazellen-sezerniertes SDF-1 ebenso eine Wachstumsförderung und CTx-Resistenz der Tumorzellen vermittelt (Vianello *et al.* 2010), besteht die Möglichkeit, die MSC-Rekrutierung und die Vermittlung von CTx-

---

Resistenz durch therapeutische Manipulation dieser Signalachse zu unterbinden. Da neben Zytokinen auch Wachstumsfaktoren an der MSC-Rekrutierung (Barcellos-de-Souza *et al.* 2013) sowie an der Vermittlung von EMT, Tumorprogression und CTx-Resistenz beteiligt sind (Vgl. 5.4.3), besteht auch für diese Signalachsen die Möglichkeit zur therapeutischen Manipulation. Klinische Studien zum therapeutischen Beitrag u. a. von Inhibitoren der SDF-1-Signalachse in soliden Tumoren und der VLA-4- und *hedgehog*-Signalachse, welche ebenfalls bei EMT beteiligt sind, werden in naher Zukunft erwartet (Duda *et al.* 2011; Daenen *et al.* 2013).

Zusammenfassend konnten mehrere morphologische Aspekte der EMT bei den CRC-Zellen in den direkten und indirekten Kokulturen der vorliegenden Arbeit nachvollzogen werden. Die entsprechende Änderung in der Expression von EMT-Markern der CRC-Zellen sollte daher im Weiteren untersucht werden.

### 5.7 Stärken und Schwächen der Arbeit

Durch die Verwendung von MSC und humanen Kolonfibroblasten war der Vergleich des Einflusses dieser Stromazellen auf CRC-Zellen möglich und konnte den spezifischen Charakter der MSC-vermittelten 5-FU-Resistenz herausstellen. Die Verwendung von zwei CRC-Zelllinien ermöglichte ebenfalls das Aufzeigen einer Zelllinien-abhängigen Stromazellen-vermittelten 5-FU-Resistenz. Zur Untersuchung der Allgemeingültigkeit der MSC-vermittelten CTx-Resistenz im CRC-Modell sollte mittels Kokultur mit weiteren CRC-Zelllinien und unter Verwendung weiterer CTx nachgegangen werden.

Die Zellzyklusanalyse von Tumorzellen nach direkter Kokultur stellte eine praktikable Untersuchungsmethode dar. Sie eignet sich zur Analyse und Quantifizierung von Teilaspekten der Resistenzentstehung der Tumorzellen und zum Aufzeigen von Zellzyklus-modulierenden Mechanismen. Zur darüber hinausgehenden Untersuchung von Zellzyklus-Modulatoren und molekularen Mechanismen bieten sich Western-Blotting und real-time-PCRs an. Diese Methoden eignen sich ebenfalls zur Untersuchung der Unterschiede der Zytostatikasensitivität von MSC und CCD18 an.

Mit der Verwendung von Stromazellen-konditionierten Medien war es möglich, den Teilaspekt von basal sezernierten löslichen Faktoren für die Resistenzvermittlung aufzuzeigen. Limitationen liegen hier insbesondere in der ungenügenden Berücksichtigung der gegenseitigen Modulierung von Tumor- und Stromazellen. Die Detektion und Quantifizierung beteiligter Mediatoren sowie die Untersuchung ihrer Dynamik bei direkter Kokultur könnten therapeutische Angriffspunkte aufzeigen.

---



Anhand des Sphäroidmodells war es möglich, die Interaktion von Tumor- und Stromazellen in ein dreidimensionales *in vitro* Modell zu transferieren. Dies ist jedoch nicht mit allen CRC-Zelllinien *per se* möglich. Zur Analyse der beteiligten Mechanismen im Sphäroid bieten sich wiederum weiterführende Methoden an, u. a. histologische Untersuchungen.

In der vorliegenden Arbeit handelt es sich daher um eine deskriptive Untersuchung des Einflusses von MSC und humanen Kolonfibroblasten auf die 5-FU-Sensitivität von CRC-Zellen. Daran anschließen sollten sich die Identifikation vermittelnder Mediatoren einer CTx-Resistenz, die Manipulation der beteiligten Signalkaskaden sowie die Übertragung in ein orthotopes Tiermodell. Über das CRC hinausgehend sollte der Stellenwert von MSC und weiteren Stromazellen an der CTx-Resistenzvermittlung in Modellen weiterer Tumor-entitäten untersucht werden. Um letztlich die Relevanz der MSC in der Tumorbilogie *in situ* aufzuzeigen, wird die Inhibition der MSC-vermittelten Effekte am Patienten notwendig sein.

---

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Über die letzten Jahre haben die Erkenntnisse über die Biologie der MSC immens zugenommen. Zu Beginn der vorliegenden Dissertation lagen Arbeiten zum Einfluss der MSC auf die Resistenzentstehung bei hämatologischen Malignomen vor. Die Bedeutung für solide Tumore und das CRC im Speziellen war jedoch unklar.

In der vorliegenden Arbeit konnte für die CRC-Zelllinie DLD1 eine Zunahme der Proliferation bei direkter Kokultur mit MSC und Kolonfibroblasten gezeigt werden, die unter 5-FU-Behandlung persistierte, jedoch ohne Erhöhung der  $IC_{50}$ . Im Vergleich dazu zeigte die CRC-Zelllinie HCT8 bei direkter und indirekter Kokultur mit MSC und Kolonfibroblasten eine 5-FU-Resistenz. Dies zeigte sich anhand einer gesteigerten Proliferation der HCT8-Zellen mit einer Erhöhung der  $IC_{50}$ . Dabei wurde der 5-FU-bedingte Zellzyklusarrest der HCT8-Zellen supprimiert bzw. verzögert, sowohl bei direkter Kokultur mit Kolonfibroblasten, als auch bei indirekter Kokultur mit MSC und Kolonfibroblasten. In der Zellzyklusanalyse der direkten Kokultur von HCT8-Zellen mit MSC zeigte sich jedoch keine Veränderung der Zellzyklusverteilung. Daher wird angenommen, dass MSC bei direkter Kokultur mit CRC-Zellen in einen alterierten Zustand gelangen und ihr Einfluss auf CRC-Zellen daher über die basale Sekretion löslicher Faktoren hinausgeht.

Des Weiteren konnten für DLD1-Zellen Kokulturen im dreidimensionalen Sphäroidmodell etabliert werden. Bei direkter und indirekter Kokultur mit MSC und Kolonfibroblasten zeigte sich eine Zunahme der Gesamtsphäroidgröße, welche unter 5-FU-Behandlung persistierte. Diese Größenzunahme wird daher den DLD1-Zellen zugeschrieben und zum Teil über lösliche Faktoren der Stromazellen angenommen.

Darüber hinaus konnten morphologische Veränderungen der verwendeten CRC-Zelllinien bei direkter und indirekter zweidimensionaler Kokultur mit MSC und Kolonfibroblasten beschrieben werden, welche ebenfalls bei der epithelial-mesenchymalen Transition beschrieben wurden.

Schließlich wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass MSC gegenüber Tumorzelllinien eine breite Zytostatikaresistenz in therapeutisch relevanten Konzentrationen aufweisen. Für die Zytostatika 5-FU, Cisplatin und Oxaliplatin war des Weiteren eine erhöhte Resistenz von MSC gegenüber humanen Kolonfibroblasten festzustellen.

Zusammenfassend vermitteln MSC einen Tumorzellen-spezifischen und eine differentielle 5-FU-Resistenz verglichen mit Kolonfibroblasten. Die Identifikation der zugrundeliegenden Mechanismen könnte therapeutische Zielstrukturen aufzeigen und über neue Therapeutika zur Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber Tumorthérapeutika beitragen.

---

**LITERATURVERZEICHNIS**

- Acharyya S, Oskarsson T, Vanharanta S, Malladi S, Kim J, Morris PG, Manova-Todorova K, Leversha M, Hogg N, Seshan VE, Norton L, Brogi E, Massague J (2012) A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell*, 150(1):165-178.
- Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J (2012) Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*, 27(9):1423-1431.
- Amann A, Zwierzina M, Gamerith G, Bitsche M, Huber JM, Vogel GF, Blumer M, Koeck S, Pechriggl EJ, Kelm JM, Hilbe W, Zwierzina H (2014) Development of an Innovative 3D Cell Culture System to Study Tumour - Stroma Interactions in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *PLoS One*, 9(3):e92511.
- Andersen NN, Jess T (2013) Has the risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease decreased? *World J Gastroenterol*, 19(43):7561-7568.
- Andrews PW, Bronson DL, Benham F, Strickland S, Knowles BB (1980) A comparative study of eight cell lines derived from human testicular teratocarcinoma. *International Journal of Cancer*, 26(3):269-280.
- Annabi B, Lee YT, Turcotte S, Naud E, Desrosiers RR, Champagne M, Eliopoulos N, Galipeau J, Beliveau R (2003) Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. *Stem Cells*, 21(3):337-347.
- Arends MJ (2013) Pathways of colorectal carcinogenesis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 21(2):97-102.
- Arlt A, Vorndamm J, Muerkoster S, Yu H, Schmidt WE, Folsch UR, Schafer H (2002) Autocrine production of interleukin 1beta confers constitutive nuclear factor kappaB activity and chemoresistance in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Res*, 62(3):910-916.
- Balakrishnan K, Burger JA, Quiroga MP, Henneberg M, Ayres ML, Wierda WG, Gandhi V (2010) Influence of bone marrow stromal microenvironment on forodesine-induced responses in CLL primary cells. *Blood*, 116(7):1083-1091.
- Barcellos-de-Souza P, Gori V, Bambi F, Chiarugi P (2013) Tumor microenvironment: bone marrow-mesenchymal stem cells as key players. *Biochim Biophys Acta*, 1836(2):321-335.
- Bartling B, Hofmann HS, Silber RE, Simm A (2008) Differential impact of fibroblasts on the efficient cell death of lung cancer cells induced by paclitaxel and cisplatin. *Cancer Biol Ther*, 7(8):1250-1261.
- Bartosh TJ, Ylostalo JH, Mohammadipoor A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, Lee RH, Choi H, Prockop DJ (2010) Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(31):13724-13729.
- Bastid J (2012) EMT in carcinoma progression and dissemination: facts, unanswered questions, and clinical considerations. *Cancer Metastasis Rev*, 31(1-2):277-283.
- Ben-Neriah Y, Karin M (2011) Inflammation meets cancer, with NF-[kappa] B as the matchmaker. *Nat Immunol*, 12(8):715-723.
- Berdiel-Acer M, Bohem ME, Lopez-Doriga A, Vidal A, Salazar R, Martinez-Iniesta M, Santos C, Sanjuan X, Villanueva A, Mollevi DG (2011) Hepatic Carcinoma-Associated Fibroblasts Promote an Adaptive Response in Colorectal Cancer Cells That Inhibit Proliferation and Apoptosis: Nonresistant Cells Die by Nonapoptotic Cell Death. *Neoplasia*, 13(10):931-946.
-

- Bewry NN, Nair RR, Emmons MF, Boulware D, Pinilla-Ibarz J, Hazlehurst LA (2008) Stat3 contributes to resistance toward BCR-ABL inhibitors in a bone marrow microenvironment model of drug resistance. *Mol Cancer Ther*, 7(10):3169-3175.
- Bian ZY, Li G, Gan YK, Hao YQ, Xu WT, Tang TT (2009) Increased number of mesenchymal stem cell-like cells in peripheral blood of patients with bone sarcomas. *Arch Med Res*, 40(3):163-168.
- Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H (2004) Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*, 22(4):625-634.
- Borghese C, Cattaruzza L, Pivetta E, Normanno N, De Luca A, Mazzucato M, Celegato M, Colombatti A, Aldinucci D (2013) Gefitinib inhibits the cross-talk between mesenchymal stem cells and prostate cancer cells leading to tumor cell proliferation and inhibition of docetaxel activity. *J Cell Biochem*, 114(5):1135-1144.
- Bornstein R, Macias MI, de la Torre P, Grande J, Flores AI (2012) Human decidua-derived mesenchymal stromal cells differentiate into hepatic-like cells and form functional three-dimensional structures. *Cytotherapy*, 14(10):1182-1192.
- Böyum A (1967) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear 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.
- Braybrooke JP, Levitt NC, Joel S, Davis T, Madhusudan S, Turley H, Wilner S, Harris AL, Talbot DC (2003) Pharmacokinetic study of cisplatin and infusional etoposide phosphate in advanced breast cancer with correlation of response to topoisomerase IIalpha expression. *Clin Cancer Res*, 9(13):4682-4688.
- Caplan AI (1991) Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9(5):641-650.
- Caplan AI, Correa D (2011) The MSC: An Injury Drugstore. *Cell Stem Cell*, 9(1):11-15.
- Chu E (2007) Clinical Colorectal Cancer: "Ode to 5-Fluorouracil". *Clin Colorectal Cancer*, 6(9):609.
- Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ (2001) Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(14):7841-7845.
- Correia AL, Bissell MJ (2012) The tumor microenvironment is a dominant force in multidrug resistance. *Drug Resist Updat*, 15(1-2):39-49.
- Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Jacobino JP, Lazzari L, Huard J, Peault B (2008) A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, 3(3):301-313.
- Daenen LG, Houthuijzen JM, Cirkel GA, Roodhart JM, Shaked Y, Voest EE (2013) Treatment-induced host-mediated mechanisms reducing the efficacy of antitumor therapies. *Oncogene*,
- Dave SD, Vanikar AV, Trivedi HL (2012) Ex vivo generation of glucose sensitive insulin secreting mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Indian J Endocrinol Metab*, 16 Suppl 1:S65-69.
- Day RM (2005) Bioactive glass stimulates the secretion of angiogenic growth factors and angiogenesis in vitro. *Tissue Eng*, 11(5-6):768-777.
- De Boeck A, Pauwels P, Hensen K, Rummens JL, Westbroek W, Hendrix A, Maynard D, Denys H, Lambein K, Braems G, Gespach C, Bracke M, De Wever O (2013) Bone marrow-
-

derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through paracrine neuregulin 1/HER3 signalling. *Gut*, 62(4):550-560.

Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ (1999) Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol*, 107(2):275-281.

DiMarino AM, Caplan AI, Bonfield TL (2013) Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. *Frontiers in Immunology*, 4

Dittmer A, Fuchs A, Oerlecke I, Leyh B, Kaiser S, Martens JW, Luetzkendorf J, Mueller L, Dittmer J (2011) Mesenchymal stem cells and carcinoma-associated fibroblasts sensitize breast cancer cells in 3D cultures to kinase inhibitors. *Int J Oncol*, 39(3):689-696.

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(4):315-317.

Duda DG, Kozin SV, Kirkpatrick ND, Xu L, Fukumura D, Jain RK (2011) CXCL12 (SDF1alpha)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies? *Clin Cancer Res*, 17(8):2074-2080.

Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z (2010) Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell*, 18(6):884-901.

English K (2013) Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol*, 91(1):19-26.

Fayad W, Brnjic S, Berglind D, Blixt S, Shoshan MC, Berndtsson M, Olofsson MH, Linder S (2009) Restriction of cisplatin induction of acute apoptosis to a subpopulation of cells in a three-dimensional carcinoma culture model. *Int J Cancer*, 125(10):2450-2455.

Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5):759-767.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5):E359-E386.

Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA, Middleton J (2007) Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol*, 137(6):491-502.

Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV (1966) Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*, 16(3):381-390.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 3(4):393-403.

Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart LA (2007a) Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge? *Int J Radiat Biol*, 83(11-12):849-871.

Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA (2009) Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc*, 4(3):309-324.

Friedrich J, Eder W, Castaneda J, Doss M, Huber E, Ebner R, Kunz-Schughart LA (2007b) A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the acid phosphatase assay. *J Biomol Screen*, 12(7):925-937.

Frolova O, Samudio I, Benito JM, Jacamo R, Kornblau SM, Markovic A, Schober W, Lu H, Qiu YH, Buglio D, McQueen T, Pierce S, Shpall E, Konoplev S, Thomas D, Kantarjian H, Lock R,

- Andreeff M, Konopleva M (2012) Regulation of HIF-1 $\alpha$  signaling and chemoresistance in acute lymphocytic leukemia under hypoxic conditions of the bone marrow microenvironment. *Cancer Biol Ther*, 13(10):858-870.
- Gaedcke J, Liersch T, Hess C, Becker H, Rodel C, Ghadimi BM (2011) [Rectal cancer: current status of multimodal therapy--when and how?]. *Zentralbl Chir*, 136(4):334-342.
- Gamelin E, Bouil AL, Boisdron-Celle M, Turcant A, Delva R, Cailleux A, Krikorian A, Brienza S, Cvitkovic E, Robert J, Larra F, Allain P (1997) Cumulative pharmacokinetic study of oxaliplatin, administered every three weeks, combined with 5-fluorouracil in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res*, 3(6):891-899.
- Göke M, Kanai M, Podolsky DK (1998) Intestinal fibroblasts regulate intestinal epithelial cell proliferation via hepatocyte growth factor. *Am J Physiol*, 274(5 Pt 1):G809-818.
- Greco SJ, Patel SA, Bryan M, Pliner LF, Banerjee D, Rameshwar P (2011) AMD3100-mediated production of interleukin-1 from mesenchymal stem cells is key to chemosensitivity of breast cancer cells. *Am J Cancer Res*, 1(6):701-715.
- Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ (2003) Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*, 116(Pt 9):1827-1835.
- Gruchlik A, Wilczok A, Chodurek E, Polechonski W, Wolny D, Dzierzewicz Z (2012) Effects of 300 mT static magnetic field on IL-6 secretion in normal human colon myofibroblasts. *Acta Pol Pharm*, 69(6):1320-1324.
- Hanada K, Nishijima K, Ogata H, Atagi S, Kawahara M (2001) Population pharmacokinetic analysis of cisplatin and its metabolites in cancer patients: possible misinterpretation of covariates for pharmacokinetic parameters calculated from the concentrations of unchanged cisplatin, ultrafiltered platinum and total platinum. *Jpn J Clin Oncol*, 31(5):179-184.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646-674.
- Hanahan D, Coussens LM (2012) Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3):309-322.
- Hartmann TN, Burger JA, Glodek A, Fujii N, Burger M (2005) CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. *Oncogene*, 24(27):4462-4471.
- Hazlehurst LA, Dalton WS (2001) Mechanisms associated with cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) in hematopoietic malignancies. *Cancer Metastasis Rev*, 20(1-2):43-50.
- Henry LR, Lee HO, Lee JS, Klein-Szanto A, Watts P, Ross EA, Chen WT, Cheng JD (2007) Clinical implications of fibroblast activation protein in patients with colon cancer. *Clin Cancer Res*, 13(6):1736-1741.
- Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA (2010) Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol*, 148(1):3-15.
- Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG (2013) Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*, 13(10):714-726.
- Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A, International Society for Cellular T (2005) Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7(5):393-395.
-

- Houthuijzen JM, Daenen LG, Roodhart JM, Voest EE (2012) The role of mesenchymal stem cells in anti-cancer drug resistance and tumour progression. *Br J Cancer*, 106(12):1901-1906.
- Ichikawa M, Williams R, Wang L, Vogl T, Srikrishna G (2011) S100A8/A9 activate key genes and pathways in colon tumor progression. *Mol Cancer Res*, 9(2):133-148.
- Iwamoto S, Mihara K, Downing JR, Pui C-H, Campana D (2007) Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *J Clin Invest*, 117(4):1049-1057.
- Jacamo R, Chen Y, Wang Z, Ma W, Zhang M, Spaeth EL, Wang Y, Battula VL, Mak PY, Ruvolo P, Schober WD, Shpall EJ, Nguyen MH, Bueso-Ramos CE, Konoplev S, Davis RE, Konopleva M, Andreeff M (2014) Reciprocal leukemia-stroma VCAM-1/VLA-4-dependent activation of NF-kappaB mediates chemoresistance. *Blood*,
- Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS (2010) Potential therapeutic applications of muscle-derived mesenchymal stem and progenitor cells. *Expert Opin Biol Ther*, 10(4):505-517.
- Johann PD, Müller I (2015) Multipotent Mesenchymal Stromal Cells: Possible Culprits in Solid Tumors? *Stem Cells International*, 2015
- Kammula US, Kuntz EJ, Francone TD, Zeng Z, Shia J, Landmann RG, Paty PB, Weiser MR (2007) Molecular co-expression of the c-Met oncogene and hepatocyte growth factor in primary colon cancer predicts tumor stage and clinical outcome. *Cancer Lett*, 248(2):219-228.
- 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(7162):557-563.
- Katsuda T, Kosaka N, Takeshita F, Ochiya T (2013) The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Proteomics*, 13(10-11):1637-1653.
- 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. *J Exp Med*, 203(5):1235-1247.
- Khan N, Afaq F, Mukhtar H (2010) Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies. *Cancer Lett*, 293(2):133-143.
- Kidd S, Spaeth E, Klopp A, Andreeff M, Hall B, Marini FC (2008) The (in) auspicious role of mesenchymal stromal cells in cancer: be it friend or foe. *Cytotherapy*, 10(7):657-667.
- Kidd S, Spaeth E, Watson K, Burks J, Lu H, Klopp A, Andreeff M, Marini FC (2012) Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma. *PLoS One*, 7(2):e30563.
- Kim DS, Lee MW, Yoo KH, Lee TH, Kim HJ, Jang IK, Chun YH, Kim HJ, Park SJ, Lee SH, Son MH, Jung HL, Sung KW, Koo HH (2014) Gene expression profiles of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are modified by cell culture density. *PLoS One*, 9(1):e83363.
- Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F, 3rd (2011) Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells*, 29(1):11-19.
- Klopp AH, Lacerda L, Gupta A, Debeb BG, Solley T, Li L, Spaeth E, Xu W, Zhang X, Lewis MT, Reuben JM, Krishnamurthy S, Ferrari M, Gaspar R, Buchholz TA, Cristofanilli M, Marini F, Andreeff M, Woodward WA (2010) Mesenchymal stem cells promote mammosphere
-

- formation and decrease E-cadherin in normal and malignant breast cells. *PLoS One*, 5(8):e12180.
- Koh SH, Kim KS, Choi MR, Jung KH, Park KS, Chai YG, Roh W, Hwang SJ, Ko HJ, Huh YM, Kim HT, Kim SH (2008) Implantation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a neuroprotective therapy for ischemic stroke in rats. *Brain Res*, 1229:233-248.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(19):10711-10716.
- Koshida Y, Kuranami M, Watanabe M (2006) Interaction between stromal fibroblasts and colorectal cancer cells in the expression of vascular endothelial growth factor. *J Surg Res*, 134(2):270-277.
- Kucerova L, Poturnajova M, Tyciakova S, Matuskova M (2012) Increased proliferation and chemosensitivity of human mesenchymal stromal cells expressing fusion yeast cytosine deaminase. *Stem Cell Res*, 8(2):247-258.
- Kucerova L, Skolekova S, Matuskova M, Bohac M, Kozovska Z (2013) Altered features and increased chemosensitivity of human breast cancer cells mediated by adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Cancer*, 13(1):535.
- Kucerova L, Matuskova M, Pastorakova A, Tyciakova S, Jakubikova J, Bohovic R, Altanerova V, Altaner C (2008) Cytosine deaminase expressing human mesenchymal stem cells mediated tumour regression in melanoma bearing mice. *J Gene Med*, 10(10):1071-1082.
- Kunz-Schughart L (1999) Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and in vivo tumor. *Cell Biol Int*, 23(3):157-161.
- Lavoie JR, Rosu-Myles M (2013) Uncovering the secretes of mesenchymal stem cells. *Biochimie*, 95(12):2212-2221.
- Lazennec G, Jorgensen C (2008) Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem Cells*, 26(6):1387-1394.
- Ledford H (2011) Cancer theory faces doubts. *Nature*, 472(7343):273.
- Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH (2004) Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 103(5):1669-1675.
- Li HJ, Reinhardt F, Herschman HR, Weinberg RA (2012) Cancer-stimulated mesenchymal stem cells create a carcinoma stem cell niche via prostaglandin E2 signaling. *Cancer Discov*, 2(9):840-855.
- Li J, Law HK, Lau YL, Chan GC (2004) Differential damage and recovery of human mesenchymal stem cells after exposure to chemotherapeutic agents. *Br J Haematol*, 127(3):326-334.
- Li L, Tian H, Yue WM, Zhu F, Li SH, Li WJ (2011) Human Mesenchymal Stem Cells Play a Dual Role on Tumor Cell Growth In Vitro and In Vivo. *J Cell Physio*, 226(7):1860-1867.
- Li X, Miao H, Zhang Y, Li W, Li Z, Zhou Y, Zhao L, Guo Q (2014) Bone marrow microenvironment confers imatinib resistance to chronic myelogenous leukemia and oroxylin A reverses the resistance by suppressing Stat3 pathway. *Arch Toxicol*,
- Liang W, Xia H, Li J, Zhao RC (2011) Human adipose tissue derived mesenchymal stem cells are resistant to several chemotherapeutic agents. *Cytotechnology*, 63(5):523-530.
- Liao D, Reisfeld RA: Targeting Tumor Associated Fibroblasts and Chemotherapy. In: Mueller MM, Fusenig NE (eds): *Tumor-Associated Fibroblasts and their Matrix*. 4. Auflage, Springer, Dordrecht Heidelberg London New York, 2011, pp. 403-418.
-



- Lin JT, Wang JY, Chen MK, Chen HC, Chang TH, Su BW, Chang PJ (2013) Colon cancer mesenchymal stem cells modulate the tumorigenicity of colon cancer through interleukin 6. *Exp Cell Res*, 319(14):2216-2229.
- Liu R, Li J, Xie K, Zhang T, Lei Y, Chen Y, Zhang L, Huang K, Wang K, Wu H, Wu M, Nice EC, Huang C, Wei Y (2013) FGFR4 promotes stroma-induced epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Cancer Res*, 73(19):5926-5935.
- Liu Y, Bodmer WF (2006) Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(4):976-981.
- Longley DB, Johnston PG (2005) Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*, 205(2):275-292.
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG (2003) 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, 3(5):330-338.
- Lotti F, Jarrar AM, Pai RK, Hitomi M, Lathia J, Mace A, Gantt GA, Jr., Sukhdeo K, Devecchio J, Vasanji A, Leahy P, Hjelmeland AB, Kalady MF, Rich JN (2013) Chemotherapy activates cancer-associated fibroblasts to maintain colorectal cancer-initiating cells by IL-17A. *J Exp Med*, 210(13):2851-2872.
- Luetzkendorf J, Mueller LP, Mueller T, Caysa H, Nerger K, Schmoll HJ (2010) Growth inhibition of colorectal carcinoma by lentiviral TRAIL-transgenic human mesenchymal stem cells requires their substantial intratumoral presence. *J Cell Mol Med*, 14(9):2292-2304.
- Macanas-Pirard P, Leisewitz A, Broekhuizen R, Cautivo K, Barriga FM, Leisewitz F, Gidi V, Riquelme E, Montecinos VP, Swett P, Besa P, Ramirez P, Ocqueteau M, Kalergis AM, Holt M, Rettig M, DiPersio JF, Nervi B (2012) Bone marrow stromal cells modulate mouse ENT1 activity and protect leukemia cells from cytarabine induced apoptosis. *PLoS One*, 7(5):e37203.
- Malumbres M, Barbacid M (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*, 9(3):153-166.
- 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 Res Treat*, 124(2):317-326.
- Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Ko YH, Goldberg AF, Flomenberg N, Wang C, Pavlides S, Pestell RG, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP (2011) Understanding the metabolic basis of drug resistance: therapeutic induction of the Warburg effect kills cancer cells. *Cell Cycle*, 10(15):2521-2528.
- McMillin DW, Negri JM, Mitsiades CS (2013) The role of tumour-stromal interactions in modifying drug response: challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 12(3):217-228.
- McMillin DW, Delmore J, Weisberg E, Negri JM, Geer DC, Klippel S, Mitsiades N, Schlossman RL, Munshi NC, Kung AL, Griffin JD, Richardson PG, Anderson KC, Mitsiades CS (2010) Tumor cell-specific bioluminescence platform to identify stroma-induced changes to anticancer drug activity. *Nat Med*, 16(4):483-489.
- Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS (2009) Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer*, 9(9):665-674.
- 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
-

- (2013) Mesenchymal stromal cells induce epithelial-to-mesenchymal transition in human colorectal cancer cells through the expression of surface-bound TGF-beta. *Int J Cancer*, Mellor HR, Ferguson DJ, Callaghan R (2005) A model of quiescent tumour microregions for evaluating multicellular resistance to chemotherapeutic drugs. *Br J Cancer*, 93(3):302-309.
- Menon LG, Picinich S, Koneru R, Gao H, Lin SY, Koneru M, Mayer-Kuckuk P, Glod J, Banerjee D (2007) Differential gene expression associated with migration of mesenchymal stem cells to conditioned medium from tumor cells or bone marrow cells. *Stem Cells*, 25(2):520-528.
- Miow Q, Tan T, Ye J, Lau J, Yokomizo T, Thiery J, Mori S (2015) Epithelial-mesenchymal status renders differential responses to cisplatin in ovarian cancer. *Oncogene*, 34(15):1899-1907.
- 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 Res*, 68(11):4331-4339.
- Miyamoto H, Murakami T, Tsuchida K, Sugino H, Miyake H, Tashiro S (2004) Tumor-stroma interaction of human pancreatic cancer: acquired resistance to anticancer drugs and proliferation regulation is dependent on extracellular matrix proteins. *Pancreas*, 28(1):38-44.
- Muehlberg FL, Song Y-H, Krohn A, Pinilla SP, Droll LH, Leng X, Seidensticker M, Ricke J, Altman AM, Devarajan E (2009) Tissue-resident stem cells promote breast cancer growth and metastasis. *Carcinogenesis*, 30(4):589-597.
- Mueller LP, Luetzkendorf J, Mueller T, Reichelt K, Simon H, Schmoll HJ (2006) Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction. *Stem Cells*, 24(12):2753-2765.
- Müerköster S, Wegehenkel K, Arlt A, Witt M, Sipos B, Kruse ML, Sebens T, Klöppel G, Kalthoff H, Fölsch UR, Schäfer H (2004) Tumor Stroma Interactions Induce Chemoresistance in Pancreatic Ductal Carcinoma Cells Involving Increased Secretion and Paracrine Effects of Nitric Oxide and Interleukin-1 *Cancer Res*, 64(4):1331-1337.
- Nakasone ES, Askautrud HA, Kees T, Park JH, Plaks V, Ewald AJ, Fein M, Rasch MG, Tan YX, Qiu J, Park J, Sinha P, Bissell MJ, Frengen E, Werb Z, Egeblad M (2012) Imaging tumor-stroma interactions during chemotherapy reveals contributions of the microenvironment to resistance. *Cancer Cell*, 21(4):488-503.
- Neuhuber B, Swanger SA, Howard L, Mackay A, Fischer I (2008) Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Exp Hematol*, 36(9):1176-1185.
- Neuss S, Becher E, Wöltje M, Tietze L, Jahnen-Dechent W (2004) Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. *Stem Cells*, 22(3):405-414.
- Nishida N, Nagahara M, Sato T, Mimori K, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Ishii H, Sugihara K, Doki Y, Mori M (2012) Microarray analysis of colorectal cancer stromal tissue reveals upregulation of two oncogenic miRNA clusters. *Clin Cancer Res*, 18(11):3054-3070.
- Ohnishi S, Yasuda T, Kitamura S, Nagaya N (2007) Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells. *Stem Cells*, 25(5):1166-1177.
- 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(3):335-348.

Pantel K, Schlimok G, Braun S, Kutter D, Lindemann F, Schaller G, Funke I, Izbicki JR, Riethmuller G (1993) Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst*, 85(17):1419-1424.

Paraiso KH, Smalley KS (2013) Fibroblast-mediated drug resistance in cancer. *Biochem Pharmacol*, 85(8):1033-1041.

Pevsner-Fischer M, Levin S, Zipori D (2011) The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. *Stem Cell Rev*, 7(3):560-568.

Pijnappels DA, Schalijs MJ, Ramkisoensing AA, van Tuyn J, de Vries AA, van der Laarse A, Ypey DL, Atsma DE (2008) Forced alignment of mesenchymal stem cells undergoing cardiomyogenic differentiation affects functional integration with cardiomyocyte cultures. *Circ Res*, 103(2):167-176.

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*, 284(5411):143-147.

Pizzorno G, Sun Z, Handschumacher RE (1995) Aberrant cell cycle inhibition pattern in human colon carcinoma cell lines after exposure to 5-fluorouracil. *Biochem Pharmacol*, 49(4):553-557.

Pollard JW (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*, 4(1):71-78.

Quante M, Tu SP, Tomita H, Gonda T, Wang SS, 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(2):257-272.

Ramasamy R, Lam EW, Soeiro I, Tisato V, Bonnet D, Dazzi F (2007) Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia*, 21(2):304-310.

RKI: Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Auflage. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), Berlin, 2015.

Roodhart JM, Daenen LG, Stigter EC, Prins HJ, Gerrits J, Houthuijzen JM, Gerritsen MG, Schipper HS, Backer MJ, van Amersfoort M, Vermaat JS, Moerer P, Ishihara K, Kalkhoven E, Beijnen JH, Derksen PW, Medema RH, Martens AC, Brenkman AB, Voest EE (2011) Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids. *Cancer Cell*, 20(3):370-383.

Saleh EM, El-Awady RA, Anis N (2013) Predictive markers for the response to 5-fluorouracil therapy in cancer cells: Constant-field gel electrophoresis as a tool for prediction of response to 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Oncol Lett*, 5(1):321-327.

Sasser AK, Mundy BL, Smith KM, Studebaker AW, Axel AE, Haidet AM, Fernandez SA, Hall BM (2007) Human bone marrow stromal cells enhance breast cancer cell growth rates in a cell line-dependent manner when evaluated in 3D tumor environments. *Cancer Lett*, 254(2):255-264.

Scherzed A, Hackenberg S, Radloff A, Froelich K, Rak K, Hagen R, Kleinsasser N (2013) Human Mesenchymal Stem Cells Promote Cancer Motility and Cytokine Secretion in vitro. *Cells Tissues Organs*,

Sebens Muerkoster S, Lust J, Arlt A, Hasler R, Witt M, Sebens T, Schreiber S, Fölsch UR, Schäfer H (2006) Acquired chemoresistance in pancreatic carcinoma cells: induced

---

- secretion of IL-1beta and NO lead to inactivation of caspases. *Oncogene*, 25(28):3973-3981.
- Sebens Muerkoster S, Werbing V, Koch D, Sipos B, Ammerpohl O, Kalthoff H, Tsao MS, Fölsch UR, Schäfer H (2008) Role of myofibroblasts in innate chemoresistance of pancreatic carcinoma--epigenetic downregulation of caspases. *Int J Cancer*, 123(8):1751-1760.
- Sethi T, Rintoul RC, Moore SM, MacKinnon AC, Salter D, Choo C, Chilvers ER, Dransfield I, Donnelly SC, Strieter R, Haslett C (1999) Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat Med*, 5(6):662-668.
- 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. *Int J Cancer*, 127(10):2323-2333.
- Shree T, Olson OC, Elie BT, Kester JC, Garfall AL, Simpson K, Bell-McGuinn KM, Zabor EC, Brogi E, Joyce JA (2011) Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes Dev*, 25(23):2465-2479.
- Singer NG, Caplan AI (2011) Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol*, 6:457-478.
- Singh A, Settleman J (2010) EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, 29(34):4741-4751.
- 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. *J Natl Cancer Inst*, 82(13):1107-1112.
- 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(4):e4992.
- Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, Davis A, Mongare MM, Gould J, Frederick DT, Cooper ZA, Chapman PB, Solit DB, Ribas A, Lo RS, Flaherty KT, Ogino S, Wargo JA, Golub TR (2012) Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*, 487(7408):500-504.
- Studebaker AW, Storci G, Werbeck JL, Sansone P, Sasser AK, Tavorlari S, Huang T, Chan MW, Marini FC, Rosol TJ, Bonafe M, Hall BM (2008) Fibroblasts isolated from common sites of breast cancer metastasis enhance cancer cell growth rates and invasiveness in an interleukin-6-dependent manner. *Cancer Res*, 68(21):9087-9095.
- Sullivan NJ, Sasser AK, Axel AE, Vesuna F, Raman V, Ramirez N, Oberyszyn TM, Hall BM (2009) Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene*, 28(33):2940-2947.
- Sun Y, Campisi J, Higano C, Beer TM, Porter P, Coleman I, True L, Nelson PS (2012) Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B. *Nat Med*, 18(9):1359-1368.
- Tan W, Zhang W, Strasner A, Grivennikov S, Cheng JQ, Hoffman RM, Karin M (2011) Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signalling. *Nature*, 470(7335):548-553.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5):871-890.
- Thoma CR, Zimmermann M, Agarkova I, Kelm JM, Krek W (2014) 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Adv Drug Deliv Rev*,
-

- Tredan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF (2007) Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst*, 99(19):1441-1454.
- Tripathi M, Billet S, Bhowmick NA (2012) Understanding the role of stromal fibroblasts in cancer progression. *Cell Adh Migr*, 6(3):231-235.
- Tsai KS, Yang SH, Lei YP, Tsai CC, Chen HW, Hsu CY, Chen LL, Wang HW, Miller SA, Chiou SH, Hung MC, Hung SC (2011) Mesenchymal stem cells promote formation of colorectal tumors in mice. *Gastroenterology*, 141(3):1046-1056.
- Tsujino T, Seshimo I, Yamamoto H, Ngan CY, Ezumi K, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M (2007) Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 13(7):2082-2090.
- Ungefroren H, Sebens S, Seidl D, Lehnert H, Hass R (2011) Interaction of tumor cells with the microenvironment. *Cell Commun Signal*, 9:18.
- Vaculik C, Schuster C, Bauer W, Iram N, Pfisterer K, Kramer G, Reinisch A, Strunk D, Elbe-Burger A (2012) Human dermis harbors distinct mesenchymal stromal cell subsets. *J Invest Dermatol*, 132(3 Pt 1):563-574.
- Valle-Prieto A, Conget PA (2010) Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress. *Stem Cells Dev*, 19(12):1885-1893.
- Van den Berg HW, Desai ZR, Wilson R, Kennedy G, Bridges JM, Shanks RG (1982) The pharmacokinetics of vincristine in man: reduced drug clearance associated with raised serum alkaline phosphatase and dose-limited elimination. *Cancer Chemother Pharmacol*, 8(2):215-219.
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*, 36(3):131-149.
- Vermeulen L, De Sousa EMF, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, Tuynman JB, Todaro M, Merz C, Rodermond H, Sprick MR, Kemper K, Richel DJ, Stassi G, Medema JP (2010) Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*, 12(5):468-476.
- Vianello F, Villanova F, Tisato V, Lymperi S, Ho K-K, Gomes AR, Marin D, Bonnet D, Apperley J, Lam EW-F (2010) Bone marrow mesenchymal stromal cells non-selectively protect chronic myeloid leukemia cells from imatinib-induced apoptosis via the CXCR4/CXCL12 axis. *Haematologica*, 95(7):1081-1089.
- Visco V, Bava FA, d'Alessandro F, Cavallini M, Ziparo V, Torrasi MR (2009) Human colon fibroblasts induce differentiation and proliferation of intestinal epithelial cells through the direct paracrine action of keratinocyte growth factor. *J Cell Physiol*, 220(1):204-213.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, 319(9):525-532.
- Vousden KH, Prives C (2009) Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*, 137(3):413-431.
- Wakitani S, Saito T, Caplan AI (1995) Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*, 18(12):1417-1426.
- Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D (2009) Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*, 9(7):489-499.
- Wang ML, Pan CM, Chiou SH, Chen WH, Chang HY, Lee OK, Hsu HS, Wu CW (2012) Oncostatin m modulates the mesenchymal-epithelial transition of lung adenocarcinoma
-

- cells by a mesenchymal stem cell-mediated paracrine effect. *Cancer Res*, 72(22):6051-6064.
- Wang W, Li Q, Yamada T, Matsumoto K, Matsumoto I, Oda M, Watanabe G, Kayano Y, Nishioka Y, Sone S, Yano S (2009) Crosstalk to stromal fibroblasts induces resistance of lung cancer to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Clin Cancer Res*, 15(21):6630-6638.
- Wang Z, Li Y, Ahmad A, Azmi AS, Kong D, Banerjee S, Sarkar FH (2010) Targeting miRNAs involved in cancer stem cell and EMT regulation: An emerging concept in overcoming drug resistance. *Drug Resist Updat*, 13(4-5):109-118.
- Waterman RS, Henkle SL, Betancourt AM (2012) Mesenchymal stem cell 1 (MSC1)-based therapy attenuates tumor growth whereas MSC2-treatment promotes tumor growth and metastasis. *PLoS One*, 7(9):e45590.
- Widder M, Lützkendorf J, Caysa H, Unverzagt S, Wickenhauser C, Benndorf RA, Schmoll HJ, Müller-Tidow C, Müller T, Müller LP (2015) Multipotent mesenchymal stromal cells promote tumor growth in distinct colorectal cancer cells by a beta1-integrin-dependent mechanism. *Int J Cancer*,
- Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, Peng J, Lin E, Wang Y, Sosman J, Ribas A, Li J, Moffat J, Sutherlin DP, Koeppen H, Merchant M, Neve R, Settleman J (2012) Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature*, 487(7408):505-509.
- Yang AD, Fan F, Camp ER, van Buren G, Liu W, Somcio R, Gray MJ, Cheng H, Hoff PM, Ellis LM (2006) Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clin Cancer Res*, 12(14 Pt 1):4147-4153.
- Yang Y, Mallampati S, Sun B, Zhang J, Kim SB, Lee JS, Gong Y, Cai Z, Sun X (2013) Wnt pathway contributes to the protection by bone marrow stromal cells of acute lymphoblastic leukemia cells and is a potential therapeutic target. *Cancer Lett*, 333(1):9-17.
- Ye X, Weinberg RA (2015) Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends Cell Biol*, 25(11):675-686.
- Yoshikawa R, Kusunoki M, Yanagi H, Noda M, Furuyama JI, Yamamura T, Hashimoto-Tamaoki T (2001) Dual antitumor effects of 5-fluorouracil on the cell cycle in colorectal carcinoma cells: a novel target mechanism concept for pharmacokinetic modulating chemotherapy. *Cancer Res*, 61(3):1029-1037.
- Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ (1977) A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Research*, 37(10):3639-3643.
- Zhang B, Li M, McDonald T, Holyoake TL, Moon RT, Campana D, Shultz L, Bhatia R (2013) Microenvironmental protection of CML stem and progenitor cells from tyrosine kinase inhibitors through N-cadherin and Wnt-beta-catenin signaling. *Blood*, 121(10):1824-1838.
- Zhu Y, Sun Z, Han Q, Liao L, Wang J, Bian C, Li J, Yan X, Liu Y, Shao C, Zhao RC (2009) Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia*, 23(5):925-933.
- Zimmerlin L, Park TS, Zambidis ET, Donnenberg VS, Donnenberg AD (2013) Mesenchymal stem cell secretome and regenerative therapy after cancer. *Biochimie*, 95(12):2235-2245.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7(2):211-228.
-

**THESEN**

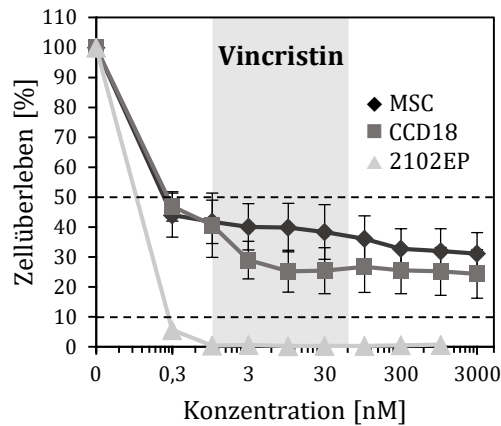
1. Aus dem bisherigen Kenntnisstand ergeht, dass Multipotente Stromazellen (MSC) und weitere nicht-maligne-transformierte Zellen am Aufbau des Tumorstromas teilnehmen. Darüber hinaus ist ein zytoprotektiver Einfluss von MSC auf Tumorzellen bekannt.
  2. In der vorliegenden Arbeit wird für MSC daher die spezifische Vermittlung einer Therapeutikaresistenz im Modell des kolorektalen Karzinoms (CRC) postuliert.
  3. MSC und humane Kolonfibroblasten (CCD18) vermitteln bei Behandlung mit 5-FU einen Wachstumsvorteil der CRC-Zelllinie HCT8. Eine signifikante 5-FU-Resistenz wird bei direkter Kokultur mit MSC und CCD18 sowie durch konditioniertes Medium von CCD18 vermittelt.
  4. Der 5-FU-bedingte Zellzyklusarrest von HCT8-Zellen wird über konditioniertes Medium von MSC supprimiert bzw. bei höheren 5-FU-Konzentrationen hinausgezögert, nicht jedoch bei direkter Kokultur mit MSC. Dahingegen verhindern bzw. verzögern CCD18 sowohl bei direkter Kokultur als auch über konditioniertes Medium den 5-FU-bedingten Zellzyklusarrest von HCT8-Zellen. Daher wird für MSC durch den Kontakt mit HCT8-Zellen der Übergang in einen alterierten Zustand angenommen, über den MSC einen veränderten Einfluss auf HCT8-Zellen ausüben.
  5. Die CRC-Zelllinie DLD1 zeigt bei direkter Kokultur mit MSC und CCD18 eine Zunahme der Proliferation, welche unter 5-FU-Behandlung persistiert. Anhand konditionierter Medien von MSC und CCD18 konnte dies nicht reproduziert werden. Daher wird für DLD1-Zellen ein spezifischer, Zellkontakt-abhängiger Mechanismus der Wachstumsförderung angenommen.
  6. Im dreidimensionalen Sphäroidmodell der CRC-Zelllinie DLD1 bewirken MSC und CCD18 eine Größenzunahme der Sphäroide, sowohl bei direkter Kokultur als auch über konditionierte Medien. Diese Größenzunahme persistierte unter 5-FU-Behandlung. Die Vermittlung der Größenzunahme der Sphäroide wird daher zum Teil über lösliche Faktoren von MSC und CCD18 angenommen.
  7. MSC und CCD18 vermittelten bei direkter Kokultur und über konditionierte Medien morphologische Veränderungen beider verwendeter CRC-Zelllinien, welche unter 5-FU-Behandlung persistierten. Vergleichbare morphologische Veränderungen finden sich ebenfalls bei der epithelial-mesenchymalen Transition.
-

8. Schließlich zeigen MSC und CCD18 gegenüber sensitiven Tumorzelllinien eine Resistenz bei Behandlung mit 5-Fluorouracil (5-FU), Oxaliplatin, Cisplatin, Etoposid und Vincristin in klinisch relevanten Konzentrationen. Dabei weisen MSC bei Behandlung mit 5-FU, Oxaliplatin und Cisplatin eine signifikant höhere Resistenz auf als CCD18.
  9. Zusammengefasst konnte für MSC eine spezifische Resistenz gegenüber diversen Zytostatika gezeigt werden, die Vermittlung morphologischer Veränderungen der CRC-Zelllinien HCT8 und DLD1 sowie die Vermittlung einer spezifischen 5-FU-Resistenz für die CRC-Zelllinie HCT8. MSC scheinen dabei, im Vergleich zu CCD18, über einen vom Zellkontakt mit CRC-Zellen abhängigen Mechanismus in einen alterierten Zustand zu gelangen.
  10. Die beteiligten Mechanismen an der Vermittlung der 5-FU-Resistenz, der Förderung der Proliferation und der morphologischen Veränderungen der CRC-Zellen sollten im Weiteren identifiziert werden sowie in ein *in vivo* Modell übertragen werden. Die therapeutische Inhibition der beteiligten Mediatoren und Signalkaskaden birgt *in situ* die Möglichkeit Tumorzellen gegenüber Tumorthapeutika zu sensitivieren und somit den Erfolg der Tumorthherapie zu steigern.
-

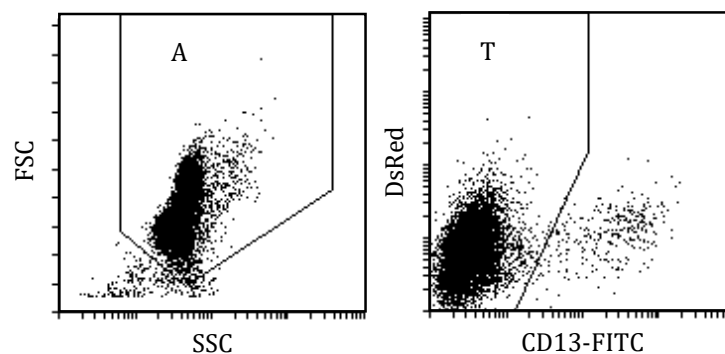




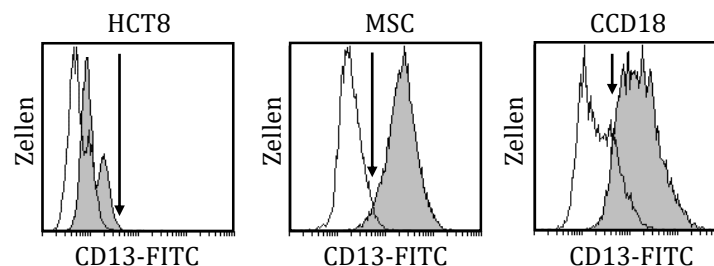
**Anhang 3. MSC und CCD18 zeigen eine Vincristin-Resistenz im Vergleich zu sensitiven Tumorzellen.** Behandlung mit Vincristin über 96 h, der therapeutisch relevante Konzentrationsbereich (Van den Berg *et al.* 1982) ist grau hinterlegt. MW  $\pm$  SD;  $n = 7$  für MSC,  $n = 6$  für CCD18,  $n = 1$  für 2102EP.



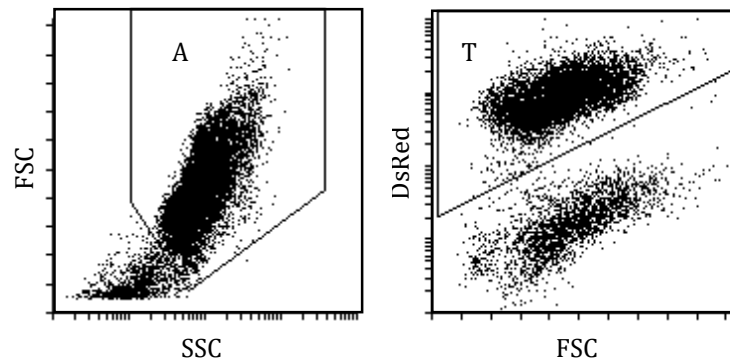
**Anhang 4. Durchflusszytometrie von HCT8 in direkter Kokultur mit MSC und CCD18.** Exemplarische Analyse von HCT8+MSC nach 72 h Behandlung mit 2  $\mu$ M 5-FU. Die links gezeigte Region A grenzt Zelldebris aus und schließt lebendige Zellen ein. Rechts dargestellt ist die Auftragung der Population A über DsRed- und FITC-Signale. Durch das Eingrenzen der CD13-FITC negativen Zellen in Region T ist der prozentuale Anteil der HCT8-Zellen an der Gesamtmenge A erhältlich.



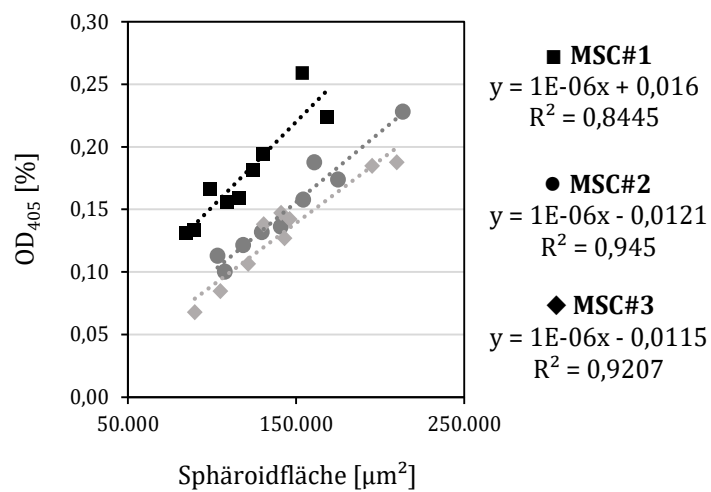
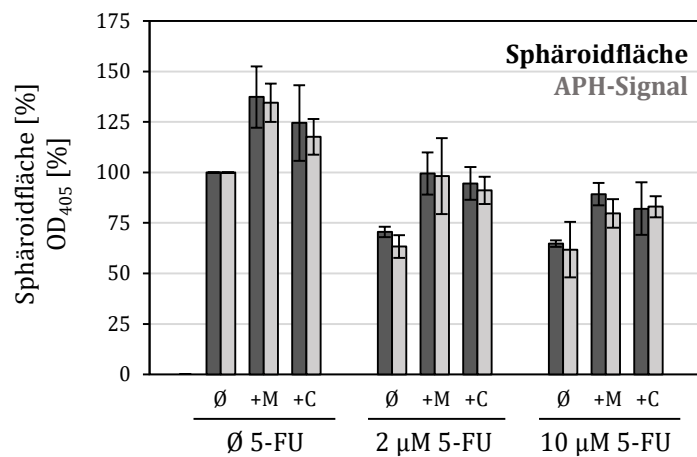
**Anhang 5. Isotypenkontrollen bei direkter Kokultur von HCT8-Zellen mit MSC und CCD18.** Dargestellt sind Histogramme der Isotypenkontrollen mit Anti-mouse- $\gamma$ 1-FITC (transparent) bzw. anti-CD13-FITC (grau hinterlegt). Die Pfeile markieren den *cut-off*. Trotz Überlagerung der Populationen im Histogramm war in *dot-plot*-Auftragungen eine genaue Abgrenzung der Populationen voneinander möglich (Vgl. Anhang 4).



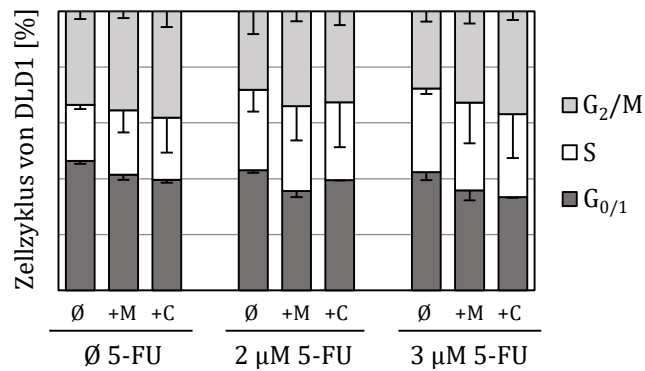
**Anhang 6. Durchflusszytometrie von DLD1-Zellen in direkter Kokultur mit MSC und CCD18.** Analog Anhang 4 wurde der Anteil der DLD1-Zellen an der Gesamtmenge bestimmt. Rechts ist Population A über die DsRed- und FSC-Signale aufgetragen. Region T grenzt DsRed-positive DLD1-Zellen ein, um den Anteil an der Gesamtmenge A zu ermitteln.



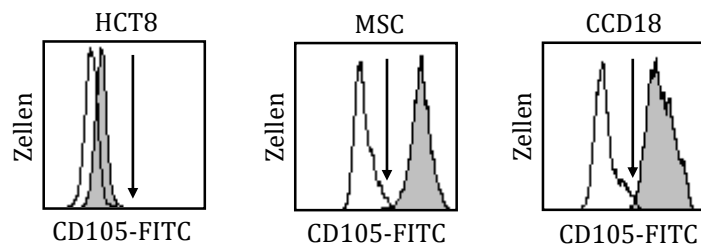
**Anhang 7. Korrelation der Sphäroidfläche mit dem APH-Signal.** Oben gezeigt sind die normierten Sphäroidflächen und APH-Signale. Aufgetragen sind die absoluten APH-Signale gegen absolute Sphäroidflächen. Sphäroidflächen  $n = 4$ ; APH-Signal  $n = 3$ .



**Anhang 8. Zellzyklusanalyse von DLD1-Zellen mit MSC und CCD18 bei Behandlung mit 5-FU für 48 h.** Dargestellt sind MW  $\pm$  SD der jeweiligen Zellzyklusphasen. Die Bezeichnung erfolgt analog zu Abb. 5.  $n = 2$ .



**Anhang 9. Isotypenkontrollen bei Zellzyklusanalyse der direkten Kokultur von HCT8-Zellen mit MSC und CCD18.** Dargestellt sind Histogramme der Isotypenkontrollen mit Anti-mouse- $\gamma$ 1-FITC (transparent) bzw. -CD105-FITC (grau hinterlegt) mit anschließender Zellzyklusanalyse. Die Pfeile markieren den *cut-off*.



---

## **Tabellarischer Lebenslauf**

### **Ala Jamous**

---

Geburtsdatum: 11.02.1988  
Geburtsort: Dresden  
Anschrift: Emilienstr. 14, 37075 Göttingen  
Email-Adresse: ala.jms@gmail.com

### **Beruflicher Werdegang**

---

seit Mai 2014 Assistenzarzt an der Klinik für Neurologie, Universitätsmedizin  
Göttingen

### **Praktisches Jahr 2012/2013**

---

1. Terial Unfall-, Herz- und Gefäßchirurgie, Universitätsmedizin Göttingen  
2. Terial Innere Medizin, Spital Wattwil, Universität Zürich (Schweiz)  
3. Terial Neurologie, Universitätsklinikum Halle

### **Studium und Schulbildung**

---

2006 bis 2013 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität  
Halle/Wittenberg  
1998 bis 2006 Martin-Andersen-Nexö-Gymnasium Dresden, im mathematisch-  
naturwissenschaftlich vertieften Profil ab 2000  
1994 bis 1998 108. Grundschule, Dresden

Ala Jamous

Göttingen, den 26.06.2016

---

---

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ala Jamous

Göttingen, den 26.06.2016

---

---

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Ich erkläre hiermit, dass diese Arbeit an keiner anderen Universität oder Hochschule vorgelegt wurde. Den Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens stelle ich erstmalig an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Frühere Promotionsversuche wurden meinerseits nicht unternommen.

Ala Jamous

Göttingen, den 26.06.2016

---

---

## **Danksagung**

An erster Stelle bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schmoll und Prof. Dr. med. Carsten Müller-Tidow für die Möglichkeit, dieses interessante Thema an ihrer Klinik bearbeiten zu können.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. med. Lutz P. Müller für die geduldige Betreuung in wissenschaftlichen und klinischen Belangen, sowie das stete Interesse am Fortgang meiner Dissertation. Ein großes Dankeschön gilt des Weiteren Dr. rer. nat. Thomas Müller und Dr. rer. nat. Henrike Lucas, sowie insbesondere Dr. rer. nat. Jana Lützkendorf und Dr. rer. nat. Miriam Widder und für angeregte fachliche Diskussionen, die Hilfsbereitschaft in der Umsetzung experimenteller Arbeiten und der kritischen Durchsicht des Manuskripts. Herzlich bedanken möchte mich weiterhin bei Katrin Neger und Franziska Reipsch, die mich beim Erlernen experimenteller Methoden und der Durchführung der Experimente maßgeblich unterstützt haben. Die Zusammenarbeit hat mir immer große Freude bereitet!

Abschließend möchte ich bei meinen Eltern Irini und Chaaban, meinen Geschwistern Roula und Baha sowie meiner Freundin Mariana bedanken. Nicht zuletzt eure moralische Unterstützung hat zum Gelingen und zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

---