

Aus dem Zentrum für Zahn-, Mund- und Kiefergesundheit
Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde
der Universität Würzburg

Leitung: Professor Dr. rer. nat. Jürgen Groll

**Charakterisierung eines
3D-Mikrotumormodells zur Untersuchung von
Tumor-Stroma-Interaktionen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Kathrin Leonie Heise

aus Marbach am Neckar

Würzburg, April 2020

Referent: Professor Dr. rer. nat. Jürgen Groll

Korreferent: Professor Dr. rer. nat. Torsten Blunk

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2020

Die Promovendin ist Zahnärztin

*In Dankbarkeit
meiner Familie*

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	viii
1 Einleitung	1
2 Kenntnisstand	4
2.1 Tumormodelle <i>in vitro</i>	4
2.1.1 2D-Monolayer-Modelle vs. 3D-Modelle.....	4
2.1.2 Techniken zur Herstellung von 3D-Tumorsphäroiden	8
2.1.3 Neue Forschungsansätze	13
2.2 Aufbau der gesunden Brust.....	14
2.2.1 Histologischer Aufbau	14
2.2.2 EZM	15
2.2.3 Stromazellen	17
2.3 Klinische Aspekte des Mammakarzinoms	17
2.4 Die Tumormikroumgebung	20
2.4.1 EZM	21
2.4.2 Stromazellen	22
2.4.3 Einfluss löslicher Faktoren	25
2.5 Tumorstammzellen und ihr Einfluss auf das Mammakarzinom	27
3 Ziel der Arbeit	31
4 Material	33
4.1 Geräte.....	33
4.2 Chemikalien	34
4.3 Medien, Puffer und Lösungen.....	35
4.4 Zellen	36
4.5 Antikörper	37
4.6 Verbrauchsmaterial.....	38
4.7 Software.....	39
5 Methoden	40
5.1 Zellkultur	40

5.2	Herstellung der 3D-Sphäroidkulturen	40
5.3	Einbetten der 3D-Sphäroide	42
5.4	Histologische Charakterisierung der 3D-Sphäroide.....	42
5.5	Bildbearbeitung und -analyse	43
5.6	Statistik	44
6	Ergebnisse	45
6.1	Herstellung von 3D-Tumorsphäroiden mit der Liquid-Overlay- Technik	45
6.2	Etablierung der histologischen EZM-Charakterisierung	47
6.3	Charakterisierung der EZM in den 3D-Tumorsphäroiden.....	49
6.4	Morphologische Charakterisierung der 3D-Tumorsphäroide und Vergleich mit Gewebesphäroiden sowie tumorassoziierten Gewebesphäroiden.....	50
6.5	Immunhistochemische Färbung und histomorphometrische Betrachtung tumorrelevanter EZM-Proteine: Fibronektin	53
6.6	Relative Veränderungen der Fibronektin-Deposition in Tumor- und Gewebesphäroiden.....	55
6.7	Immunhistochemische Färbung und histomorphometrische Betrachtung tumorrelevanter EZM-Proteine: Kollagen I	56
6.8	Relative Veränderungen der Kollagen-I-Deposition in Tumor- und Gewebesphäroiden und Untersuchung der Kollokalisierung von Kollagen I und dem Kontraktilitätsmarker α -SMA.....	58
6.9	Analyse von Tumorstammzellcharakteristika	60
7	Diskussion	63
8	Zusammenfassung und Ausblick	70
9	Literaturverzeichnis	73

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1:	Unterschiede in 2D- und 3D- <i>in-vitro</i> -Modellen	8
Abb. 2.2:	Techniken zur Herstellung von 3D-Tumorsphäroiden (Auswahl)	13
Abb. 2.3:	Aufbau der gesunden Brust.....	15
Abb. 2.4:	Veränderungen der Mikroumgebung bei Brustkrebs.....	26
Abb. 6.1:	Herstellung von 3D-Tumorsphäroiden mit der Liquid-Overlay- Technik.....	46
Abb. 6.2:	Etablierung der histologischen EZM-Charakterisierung	48
Abb. 6.3:	Charakterisierung der EZM in den 3D-Tumorsphäroiden	49
Abb. 6.4:	Morphologische Charakterisierung der 3D-Tumorsphäroide und Vergleich mit Gewebesphäroiden sowie tumorassoziierten Gewebesphäroiden.....	51
Abb. 6.5:	Grundcharakterisierung der EZM	52
Abb. 6.6:	Immunhistochemische Färbung und histomorphometrische Betrachtung tumorrelevanter EZM-Proteine: Fibronectin.....	54
Abb. 6.7:	Relative Veränderungen der Fibronectin-Deposition in Tumor- und Gewebesphäroiden.....	55
Abb. 6.8:	Immunhistochemische Färbung und histomorphometrische Betrachtung tumorrelevanter EZM-Proteine: Kollagen I.....	57
Abb. 6.9:	Relative Veränderungen der Kollagen-I-Deposition in Tumor- und Gewebesphäroiden und Untersuchung der Kokalisation von Kollagen I und dem Kontraktilitätsmarker α -SMA	59
Abb. 6.10:	Analyse von Tumorstammzellcharakteristika	62

Tabellenverzeichnis

Tab. 4.1:	Primärantikörper.....	37
Tab. 4.2:	Sekundärantikörper.....	37

Abkürzungsverzeichnis

2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
a.u.	Arbitrary unit (willkürliche Einheit)
Abb.	Abbildung
Bcl-2-Protein	B-cell-lymphoma-2-Protein
BRCA1	Breast Cancer 1
bzw.	Beziehungsweise
CAF	Cancer Associated Fibroblast (tumorassoziierter Fibroblast)
CSC	Cancer Stem Cell (Tumorstammzelle)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	Vollentsalztes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER	Estrogenrezeptor
et al.	Et alii
etc.	Et cetera
EZM	Extrazellulärmatrix
FAK	Focal Adhesion Kinase
FKS	Fetales Kälberserum
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde

H.E.	Hämatoxylin-Eosin
hASC	Human adipose-derived stem cells (mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe)
HER2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2
IGF-1	Insulin-like-growth-factor 1
IgG	Immunglobulin G
IL-8	Interleukin-8
kDa	Kilodalton
MCTS	Multicellular tumor spheroid (multizellulärer Tumorsphäroid)
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Messenger RNA
MWCO	Molecular Weight Cut Off
nm	Nanometer
OCT-4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4
PBS	Phosphate-buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
Pen Strep	Penicillin Streptomycin
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
PR	Progesteronrezeptor

Ras	Rat Sarcoma
RawIntDen	Raw Integrated Density (Summe der Pixelwerte)
Rho	Ras homologue
ROCK	Rho-Kinase
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RWV	Rotating Wall Vessel (Gefäß mit rotierender Wand)
s	Sekunde
s.	Siehe
s.o.	Siehe oben
SOX-2	SRY (sex determining region Y)-box 2 (geschlechtsbestimmende-Region-Y-Box 2)
Tab.	Tabelle
TCM	Tumor-conditioned medium (tumorkonditioniertes Medium)
TGF- β	Transforming Growth Factor β (transformierender Wachstumsfaktor β)
TNBC	Triple-Negative Breast Cancer
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
u.a.	Unter anderem
ULA	Ultra-low attachment (ultraniedrige Anheftung)

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
vs.	Versus
z.B.	Zum Beispiel
α -SMA	Alpha-Smooth-Muscle-Actin
μ L	Mikroliter
μ m	Mikrometer

1 Einleitung

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung der Frau. Trotz deutlicher Verbesserungen, vor allem der frühzeitigen Diagnose und Behandlung, bleibt es die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache von Frauen in der westlichen Welt [1]. Insbesondere metastasierte Formen zeichnen sich häufig durch eine schlechte Prognose, Therapieresistenz sowie späte Rezidive aus [2]. Ein Grund dafür ist, dass bis heute für die Brustkrebsforschung keine geeigneten *in-vitro*-Tumormodelle zur Verfügung stehen, die die gesamte Komplexität der Erkrankung adäquat wiedergeben können.

Konventionelle 2D-Monolayer-Modelle haben zwar in der Vergangenheit enorm dazu beigetragen, Erkenntnisse über die Tumorbiologie und über die der Tumorprogression zugrunde liegenden Mechanismen zu erhalten oder Ansätze für die Medikamentenforschung zu liefern [3, 4]. *In vivo* sind die Tumorzellen jedoch in ein dreidimensionales System mit ihrer Tumormikroumgebung eingebettet [5-7]. Diese dreidimensionale Anordnung geht aber beim Kultivieren der Zellen auf flachen, rigiden Oberflächen verloren [3, 8]. Durch die stark vereinfachte Mikroumgebung resultieren im 2D-Modell unter anderem veränderte Eigenschaften in Bezug auf mechanische und biochemische Signale [9], Genexpressionsprofile [10], Medikamentenresistenz [11] sowie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen [12, 13].

Deshalb ist es wichtig, 3D-*in-vitro*-Modelle zu entwickeln, in denen sich die Zellen ähnlich ihrer dreidimensionalen *in-vivo*-Architektur organisieren können und damit vorhersagbarere Ergebnisse in der Forschung ermöglichen [14]. Es sind zahlreiche Arten von 3D-Tumormodellen bekannt, die im Vergleich zu konventionellen 2D-Modellen oben genannte Tumoreigenschaften mehr oder weniger exakt rekapitulieren. 3D-Modelle werden deshalb heute zum verbesserten Verständnis von Tumorbiologie, -progression und -invasion verwendet [15]. Dabei existiert eine Vielzahl von Techniken zur Herstellung von 3D-Modellen, die jeweils Vor- und Nachteile besitzen.

Es ist bekannt, dass Tumoren nicht nur durch die Ansammlung von genetisch transformierten, neoplastischen Zellen entstehen, voranschreiten und

metastasieren, sondern dass die Tumormikroumgebung eine wesentliche Rolle in der Pathogenese spielt [16]. Die Tumormikroumgebung besteht aus nicht malignen Zellen und ihrem Stroma [17], das in der Brust neben Binde- auch maßgeblich aus Fettgewebe besteht [18]. Im gesunden Zustand sind Stromazellen für die Ausbildung einer gewebespezifischen EZM verantwortlich, die für die Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase essentiell ist [19]. Verliert die Mikroumgebung des Brustgewebes, z.B. im Rahmen einer malignen Erkrankung, hingegen ihren homöostatischen Zustand, können sowohl differenzierte Adipozyten als auch mesenchymale Stammzellen des Fettgewebes (hASCs) tumorfördernde Eigenschaften annehmen [20]. Eine pathologisch veränderte Tumormikroumgebung bewirkt unter anderem die Differenzierung von hASCs in tumorassoziierte Fibroblasten (*cancer associated fibroblasts* – CAFs), auch Myofibroblasten genannt [21].

Bis heute sind die meisten Erkenntnisse über die Interaktionen von EZM und Tumorzellen aus vereinfachten Scaffold-basierten Ansätzen gewonnen worden. Diese stellen Aspekte der EZM durch Bereitstellung eines Gerüsts aus natürlichem (z.B. Matrigel®) oder synthetischem Material (z.B. PLGA) dar [22]. Eine vorgefertigte Struktur birgt jedoch die Gefahr, die Ausbildung einer realitätsnahen Mikroumgebung zu verhindern. In Scaffold-freien Ansätzen wird die Mikroumgebung hingegen ausschließlich endogen von den beteiligten Zellen synthetisiert [23]. Um die stromale Komponente von Brustkrebs im *in-vitro*-Modell realitätsnah abbilden zu können, wurden deshalb Scaffold-freie Ansätze zur Erschaffung heterotypischer Modelle entwickelt, in denen eine Co-Kultivierung von Tumor- und Stromazellen erfolgt [24].

Biochemische und biomechanische Faktoren aus der Tumormikroumgebung beeinflussen nicht nur Tumorzellen [25]. Lösliche Faktoren wie TGF- β und IL-8, die von Brustkrebszellen in ihre Tumormikroumgebung sezerniert werden, fördern die Differenzierung von hASCs in Myofibroblasten und erhöhen die Zellproliferation [20]. Myofibroblasten vereinfachen das Überleben von Tumorzellen, indem sie bestimmte Zytokine, Wachstumsfaktoren, Chemokine und Proteasen sezernieren [26]. Sie sind bekannt für die Bildung einer Kollagen-I- und Fibronectin-reichen EZM, die eine erhöhte Steifigkeit des

Gewebes bedingt. Diese Eigenschaft ist charakteristisch für Brustkrebs, liegt der „Knotenbildung“ zugrunde und ist mit einer schlechteren Prognose verbunden [27]. Eine erhöhte Steifigkeit der EZM kann wiederum die gleichen tumorfördernden Effekte auf hASCs haben wie die oben genannten biochemischen Signalstoffe in der Tumormikroumgebung [25], wodurch ein sich selbst verstärkender Mechanismus in Gang gesetzt wird. Dieses komplexe Zusammenspiel aus löslichen und mechanischen Faktoren gilt es im *in-vitro*-Modell zu rekapitulieren. Um deren jeweilige Auswirkungen auf das Schicksal der hASCs differenziert betrachten zu können, ist es zudem erforderlich, die Einflussfaktoren in der Analyse voneinander zu trennen.

Schließlich ist es nötig, der aus *in-vivo*-Tumoren bekannten hierarchischen Organisation von Tumorzellen gerecht zu werden: Laut der generell akzeptierten Tumorstammzellhypothese bestehen Tumoren sowohl aus differenzierten Tumorzellen als auch aus Tumorstammzellen (*cancer stem cells* – CSCs) [28]. Tumorstammzellen ähneln in vielen Eigenschaften „normalen“ embryonalen Stammzellen: Sie zeichnen sich unter anderem durch Pluripotenz und Quieszenz aus und besitzen die Fähigkeit zum Self-Renewal [29]. Das CSCs-Modell liefert außerdem eine Erklärung für die häufig beobachteten Rezidive nach Therapieversuchen, die lediglich gegen die große, sich teilende (differenzierte) Tumormasse Wirkung zeigen; Tumorstammzellen sind jedoch häufig resistent aufgrund der oben genannten Eigenschaften [30]. Folglich ist die Wiedergabe der zellulären Heterogenität im 3D-Tumormodell eine unabdingbare Voraussetzung für die Entwicklung von Therapien, die auch gegen Tumorstammzellen wirken sollen.

2 Kenntnisstand

2.1 Tumormodelle *in vitro*

In der Tumorforschung wird die Wirksamkeit von Medikamenten und anderen Therapieformen meist zunächst an *in-vitro*-Modellen untersucht, bevor sie *in vivo* an Tieren und schließlich klinisch getestet wird [10, 14, 31]. Ziel ist es hierbei, möglichst früh unwirksame oder zytotoxische Medikamente zu erkennen und diese gar nicht erst im weiteren Verlauf den kostenintensiven und aufwendigen *in-vivo*-Tests und der klinischen Validierung zu unterziehen [8]. Auch heute noch werden nur $\leq 5\%$ der Medikamente in der Tumorforschung zugelassen, unter anderem aufgrund der mangelhaften Vorab-Selektion durch wenig geeignete *in-vitro*-Modelle [32]. Je realitätsnäher die *in-vitro*-Modelle nun die Situation *in vivo* wiedergeben können, desto verlässlichere Ergebnisse erhofft man sich [9]. Es sind verschiedene dreidimensionale *in-vitro*-Modelle bekannt, von denen der Multizelluläre Tumorsphäroid (multicellular tumor spheroid – MCTS) das am besten charakterisierte und in der Tumorforschung am meisten verwendete 3D-Tumormodell ist [33]. Sphäroide aus Vorläuferzellen oder Stammzellen finden zudem Anwendung im Tissue Engineering, zum Beispiel als Material zur Rekonstruktion nach Mastektomie und in der Stammzellforschung [8, 15].

2.1.1 2D-Monolayer-Modelle vs. 3D-Modelle

Nach heutigem Wissensstand sind dreidimensionale *in-vitro*-Modelle in vielerlei Hinsicht den 2D-Modellen eindeutig überlegen [6, 34]. Beispielsweise kann die komplexe dreidimensionale Organisation der EZM im 2D-Modell nicht wiedergegeben werden [3, 35]. Im gesunden Gewebe sind die Interaktionen zwischen Zellen und EZM essentiell für die Aufrechterhaltung von spezifischen Gewebeeigenschaften und Homöostase [36]. Die EZM übt über Transmembranproteine in der Zellmembran physikalischen und biochemischen Einfluss auf Zellen aus [37]. Im Gegenzug bewirken die Zellen einen ständigen Umbau der EZM, indem sie deren Synthese, Abbau und Neuordnung auslösen [38]. In 2D wachsen die Zellen zudem flacher und gestreckter als *in vivo*, zeigen also eine untypische Zellmorphologie [39]. Kollagen I als häufiges EZM-Protein

kann in 3D-Modellen *in-vivo*-ähnlich rekapituliert werden, während in konventionellen Monolayer-Modellen das Ausmaß der Kollagen-I-Deposition häufig unterschätzt wird [23].

Durch die zusätzliche Dimensionalität wird auch die räumliche Organisation von Rezeptoren an der Zelloberfläche, die mit Zellen in der Umgebung interagieren, beeinflusst [40]. Die Rezeptoren steuern die Signaltransduktion der Zellen von außen nach innen und führen so im Vergleich zum 2D-Modell zu unterschiedlicher Zellfunktion (Proliferation, Differenzierung, zelluläre Antworten gegenüber externen Stimuli, Gen- und Proteinexpression), die im 3D-Modell nachweislich mehr der *in-vivo*-Situation ähnelt [8, 33, 41, 42].

Außerdem bewirkt der dreidimensionale Aufbau eine diffusionsabhängige heterogene Verteilung von Sauerstoff, Nährstoffen, Metaboliten und Signalstoffen [43]. 3D-Sphäroide mit mittleren Durchmessern von etwa 150-300 µm zeigen einen typischen Aufbau aus konzentrischen Schichten [44]: Ein innerer hypoxischer Kern wird von einer Schicht aus quieszenten Zellen umgeben. In der äußersten Schicht befinden sich proliferierende Zellen, die auch *in vivo* für das Tumorwachstum verantwortlich sind [15, 43]. Sowohl im Kern als auch in der Schicht aus quieszenten Zellen entsteht durch die mangelhafte Diffusion von Sauerstoff eine *in-vivo*-typische Hypoxie [32, 44]. 3D-Sphäroide mit Durchmessern > 500 µm zeigen eine noch deutlichere Heterogenität von Zellen und ihrem Stadium im Zellzyklus [3, 8] und zeichnen sich durch ein nekrotisches Zentrum im Sphäroidinneren aus (s. Abb. 2.1 A) [43]. In 2D-Modellen hingegen werden alle Zellen mit einem homogenen Angebot an Nährstoffen und Sauerstoff versorgt und es zeigen nahezu alle Zellen einen Phänotyp mit uneingeschränkter Proliferation, da nekrotische Zellen im Allgemeinen beim Mediumwechsel entfernt werden [3, 6].

Die äußeren Schichten im Sphäroid bilden eine Permeabilitätsbarriere und behindern so den Durchtritt von Medikamenten ins Innere des Sphäroids [32]. Zusätzlich führt der hypoxische Zustand im Inneren zu einer veränderten Metabolisierung von Arzneistoffen [32] und kann die Aktivierung von Genen, die die Medikamentenresistenz von Tumorzellen erhöhen, bewirken [45]. Folglich

zeigt sich in dreidimensionalen Tumormodellen eine höhere Resistenz gegen Chemotherapeutika, die der *in-vivo*-Situation ähnlicher ist. Tumorzellen, die in 2D-Monolayer-Kulturen gezüchtet werden, zeichnen sich dagegen durch eine höhere Sensitivität aus [43, 46, 47].

Auch im Hinblick auf die Ausbildung von Zell-Zell- und Zell-EZM-Kontakten ergeben sich Unterschiede zwischen 2D- und 3D-Modellen. Im dreidimensionalen Modell lagern sich Zellen, die auf einer nicht-adhäsiven Unterlage gezüchtet werden, in einem ersten Schritt über Integrin-EZM-Kontakte spontan zu losen Zellaggregaten zusammen (s. Abb. 2.1 B) [15]. Danach findet die Hochregulierung von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen statt (z.B. E-Cadherin), und es entstehen zusammenhängende Zellaggregate [23]. Schließlich findet die Verdichtung und das Wachstum der Sphäroide statt [48]. E-Cadherin ist ein Calcium-abhängiges Transmembranprotein [49]. Über den β -Catenin-Komplex bindet E-Cadherin an das Aktin im Zytoskelett und in den meisten Fällen wird der Wnt-Signalweg in Gang gesetzt [50]. Erhöhte Wnt/ β -Catenin-Signalaktivität wiederum ist vergesellschaftet mit Tumorstammzelleigenschaften bei Brustkrebs [51]. Generell bedeutet der Verlust von E-Cadherin den Verlust von Zell-Zell-Kontakten und begünstigt damit die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und Invasivität von Tumorzellen; Therapeutika, die die E-Cadherin-Expression wiederherstellen, können deshalb Ansätze für die Medikamentenforschung liefern [49]. In 2D-Modellen hingegen wachsen die Zellen als Monolayer, exprimieren weniger E-Cadherin [49] und es bilden sich deutlich weniger Zell-Zell-Kontakte. Dafür entstehen Fokalkontakte, die die Verbindung zwischen den Zellen und ihrer Unterlage herstellen [52]. Diese Fokalkontakte bestehen aus Clustern von Transmembranproteinen, insbesondere Integrinen, sowie Signaltransduktionsmolekülen, z.B. *Focal Adhesion Kinase* (FAK) [53]. Fokalkontakte sind darüber hinaus ein zentrales Element in der Signalübertragung und der Übertragung von mechanischen Kräften zwischen Zellen und EZM [54]. Typischerweise bilden sich Integrin-vermittelte Kontakte unter 2D-Bedingungen nur auf einer Seite der Zelle, während sie im 3D-Modell rund um die Zelle zu finden sind [35].

Für die Abbildung einer *in-vivo*-ähnlichen Mikroumgebung spielen zusätzlich zur Rekapitulation der dreidimensionalen Anordnung die Interaktionen von Tumorzellen mit anderen gewebetypischen Zellen eine zentrale Rolle [10]. Heterotypische Zell-Zell-Kontakte zwischen Tumorzellen und nicht-malignen Zellen tragen erheblich zur Malignität von Tumoren bei [55]. Sie führen gegenüber homotypischen Zell-Zell-Kontakten zu veränderter Signalwirkung auf die Tumormikroumgebung [16], die u.a. zu Invasivität und Metastasierung beiträgt und die Medikamentenresistenz verstärkt [56]. Deshalb ist in den letzten Jahren das Interesse an 3D-Co-Kulturmodellen deutlich gestiegen, die zusätzlich zu Tumorzellen auch andere Zellen beinhalten, z.B. Stromazellen [57, 58]. Stromazellen sind die wichtigste Quelle für EZM-Bestandteile und stellen durch die Sekretion von löslichen Faktoren ein wichtiges Kommunikationsnetzwerk in der Tumormikroumgebung bereit [59, 60]. Die Tumorzellen interagieren mit diesen Bestandteilen der Mikroumgebung und beeinflussen sie ihrerseits [61]. Diese Aspekte können mithilfe der Co-Kultur von Tumor- und Stromazellen ebenfalls *in vitro* abgebildet werden [10, 60].

Zusammenfassend können insbesondere 3D-Co-Kulturmodelle die Komplexität von Tumoren deutlich besser wiedergeben als 2D-Modelle. Damit verbessern sie die Erkenntnisse, die über Tumorbiologie, Invasion, Metastasierung und für die Medikamentenforschung gewonnen werden können.

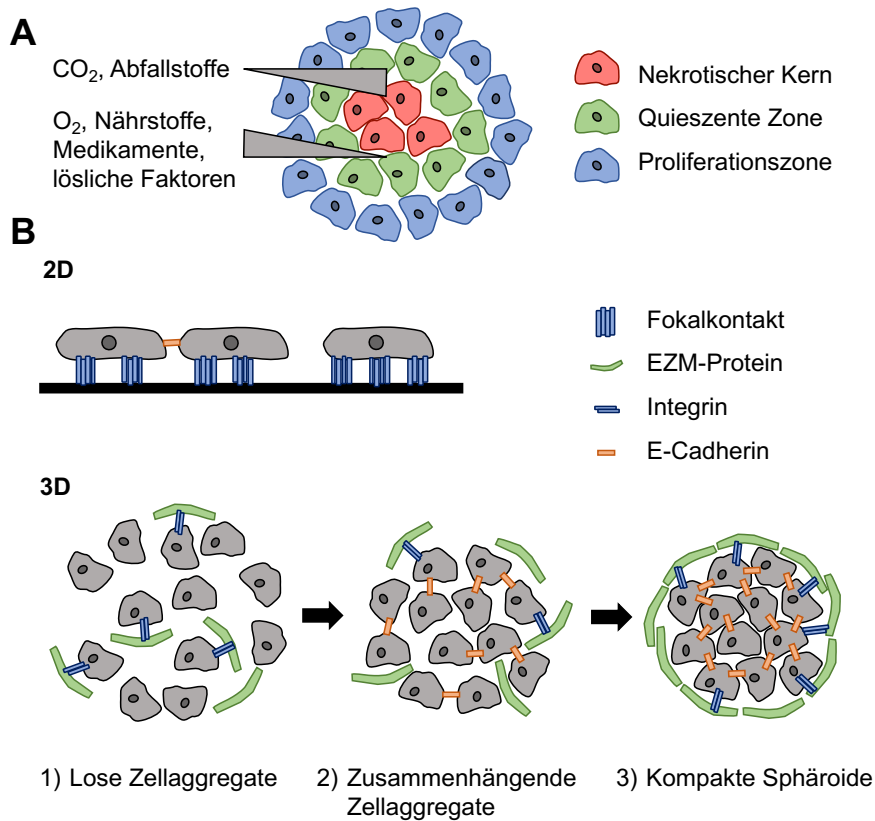


Abb. 2.1: Unterschiede in 2D- und 3D-*in-vitro*-Modellen

(A) 3D-Tumorsphäroide > 500 µm Durchmesser sind aufgebaut aus nekrotischem Kern, quieszenter Zone und Proliferationszone. CO₂ und Metabolite konzentrieren sich im Inneren. O₂, Nährstoffe, Medikamente und lösliche Faktoren erreichen kaum den nekrotischen Kern. Modifiziert nach [32], mit Genehmigung von Elsevier. (B) Zell-Zell- und Zell-EZM-Kontakte: Im 2D-Modell hauptsächlich Fokalkontakte mit der Unterlage. Im 3D-Modell erst Integrin-EZM-vermittelte-, dann E-Cadherin-vermittelte Aggregation. Später kompakte Sphäroide mit Zell-Zell- und Zell-EZM-Kontakten. Modifiziert nach [15] mit Genehmigung der Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

2.1.2 Techniken zur Herstellung von 3D-Tumorsphäroiden

Grundsätzlich unterscheidet man bei der Herstellung von 3D-*in-vitro*-Modellen Scaffold-basierte von Scaffold-freien Ansätzen. Im Zuge der Scaffold-basierten Methode werden entweder Zellen auf einer azellulären Matrix kultiviert oder die Zellen werden in einer flüssigen Matrix suspendiert, die später erstarrt bzw. polymerisiert wird [8]. Bei der Produktion von Scaffold-freien Modellen macht man sich zunutze, dass viele Zelltypen spontan zu Sphäroiden aggregieren,

wenn sie nicht auf einer Unterlage festwachsen können [6]. Um solide Tumoren *in-vivo*-ähnlich in 3D-Modellen abbilden zu können, wurden zahlreiche Techniken zur effektiven Herstellung entwickelt. Die wichtigsten werden im Folgenden erläutert.

Liquid-Overlay-Technik:

Bei dieser Technik wird die Unterlage, auf der die Zellen gezüchtet werden, mit Agarose [62] oder Polyhydroxyethylmethacrylat [63] beschichtet, sodass die Zellen nicht festwachsen können. In Medium aufgelöste Agarose bildet eine semisolide, nicht-adhäsive Oberfläche, die eine konkave Form im Well-Boden einnimmt [62]. Durch die nicht-adhäsiven Eigenschaften der Unterlage sind Zell-Zell-Interaktionen stärker als Wechselwirkungen zwischen Zellen und dem Well-Boden [23].

Das Beschichten der Well-Platten stellt zwar einen arbeitsaufwendigen Schritt dar und die Platten können nicht lange aufbewahrt werden, weil die Gefahr besteht, dass Wasser verdunstet [23]. Da normalerweise 96-Well-Platten für die Sphäroidkultur verwendet werden, zeichnet sich die Liquid-Overlay-Technik dennoch durch ihre vergleichsweise einfache Herstellungsart von Sphäroiden reproduzierbarer Größe aus [63, 64]. Die Sphäroide wachsen einzeln in ihren Wells und können leicht für weitere Analyse entnommen werden bzw. auch schon direkt im Well untersucht werden [62]. Werden Sphäroide unter statischen Kulturbedingungen gezüchtet, kann es zu Diffusionslimitationen von Sauerstoff und Nährstoffen aus dem Kulturmedium kommen und folglich zu einer Beeinträchtigung der Pathophysiologie. Um das zu verhindern, sollten die 96-Well-Platten auf einem Orbitalschüttler inkubiert werden, sofern die Zellen dafür geeignet sind [62, 65, 66]. Außerdem wird durch horizontale Bewegung eine stärkere Konzentration der Zellen in der Well-Mitte erreicht, sodass sich schneller und einfacher Zell-Zell-Kontakte ergeben und die Sphäroide bevorzugt eine gewünschte runde Morphologie annehmen [23].

Sogenannte ULA-Platten funktionieren nach dem gleichen Prinzip, machen den Beschichtungsschritt jedoch überflüssig, da die Well-Platten mit einer hydrophilen, nichtionischen Oberfläche beschichtet sind [33]. Dadurch stellen sie

eine sehr einfache Methode dar und durch die Verwendung von 96- oder 384-Well-Platten ist es möglich, sie in automatisierte Hochdurchsatz-Prozesse zu integrieren [32]. Die Sphäroidkultur auf ULA-Platten findet Anwendung in der Medikamentenforschung und kann für funktionelle Assays, z.B. Invasions- und Migrationsassays, verwendet werden [33]. Zwar beobachteten Vinci *et al.* für mehrere Zelllinien die Entstehung von gleichförmigen Sphäroiden innerhalb von 24-48 h [33]. Einiges deutet allerdings darauf hin, dass die Herstellung von Sphäroiden in ULA-Platten mit Schwierigkeiten verbunden ist und für viele Zelllinien (u.a. MDA-MB-231) gibt es noch keine funktionierenden Protokolle, um kompakte Sphäroide mit reproduzierbarer Größe zu erhalten [33, 62].

Hanging-Drop-Technik:

Bei der Hanging-Drop-Technik werden definierte Mengen an Zellsuspension auf die Unterseite des Deckels einer Well-Platte pipettiert (s. Abb. 2.2 A). Aufgrund der Oberflächenspannung werden die Tropfen beim Umdrehen des Deckels an ihrem Platz gehalten [15]. Durch die natürliche Disposition vieler Zellen zur Aggregation bilden sich an der freien Grenzfläche zwischen Flüssigkeit und Luft Sphäroide, die sehr konstant in Größe und Zellzahl sind [67]. Das Beschichten von Well-Platten wird überflüssig, jedoch müssen die Sphäroide umgesetzt werden, bevor weitere Analysen durchgeführt werden können [43]. Lange Kulturdauer ist mit dieser Technik nicht möglich, da die Menge an verfügbarem Medium limitiert ist. Die spätere Zugabe von Medium oder von Medikamenten zur Analyse gestaltet sich ebenfalls schwierig, weil die Gefahr besteht, die Sphäroide dabei zu zerstören [23]. Außerdem ist die Massenproduktion von Sphäroiden mit dieser Technik nur eingeschränkt möglich [15].

Spinner-Flask-Methode:

Bei dieser Methode werden in Kulturmedium suspendierte Zellen in einer speziell geformten Spinner-Flask, in deren Deckel ein Rührwerk eingebaut ist, unter ständiger Bewegung kultiviert (s. Abb. 2.2 B). Dadurch können die Zellen nicht an der Außenwand adhären, sondern formen Zell-Zell-Kontakte. Zudem wird ein konstantes Gas- und Nährstoffangebot für die Sphäroide erreicht [68]. Der Durchmesser kann variiert werden durch die Dichte der Zellsuspension, die

Zusammensetzung des Kulturmediums, die Drehzahl des Rührwerks und die Kulturdauer [15]. Allerdings aggregieren einige Zelltypen nur unter statischen Bedingungen zu Sphäroiden, sodass entweder die Zugabe von Trägermaterialien (sogenannte *micro carrier*) nötig wird [69]. Oder die Sphäroide werden anfangs mithilfe der Liquid-Overlay-Technik in 96-Well-Platten unter statischen Bedingungen gezüchtet und anschließend in die Spinner-Flask überführt [70]. Dadurch können auch Sphäroide homogener Größe erzielt werden.

Der Arbeitsaufwand ist bei der Spinner-Flask-Methode vergleichsweise hoch, insbesondere wenn die Sphäroide zur Durchführung verschiedener Assays einzeln in 96-Well-Platten übertragen werden müssen. Zwar können mit dieser relativ einfachen Methode viele Sphäroide auf einmal hergestellt werden, diese variieren jedoch häufig in Größe und Form. Hohe Scherkräfte durch die kontinuierliche Bewegung des Rührstabs beeinträchtigen darüber hinaus die Physiologie der Zellen.

Rotary Cell Culture Systems:

Diese Methode funktioniert nach den gleichen Prinzipien wie die Spinner-Flask-Technik, jedoch dreht sich hier kein Rührwerk im Inneren, sondern der Behälter (*Rotating Wall Vessel* - RWV) selbst rotiert (s. Abb. 2.2 C). Damit entstehen deutlich weniger Scherkräfte als beispielsweise während der Zellkultur in der Spinner-Flask [15].

Der RWV besteht aus einer mit Kulturmedium gefüllten Kammer, die entlang einer horizontalen Achse rotiert. Durch die konstante Bewegung der Flüssigkeit wird die Adhäsion der Zellen an der Gefäßwand verhindert [71]. Analog zur Spinner-Flask-Methode werden auch hier EZM-beschichtete *micro carrier* nötig, die von den Zellen als Scaffold zur Aggregation genutzt werden können [72]. Zu Beginn wird eine eher langsame Drehgeschwindigkeit verwendet, später kann sie erhöht werden, um auch große, schwere Sphäroide in Suspension zu halten [64].

Vor- und Nachteile gleichen im Wesentlichen denen bei der Spinner-Flask-Methode: Einfache Handhabung, hohe Ausbeute an Sphäroiden, Möglichkeit

einer langen Kulturdauer, homogene Kulturbedingungen und die Möglichkeit der Co-Kultur mehrerer Zelltypen [64, 71]. Lediglich in Bezug auf die Scherkräfte ist diese Methode deutlich der Spinner-Flask-Technik überlegen [71]. Größter Nachteil ist die Heterogenität der Sphäroide in Form und Größe, die eine manuelle Selektion bzw. die Vorabkultur der Sphäroide in 96-Well-Platten erforderlich macht [3].

Scaffold-basierte Kultur:

Um *in-vivo*-ähnliche 3D-Modelle herzustellen, können außerdem vorgefertigte Scaffolds verwendet werden (s. Abb. 2.2 D). Scaffolds bieten mechanische Unterstützung für das Zellwachstum und imitieren die umgebende EZM [3]. Sie enthalten Poren variabler Größe, um *in-vivo*-ähnliche Kulturbedingungen zu ermöglichen; Sauerstoff, Nährstoffe und Medikamente erhalten so Zugang zu den Zellen [73]. Wachsende und sich teilende Zellen füllen die Zwischenräume der Scaffolds aus und können sich an deren Fasern anheften. Dabei bilden sie dreidimensionale Strukturen [64]. Scaffolds bestehen entweder aus natürlichen Polymeren, z.B. Matrigel®, werden als Hydrogele aus Gelatine, Kollagen, Laminin oder Alginat hergestellt, oder sie werden aus synthetischen Materialien gebildet wie PLGA, Polyethylenglycol oder Polylactid [74].

Basierend auf der Erkenntnis, dass Brustkrebszellen in ihrer natürlichen Umgebung maßgeblich von der sie umgebenden Basalmembran und der darunterliegenden EZM beeinflusst werden, wurden zur *in-vivo*-ähnlichen Rekapitulation der 3D-Mikroumgebung Tumorzellen auf oder in EZM gezüchtet [6]. Bekanntestes Beispiel ist Matrigel® (BD Biosciences), das von Zellen der Sarkom-Zelllinie Engelbreth-Holm-Swarm stammende Basalmembran-Proteine (u.a. Kollagen IV, Laminin, Wachstumsfaktoren) von Mäusen enthält und kommerziell erhältlich ist [75].

Durch die Bereitstellung einiger essentieller Bestandteile der Mikroumgebung von Tumorzellen und die Modulation von Steifheit und Porengröße sowie chemischen Eigenschaften der Scaffolds können folglich 3D-Sphäroide generiert werden, die *in-vivo*-ähnliche dreidimensionale Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen wiedergeben [76].

Da mehrere Matrix-Systeme kommerziell erhältlich sind, die wiederum in einzelnen Bestandteilen flexibel variiert werden können, um spezielle Anforderungen zu erfüllen, findet diese Methode breite Anwendung und stellt gleichzeitig eine relativ einfach durchzuführende Technik zur Herstellung von 3D-Sphäroiden mit *in-vivo*-ähnlichen Eigenschaften dar [40]. Zu den wichtigsten Nachteilen der natürlichen Materialien zählen die große *Batch-to-Batch*-Variation und die fehlende Flexibilität von physikalischen Eigenschaften wie Steifheit und Architektur der Matrix. Synthetischen Materialien fehlen hingegen natürliche biochemische Voraussetzungen [34]. Zytotoxische Eigenschaften einiger synthetischer Werkstoffe und die hohen Kosten beeinflussen die Modellherstellung ebenfalls nachteilig [8]. Zudem kann die Sphäroidbildung durch externe Faktoren wie Materialartefakte beeinflusst werden [67]. Schließlich kann es zur ungewollten Überschneidung von Sphäroiden in Kultur kommen, insbesondere wenn die Zellen nicht homogen in der Matrix verteilt sind [77].

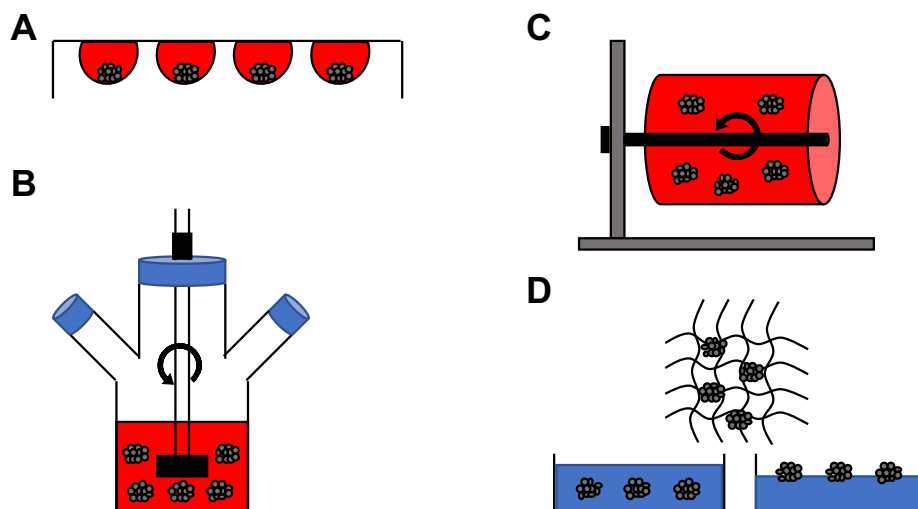


Abb. 2.2: Techniken zur Herstellung von 3D-Tumorsphäroiden (Auswahl)
(A) Hanging-Drop (B) Spinner-Flask (C) Rotary Cell Culture (D) Scaffold-basiert: Sphäroide in oder auf einer Matrix. Modifiziert nach [15], mit Genehmigung der Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

2.1.3 Neue Forschungsansätze

Obwohl die oben genannten 3D-Modelle deutlich mehr Aspekte *in-vivo*-ähnlich abbilden können als konventionelle 2D-Modelle, stellen unter anderem die exakte Rekapitulation der räumlichen Anordnung von Tumor- und Stromazellen, die

räumlich-zeitliche Verteilung von löslichen Faktoren sowie angiogene Prozesse nach wie vor zentrale Herausforderungen dar [78]. Durch die Kombination von Verfahren aus dem Bioengineering mit Materialien aus der 3D-Zellkultur wurden Modelle entwickelt, die einige dieser Einschränkungen überwinden können. Bekannteste Beispiele sind Mikrofluidik [79], Micro-Patterning [43], Micro-Molding [80] oder Bioprinting [81]. Zwar ist es in diesen Modellen möglich, physikalische (z.B. Steifheit der EZM), biochemische (z.B. lösliche Faktoren) [35] und angiogene Eigenschaften äußerst präzise zu justieren [22], gleichzeitig steigt mit der Komplexität der Modelle jedoch die Schwierigkeit, diese Parameter für die jeweiligen Zellen und die jeweilige Fragestellung richtig einzustellen. Daher bleibt es eine große Herausforderung, die Balance zwischen Komplexität und Zweckmäßigkeit in der Herstellung der Modelle zu halten [44, 82]. Das Design der Modelle ist bis heute wenig standardisiert und daher ungeeignet für das *High-Throughput-Screening* in der Medikamentenforschung [83].

Im Bereich der individualisierten Tumorthherapie wurden ebenfalls Ansätze zur Entwicklung von *in-vivo*-ähnlichen Modellen entwickelt. Yu *et al.* stellten aus im Blut zirkulierenden Tumorzellen von Patienten mit Estrogenrezeptor-positivem Brustkrebs mithilfe der Mikrofluidik-Technologie ein Tumormodell her, an dem sie patientenspezifische Mutationen untersuchten und die Effektivität von verschiedenen Medikamentenkombinationen testeten [84]. Weitere Untersuchungen in diese Richtung könnten in Zukunft einen wichtigen Beitrag zur Verbesserung der Tumorthherapie leisten.

2.2 Aufbau der gesunden Brust

Für eine adäquate Darstellung der bei Brustkrebs relevanten Umgebung und ihrer Veränderung im Zuge von Tumorinitiation, -progression, -invasion und Metastasierung im Modell ist es unabdingbar, den mikroskopischen und makroskopischen Aufbau der Brust zu kennen.

2.2.1 Histologischer Aufbau

Die Brustdrüse besteht aus 12-20 Läppchen, die jeweils eine Einzeldrüse darstellen [85]. Zwischen den Läppchen befindet sich ein straffes, Kollagen-I-

reiches Stroma, das u.a. Fibroblasten und Adipozyten beinhaltet [86, 87]. Das Lumen von Gängen und Endstücken (Azini) der Drüse wird von einem polar organisierten Drüsenepithel ausgekleidet, an das sich außen eine Schicht von Myoepithelzellen anschließt [6] (s. Abb. 2.3). Diese Myoepithelzellen werden von der Mikroumgebung durch eine Basalmembran getrennt [88]. Im invasiven Mammakarzinom verändert sich einerseits die Mikroumgebung und andererseits verliert die Basalmembran ihre Integrität durch den Verlust von Myoepithelzellen [6]. Folge ist der direkte Kontakt von Epithelzellen mit der pathologischen Tumormikroumgebung [6].

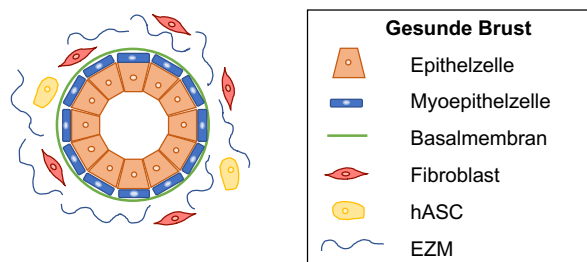


Abb. 2.3: Aufbau der gesunden Brust

Histologisch von innen nach außen: einschichtiges Epithel, Myoepithelzellen und Basalmembran. Im Stroma mesenchymale Stammzellen, Fibroblasten und EZM-Bestandteile. Modifiziert nach [89], mit Genehmigung von Elsevier.

2.2.2 EZM

Die EZM ist verantwortlich für mechanische Stabilität und vermittelt die Kommunikation der Zellen untereinander. In der Zellmembran sitzen bestimmte Proteine (Integrine), die die Zellen mit der EZM verbinden [12]. In einem Gewebe kommunizieren Zellen mechanisch über Adhäsionsverbindungen untereinander (über Desmosomen) und mit der EZM (über Hemidesmosomen und Fokalkontakte) [86]. Außerdem sind Rezeptoren, Hormone und andere lösliche Faktoren an der Kommunikation beteiligt [19]. Die EZM und Enzyme, die für Um- und Abbau der EZM verantwortlich sind, kommunizieren ebenfalls direkt oder über biochemische Signale mit Zellen des Gewebes. Umgekehrt reagiert die EZM auf Signale von Zellen. Diese „dynamische Reziprozität“ [90, 91] ist notwendig zur Bildung von funktionell organisierten Geweben und der Aufrechterhaltung des differenzierten Status [19].

Die EZM besteht aus einer hydratisierten Grundsubstanz, in der der Transport von Nährstoffen, Abbauprodukten, Gasen und Metaboliten erfolgt und aus Bindegewebsfasern. Die wichtigsten Komponenten der Grundsubstanz sind Glykoproteine, Hyaluronsäure und Proteoglykane (z.B. Aggrecan, Decoran) [92]; auf letztere wird im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen. Fibronektin und Kollagen I sind wichtige profibrotische Glykoproteine, die in der Pathologie von Brustkrebs eine zentrale Rolle spielen (s. Kapitel 2.4.1).

Fibronektin

Fibronektin als Bestandteil der EZM ist ein Glykoprotein, das von Fibroblasten gebildet wird, und befindet sich an der Zelloberfläche oder in der Matrix [93]. Es besteht aus zwei identischen Einzelkomponenten, die durch Disulfidbrücken verbunden sind [93]. Fibronektin wirkt als Bindeglied zwischen allen Strukturen im Extrazellulärraum: Es besitzt Brückenfunktion, denn viele andere Matrixbestandteile können an Bindungsstellen des Fibronektins binden, u.a. Kollagene. Zusätzlich wirkt Fibronektin als Adhäsionsmolekül für Zellen und beeinflusst damit Migration und Differenzierung der Zellen [94]. In der Tumorforschung dient Fibronektin als mesenchymaler Marker für die EMT (s. Kapitel 2.4.2) [95, 96].

Kollagene

Die Bindegewebsfasern der EZM bedingen die Struktur des Bindegewebes und lassen sich in kollagene Fasern und elastische Fasern unterteilen. Auf letztere soll im Folgenden nicht weiter eingegangen werden.

Kollagen trägt mit 25% erheblich zur Gesamtmasse an Proteinen im menschlichen Körper bei. Es ist sehr reißfest, aber kaum dehnbar. Kollagenmoleküle werden von Fibroblasten gebildet und bestehen aus drei Polypeptidketten, die man auch als α -Ketten bezeichnet [97]. Sie sind aus sich wiederholenden Motiven von Aminosäuren aufgebaut: Glycin-X-Y (X meistens Prolin und Y häufig Hydroxyprolin) [98]. Durch Wasserstoffbrückenbindungen bilden die α -Ketten eine spezielle Tripelhelix und werden als Tropokollagen bezeichnet [99]. Anschließend lagert sich das Tropokollagen zu Kollagenfibrillen zusammen [98, 99]. Abhängig von der Aminosäuresequenz der Ketten

unterscheidet man derzeit 28 verschiedene Typen. Sie werden unterteilt in fibrilläre Kollagene und nicht-fibrilläre Kollagene [98]. Zu den fibrillären Kollagenen gehört z.B. Kollagen Typ I [99].

Kollagen I ist das häufigste Kollagen der EZM und besteht aus sehr dicken Fibrillen. Shi *et al.* fanden heraus, dass die Entwicklung von Kollagen I eng mit der Bildung von Fibronectin verbunden ist: Kollagen-I-Fibrillen werden nur in einem stabilen Fibronectin-Netzwerk physiologisch vernetzt. Wird Fibronectin hingegen mangelhaft gebildet oder zu stark abgebaut, bricht auch das Kollagen-I-Netzwerk zusammen [100].

2.2.3 Stromazellen

Im Stroma der Brustdrüse finden sich u.a. folgende Zellen: Fibroblasten, Adipozyten, mesenchymale Stammzellen, Endothelzellen und Immunzellen [101]. Fibroblasten sind Stromazellen mesenchymalen Ursprungs, die viele Bestandteile der EZM (z.B. Kollagen I und Fibronectin s.o.) bilden und ein strukturelles Gleichgewicht im Gewebe aufrechterhalten [102]. hASCs sind mesenchymale Stammzellen des Fettgewebes und sind wichtig für Aufrechterhaltung und Regeneration des Fettgewebes [103].

Die EZM als Teil der gesunden Mikroumgebung von Zellen spielt eine bedeutende Rolle für die Physiologie eines Gewebes. Gleichzeitig ist eine veränderte Mikroumgebung wesentlich an pathologischen Prozessen wie Tumorgenese oder fibrotischen Krankheiten beteiligt [36]. Gegenstand des nächsten Kapitels sind die Grundprozesse der Tumorgenese und der Einfluss der Mikroumgebung auf die Tumorentwicklung und -progression.

2.3 Klinische Aspekte des Mammakarzinoms

Die häufigsten Tumoren der Brust sind Karzinome, das heißt sie entstehen aus Epithelzellen. Histologisch unterscheidet man Tumoren, die von den Ausführungsgängen ausgehen (duktale Karzinome), von denen, die im Drüsenläppchen entstehen (lobuläre Karzinome) [104]. Hat der Tumor die Basalmembran noch nicht durchbrochen, spricht man von einem *Carcinoma in situ*, ist ein Durchbruch in das umgebende Stroma erfolgt, handelt es sich um ein

invasives Karzinom [105]. Die invasiv-duktales Form ist mit etwa 80% der am häufigsten diagnostizierte Typ [106].

Die Tumorzellinvasion ist gleichzeitig der erste Schritt im Metastasierungsprozess und wird maßgeblich durch pathologische Veränderungen im Tumorstroma hervorgerufen [107]. Der Metastasierungsprozess umfasst folgende Schritte: Nachdem die Zellen die Basalmembran durchbrochen haben, migrieren sie durch das Stromale Gewebe bis in den Bereich der Blutgefäße. Dort intravasieren sie, werden im Blutstrom weitertransportiert, extravasieren und bilden schließlich in einer neuen Umgebung unter Umgehung der Immunreaktion des Körpers einen weiteren Tumor [34].

Es ist bekannt, dass Brustkrebs auf molekularer Ebene eine deutliche Heterogenität zeigt [108]. Um bessere Vorhersagen über Prognose und insbesondere über Therapiemöglichkeiten der einzelnen Subtypen machen zu können, werden Marker wie der Estrogenrezeptor (ER), der Progesteronrezeptor (PR) sowie HER2/Neu herangezogen [109]. Die in dieser Arbeit verwendete MDA-MB-231-Brustkrebs-Zelllinie gehört zur Gruppe des *Triple-Negative Breast Cancer* (TNBC). Sie ist gekennzeichnet durch das Fehlen von ER, PR und HER2/Neu [110]. Erkenntnisse über die Tumorerogenität und insbesondere die Einteilung in Subtypen haben zu deutlichen Verbesserungen im Bereich der zielgerichteten Krebstherapie geführt. Beispielsweise zeigen Hormontherapien gegen HER2/Neu⁺- [111] und ER⁺-Brustkrebs sehr gute Wirksamkeit und haben die Prognose dieser Subtypen deutlich verbessert [112]. Jedoch bildet die Einteilung der Brustkrebs-Subtypen nach Rezeptorstatus bei Weitem nicht die gesamte Masse der Tumoren ab; jeder Krebs hat nach neuesten Erkenntnissen seinen eigenen „Fingerabdruck“ und bedarf entsprechend zugeschnittener Therapie [113]. Gegenstand weiterer Forschung wird in Zukunft folglich die Entwicklung solcher patientenindividueller Therapiestrategien sein [114].

Mutationen entstehen im Lauf des Lebens häufig aufgrund von exogenen (z.B. radioaktive Strahlung) oder endogenen (z.B. oxidative Schäden) Faktoren [19]. Einzelne Mutationen sind dabei häufig harmlos und bilden keine klinisch

manifesten Tumoren, da DNA-Reparaturmechanismen und zelluläre Kontrollmechanismen weitere Mutationen verhindern [19]. Kommt es allerdings zur Anhäufung von Mutationen in Tumorsuppressorgenen oder Onkogenen, also Genen, die eine wichtige Rolle in der Unterdrückung oder der Förderung von Zellwachstum oder -überleben spielen, können gesunde Zellen zu Tumorzellen transformiert werden [115] und so die Tumorumgebung bewirken [34]. Zum Beispiel helfen Mutationen, die das Tumorsuppressorgen p53 inaktivieren oder das Proto-Onkogen ras aktivieren, den mutierten Zellen dabei, normale zelluläre Kontrollmechanismen zu umgehen, die u.a. für die Regulierung des Zellzyklus und der Apoptose zuständig sind [116].

Man hat herausgefunden, dass eine deutlich größere Anzahl an Tumoren im menschlichen Körper vorhanden ist als tatsächlich klinisch manifest wird [117]. Bei 39% der Frauen zwischen 40 und 50, die keine klinischen Anzeichen von Krebs zeigten, wurden *in-Situ-Karzinome* in der Brust gefunden [118]. Zwischen 0,3 und 1,0% aller Mammakarzinome sind okkult, das heißt dass klinisch nur Metastasen im Bereich des Lymphabstromgebietes festzustellen waren, während der Primärtumor in der Brust auch nach sorgfältiger Untersuchung nicht gefunden werden konnte [119]. Bei weitem nicht alle mutierten Zellen resultieren in einer manifesten Krebserkrankung. Erbliche Tumoren wie z.B. BRCA1 führen dazu, dass Mutationen in allen Zellen des Körpers vorhanden sind. Es entsteht aber nicht überall Krebs, sondern die Mutation ist nur gewebespezifisch in der Brustdrüse und in den Ovarien tumorigen [120, 121].

Folglich muss es nach dem Auftreten einer Mutation Möglichkeiten für den Körper geben, durch protektive Reaktionen den Tumor in Schach zu halten und eine maligne Transformation zu verhindern [19]. Welche genauen Mechanismen dahinterstehen, ist bis heute nicht abschließend geklärt. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die Tumormikroumgebung eine wichtige Rolle bei diesen Prozessen spielt und so lange eine tumorsuppressive Wirkung hat, wie normale Gewebemöostase und -architektur vorhanden sind [122]. Sobald die reguläre Gewebemöostase verloren geht (veränderte EZM, CAFs, Fibrose, Entzündung, Wachstumsfaktoren, etc.), spielt die Mikroumgebung hingegen eine zentrale Rolle in der Tumorumgebung [44, 123]. Ebenso können auch physiologische,

homöostatische Prozesse (z.B. Wundheilung) den Schritt zur malignen Transformation verursachen [19]. Die Mikroumgebung hat zudem großen Einfluss auf die Invasivität des Tumors: Wenn die Integrität der Basalmembran z.B. durch pathologisch verstärktes Auftreten von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) im Kontext von Tumoren verletzt wird, führt das zu direktem Kontakt zwischen Tumorzellen und Stroma [124]. Folgen sind Veränderungen im Stroma wie etwa vermehrte Kollagenproduktion [34], Vaskularisation, Einwanderung von Entzündungszellen und intensiver Umbau der EZM [124].

Das aktuelle Verständnis der Tumorbilogie geht weit über die ursprüngliche Vorstellung, dass für die Entstehung von Krebs bestimmte Mutationen verantwortlich seien und dass aus jeder dieser Mutationen ein Tumor resultiere, hinaus [115]. Es herrscht heutzutage vielmehr breiter Konsens, dass die Tumormikroumgebung und darin speziell die EZM deutlich größeren Einfluss auf die Malignität von Tumoren haben als der Genotyp der Tumorzellen [122]. Im folgenden Kapitel soll daher auf die Eigenschaften dieser Tumormikroumgebung sowie ihre tumorsuppressive und tumorfördernde Wirkung eingegangen werden.

2.4 Die Tumormikroumgebung

Zwar ist Krebs eine genetische Erkrankung, bei der die Transformation von Zellen unabdingbare Voraussetzung ist [16]. Wie im letzten Kapitel erläutert, ist die Tumormikroumgebung durch ihre mechanischen und biochemischen Eigenschaften dennoch ein wichtiger Einflussfaktor für Tumorentstehung, Invasion und Metastasierung und damit auch für die Prognose des Patienten [125, 126]. De Kruijf *et al.* zeigten, dass die Menge an Stroma im Primärtumor einen bedeutenden prognostischen Faktor darstellt: Je größer das Verhältnis Stroma/Tumor, desto schlechter die Prognose für den Patienten [114].

Die Tumormikroumgebung von Brustkrebs besteht aus Fibroblasten, Endothelzellen, Immunzellen, mesenchymalen Stammzellen, Adipozyten sowie Blut- und Lymphgefäßen, biochemischen Signalstoffen und der EZM [19, 127] (s. Abb. 2.4). Die nicht-malignen Zellen der Mikroumgebung haben dynamische und häufig tumorfördernde Funktionen in allen Stadien der Tumorgenese [115]. Die interzelluläre Kommunikation erfolgt maßgeblich durch ein komplexes und

dynamisches Netzwerk aus Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Enzymen [127].

Das Verständnis der Tumormikroumgebung ist nicht nur wichtig für das Verständnis der Tumorbiologie und deren Prozesse, sondern hat auch direkte klinische Relevanz: Neue Forschungsansätze für Medikamente, die gegen die nicht-malignen Zellen der Tumormikroumgebung gerichtet sind, könnten in Zukunft wichtige Beiträge als Komedikation zu konventionellen Therapieformen leisten [127].

2.4.1 *EZM*

Eine fibrotisch veränderte Brust birgt ein deutlich vergrößertes Risiko einer malignen Entartung [126]. Erhöhte Gewebedichte entsteht durch die verstärkte Ablagerung von Zellen im Stroma und von EZM-Komponenten – insbesondere von Fibronectin und Kollagen I [76, 128]. Zudem findet mehr Kollagen-Crosslinking durch Lysyloxidase-Aktivität statt. Diese Faktoren führen letzten Endes zu einer Versteifung des Brustgewebes [129].

Die übersteigerte fibrotische Veränderung des Stromas wird auch Desmoplasie genannt [130]. Folgen dieser Desmoplasie sind u.a. Tumorwachstum, Invasion, Metastasierung [131] und schlechtere Prognose [132]. Diese wichtige Erkenntnis hat direkte klinische Relevanz: Im Zuge des Brustkrebs-Screenings wird die so veränderte EZM durch Palpation und Mammographie untersucht. Tastbare Knoten bzw. Verschattungen im Röntgenbild gelten dabei als Risikofaktor für Brustkrebs [126].

Allein die verstärkte Anwesenheit von Fibronectin bei Brustkrebs beeinflusst erwiesenermaßen verschiedene Schritte der Tumorgenese – insbesondere Tumorwachstum, Invasion, Metastasierung – und ist mit einer schlechteren Prognose verbunden [133]. Entfernte Regionen im Körper bieten im Blut zirkulierenden Tumorzellen durch ein verändertes Stroma mit erhöhter Fibronectin-Menge eine bevorzugte Nische für die Metastasierung [89]. Das pathologische Vorkommen von Fibronectin im Tumor hat zudem maßgeblichen Anteil an der Therapieresistenz von Tumoren. Neue Medikamente, die allein gegen Fibronectin oder gegen von Fibronectin aktivierte zelluläre Signalwege

gerichtet sind, versprechen neue Ansätze für die Erforschung ergänzender Tumorthérapien [134].

2.4.2 Stromazellen

In der Entwicklung sowohl von fibrotischen Erkrankungen als auch von Tumoren spielen Myofibroblasten eine zentrale Rolle [135]. Myofibroblasten sind schon lange als spindelförmige, differenzierte Fibroblasten bekannt, die als Bestandteil des Granulationsgewebes bei der sekundären Wundheilung das Gewebe kontrahieren und damit die Epithelgrenzen einander annähern [135]. Ist die Integrität des Gewebes wiederhergestellt, sterben die Myofibroblasten durch Apoptose ab und das Granulationsgewebe wandelt sich in ein zellarmes Narbengewebe um [136]. Unter pathologischen Bedingungen persistiert die Aktivität der Myofibroblasten jedoch und es kommt zur Akkumulation einer fibrotischen, kollagenreichen EZM, deren Abbau verhindert wird [137]. Daraus resultieren hypertrophe Narbenbildung [138] bzw. Fibrose von Organen [139].

Dieser fibrotische, myofibroblastenreiche Kontext zerstört die Polarität epithelialer Gewebe, stimuliert die Zellproliferation, verstärkt Entzündung und Angiogenese und vereinfacht damit Tumorentstehung und -entwicklung [140]. Da Entzündungsprozesse und chronische Gewebeirritationen eine Mikroumgebung schaffen, die die Tumorentstehung begünstigt sowie die Tumorentwicklung fördert, zielen neue Forschungsansätze auf die Entwicklung antientzündlicher Therapien ab, die gegen bestimmte Tumoren Wirkung zeigen könnten [17, 141, 142].

Im Rahmen maligner Prozesse sind morphologisch sehr ähnliche Myofibroblasten, auch *Cancer Associated Fibroblasts* (CAFs) genannt, ebenfalls in großer Zahl im reaktiven Tumorstroma vorhanden [143]. CAFs aktivieren Wachstumsfaktoren, Zytokine, MMPs und andere EZM-umbauende Enzyme und induzieren damit die fibrotische Umwandlung des Tumorstromas – insbesondere durch die überschießende Synthese von Fibronectin und Kollagen I [144, 145]. Damit tragen sie maßgeblich zur Tumorentwicklung und -progression bei [143].

Im Gegensatz zu normalen Fibroblasten ist im Zytoskelett der Myofibroblasten charakteristischerweise die *Alpha-Smooth-Muscle-Actin* (α -SMA)-Isoform zu

finden. Sie ist eine von sechs bis heute bekannten Isoformen von Aktin und wird auch Alpha-Actin-2 genannt [128]. Aktinfilamente sind wesentliche Bestandteile des Zytoskeletts von eukaryonten Zellen und sind dort für die Form und die Beweglichkeit der Zelle verantwortlich [146]. Physiologischerweise kommt α -SMA fast ausschließlich in glatter Muskulatur in der Wand von Blutgefäßen vor [147]. Dort ist es an der Steuerung der Gefäßkontraktilität und des Blutdrucks beteiligt [148].

In den CAFs sind an das α -SMA kontraktile Proteine angelagert wie das *non-muscle-Myosin* [128]. Auf der Zelloberfläche enden die Aktinbündel in einem speziellen Adhäsionskomplex, dem sogenannten Fibronexus, an den wiederum extrazelluläres Fibronectin bindet [149]. Über dieses Mechanotransduktionssystem kann die Kontraktilität der Myofibroblasten auf die umgebende EZM übertragen werden und es kommt zu einer Kontraktion des Gewebes [150]. Der Nachweis der spezifischen α -SMA-Isoform dient in der Tumorforschung als wichtiger Myofibroblastenmarker. Hinz *et al.* fanden heraus, dass die Expression von α -SMA direkt mit den kontraktile Kräften der Myofibroblasten auf die EZM korreliert [137]. Daraus lässt sich außerdem erklären, dass Brustkrebspatientinnen mit einem erhöhten Nachweis von α -SMA eine schlechtere Prognose haben als Patientinnen mit normalem α -SMA-Level [151].

Durch die Induktion von Fibrose und die Kontraktion der EZM tragen CAFs zu einem erhöhten interstitiellen Flüssigkeitsdruck in soliden Tumoren bei [152]. Dieser Druck behindert den Durchtritt von Stoffen aus zuführenden Blutgefäßen, sodass Chemotherapeutika schwieriger an ihren Wirkort im Tumor gelangen können. Neue medikamentöse Ansätze, die gegen Myofibroblasten gerichtet sind, zielen darauf ab, die Verfügbarkeit von klassischen Anti-Tumormedikamenten am Wirkort zu verbessern und damit die Effektivität von konventionellen Chemotherapeutika zu erhöhen [153].

Myofibroblasten können aus verschiedenen Vorläufern entstehen. Zum einen aus „normalen“ stromalen Fibroblasten [128]: Bei einer Verletzung von Gewebe differenzieren Fibroblasten zu Myofibroblasten, sofern bestimmte parakrine

Signale vorhanden sind [127]. Im malignen Kontext von Tumoren scheint eine vorhandene mechanische Spannung im Gewebe [128] oder die Transformation epithelialer Zellen in der Nachbarschaft [143] in Kombination mit bestimmten Wachstumsfaktoren aus der Tumormikroumgebung für die Umwandlung von Fibroblasten in Myofibroblasten Voraussetzung zu sein. Der wichtigste bekannte Signalstoff für die Entstehung der α -SMA-Isoform ist dabei TGF- β [154]. Die nachfolgend erhöhte mechanische Spannung in der EZM bewirkt im Sinne einer positiven Rückkopplung ihrerseits wieder eine erhöhte TGF- β -Produktion und verstärkte α -SMA-Expression [128]. Die Expression von α -SMA wird außerdem durch Hormone, Zellproliferation und durch pathologische Prozesse wie Arteriosklerose beeinflusst [155].

Außerdem ist bekannt, dass Myofibroblasten durch Transdifferenzierung aus Epithelzellen entstehen können [156]. Dies geschieht im Zuge der sogenannten *Epithelial to Mesenchymal Transition* (EMT), also der Umwandlung von Epithelzellen in mesenchymale Zellen. Durch den Verlust von E-Cadherin verlieren die Epithelzellen ihre Polarität und es entstehen spindelförmige, bewegliche mesenchymale Zellen, die als Einzelzellen umgebendes Gewebe invadieren können [157]. EMT fördert die Invasion und Metastasierung von Tumoren und bedingt folglich eine schlechtere Prognose des Patienten [34]. Es ist bekannt, dass durch den Signalstoff TGF- β die EMT in Tumorzellen gefördert wird, sodass diese die Tumormikroumgebung infiltrieren und schlussendlich entfernte Metastasen bilden können [158]. Der Prozess wird durch die Anwesenheit von Fibronectin noch zusätzlich verstärkt [95]. Jedoch ist der Zustand nicht irreversibel; durch mesenchymal-epitheliale Transition können Tumorzellen nach ihrer Invasion wieder epithelialen Charakter annehmen, der sie dazu befähigt, zu proliferieren und einen neuen Tumor bzw. eine Metastase an dieser Stelle zu bilden [159].

Schließlich entstehen Myofibroblasten im malignen Kontext zu großen Teilen aus mesenchymalen Stammzellen [160], z.B. aus hASCs bei Brustkrebs [130]. Als Antwort auf lösliche Faktoren, die von Tumorzellen sezerniert werden, nehmen hASCs einen veränderten Phänotyp an, der die Differenzierung von hASCs in CAFs verstärkt [20]. Jotzu *et al.* fanden heraus, dass diese Differenzierung von

hASCs in Myofibroblasten ebenfalls hauptsächlich TGF- β -abhängig ist [161]. Durch die vermehrte Anzahl an Myofibroblasten sind hASCs somit auch an der Ausbildung einer Fibronectin- und Kollagen-I-reichen EZM beteiligt [20]. Die dadurch bedingte erhöhte Steifigkeit des Gewebes verstärkt wiederum die pathologische Veränderung im hASC-Phänotyp [162]. Im Zuge von Adipositas, einem bedeutenden Risikofaktor für Brustkrebs, kommt es ebenfalls zu vermehrter Fibrose und erhöhter Differenzierung von hASCs in Myofibroblasten [163, 164]. Schließlich verstärken hASCs im malignen Kontext Tumorstammzeleigenschaften (s. Kapitel 2.5) und tragen auch damit zur Aggressivität des Tumors bei [165].

2.4.3 Einfluss löslicher Faktoren

Durch die Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren beeinflussen CAFs die Tumorprogression zusätzlich [135]. Auch Tumorzellen sezernieren lösliche Faktoren in die Mikroumgebung, die maßgeblich Einfluss auf die Tumorentwicklung haben. Welche genauen molekularen Mechanismen dabei zum Tragen kommen, ist aber bis heute nicht abschließend geklärt. Gegenstand vieler Untersuchungen war in diesem Zusammenhang der TGF- β -Signalweg, der eine bedeutende Rolle in der Beeinflussung von Tumoreigenschaften spielt [166]. Sowohl tumorfördernde als auch tumorinhibierende Eigenschaften von TGF- β sind bekannt [167]. Physiologischerweise ist TGF- β beim Erwachsenen an der Aufrechterhaltung von Gewebhomeostase beteiligt und reguliert während der Embryonalentwicklung u.a. Zellproliferation, -migration und -differenzierung [168]. Jovanović *et al.* fanden heraus, dass der TGF- β -Typ-III-Rezeptor im Tumorstroma deutlich weniger exprimiert wird als im gesunden Brustgewebe [7]. Der Verlust der TGF- β -Empfindlichkeit von Fibroblasten wiederum erhöht die Wahrscheinlichkeit von Neoplasien in benachbarten Epithelien und fördert das Wachstum von Epithelzellen [166]. Außerdem bewirkt der Verlust eine verstärkte Sekretion von Chemokinen und damit verbunden erhöhte Tumorprogression und Invasivität [167]. Durch die Aktivierung von CAFs unter dem Einfluss von TGF- β wird die Expression sowohl von α -SMA als auch von Kollagen I und Fibronectin

von TGF- β gesteuert und ist damit auch an Kontraktion und Steifheit der EZM beteiligt [27, 128].

Auch wird das pro-angiogenetische IL-8 von Tumorzellen und CAFs in die Mikroumgebung sezerniert [169] und verstärkt die Differenzierung von hASCs in Myofibroblasten [20].

Als Reaktion auf lösliche Faktoren von Tumorzellen sowie auf erhöhte Steifheit der EZM findet zudem eine erhöhte Sekretion von *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) aus Myofibroblasten statt, das die Angiogenese im Tumor verstärkt [170]. Der gegen VEGF gerichtete monoklonale Antikörper Bevacizumab wird als Begleitmedikation in der Therapie von Brustkrebs eingesetzt, um die Gefäßneubildung zu hemmen [171].

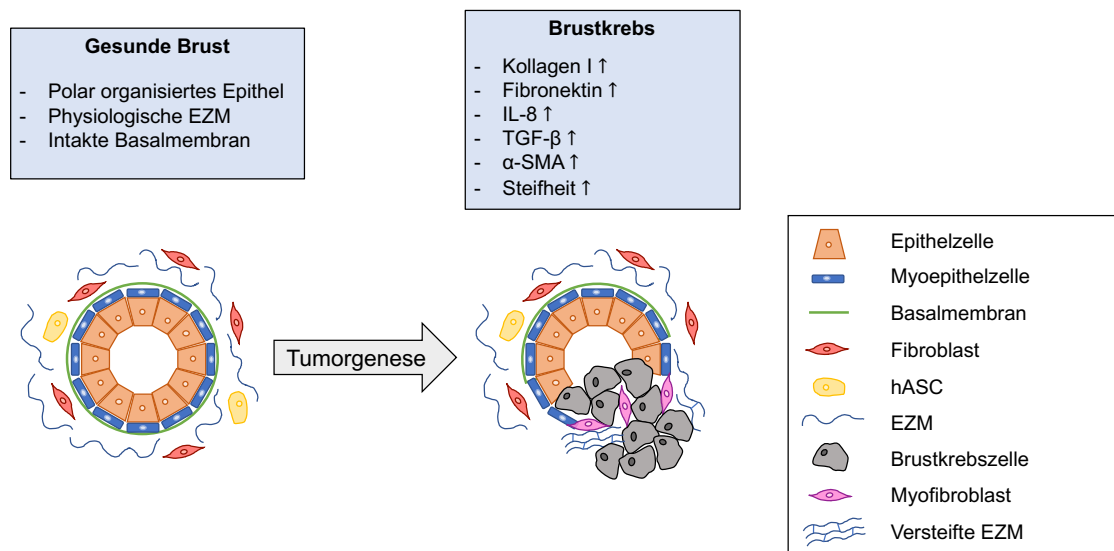


Abb. 2.4: Veränderungen der Mikroumgebung bei Brustkrebs

Myofibroblasten und vermehrte Expression bestimmter löslicher Faktoren im Tumorstroma führen zur Ausbildung einer fibrotischen EZM mit erhöhten Mengen an Kollagen I und Fibronektin. Modifiziert nach [89], mit Genehmigung von Elsevier.

Die Mikroumgebung hat zusammenfassend einen großen Einfluss im gesunden Gewebe wie auch bei pathologischen Prozessen. Ohne eine adäquate Wiedergabe der Mikroumgebung in *in-vitro*-Modellen gehen wichtige

Informationen im Tumorkontext verloren. Folglich ist es notwendig, diesen Aspekt im 3D-Tumormodell kritisch zu überprüfen.

2.5 Tumorstammzellen und ihr Einfluss auf das Mammarkarzinom

Nicht nur zwischen den einzelnen Brustkrebs-Subtypen herrscht eine deutliche Variabilität vor. Auch eine intratumorale genetische Heterogenität ist in vielen Fällen bekannt [6]: Nach dem gängigen Tumorstammzellmodell besteht das Tumorgewebe hauptsächlich aus differenzierten Tumorzellen sowie aus einer kleinen Subpopulation von Tumorstammzellen (*cancer stem cells* – CSCs). Es sind zwei Theorien bekannt, wie Tumorstammzellen entstehen können: Einerseits aufgrund von Mutationen aus normalen Stammzellen des betroffenen Gewebes, andererseits aus differenzierten Zellen, die Stammzeleigenschaften „zurück“erhalten [172].

Die CSCs zeigen in funktioneller Hinsicht ähnliche Eigenschaften wie embryonale Stammzellen: Sie besitzen die Fähigkeit zum Self-renewal und haben ein hohes Differenzierungs- und Proliferationspotential [173]. Sie sind dazu in der Lage, in immunsupprimierten Mäusen die Tumorbildung zu initiieren und ermöglichen die Differenzierung von Krebszellen während der Tumorgenese [172]. CSCs tragen außerdem zum Wachstum sowie zur Aufrechterhaltung des Tumors bei. Sie erhöhen die Invasivität, sind am Metastasierungsprozess maßgeblich beteiligt [172] und bedingen insgesamt eine erhöhte Aggressivität und schlechtere Prognose von Tumoren [174]. Dadurch sind sie meist mitverantwortlich für die Therapieresistenz [175, 176], denn Tumorstammzellen sind häufig quieszent und haben einen selektiven Vorteil gegenüber differenzierten Tumorzellen, sodass CSCs nach Chemotherapie bzw. chirurgischer Therapie häufig im Körper verbleiben [177]. Durch ihre alleinige Fähigkeit zur Tumorentwicklung sind residuale Stammzellen dann in der Lage, neue Tumoren zu bilden und führen zu Rezidiven bzw. Zweittumoren [43, 178].

Entsprechend der histologischen Subtypen ergeben sich Unterschiede im Vorkommen von CSCs. Aggressive Subtypen wie TNBC haben einen höheren Anteil an CSCs als weniger aggressive, hormonrezeptorpositive Subtypen [179].

Deshalb und aufgrund der Tatsache, dass im Fall von TNBC die Chemotherapie wegen der fehlenden Möglichkeit zur Hormontherapie die hauptsächliche Therapieform ist [110], stellen Tumorstammzellen ein zentrales Therapieziel dar [180].

Es gibt erste Forschungsansätze zur Entwicklung gezielter Therapien, die spezifisch gegen CSCs gerichtet sind und auch einzelne ausgewanderte (in die Umgebung, Blut- oder Lymphbahnen) Stammzellen abtöten, gesunde Zellen jedoch verschonen [178, 181]. Die Elimination von Tumorstammzellen kann grundsätzlich über die Induktion von Differenzierung oder das Verhindern des Self-renewal erfolgen. Zudem bieten Resistenzmechanismen der CSCs ein bedeutendes Ziel für die Tumortherapie [182]. Die Stimulierung von *Bone Morphogenetic Protein 4*, einem Zytokin im TGF- β -Signalweg, führte im Mausmodell zu einer verstärkten Differenzierung und infolgedessen erhöhten Sensitivität von Kolonkarzinom-Stammzellen gegenüber konventionellen Chemotherapeutika [183]. Ein wichtiger Signalweg in der Regulierung des Self-Renewal sowohl von gesunden als auch von malignen Stammzellen der Brustdrüse ist u.a. der Hedgehog-Signalweg [28]. Dieser Signalweg ist allerdings nur mit Vorsicht als Therapieziel geeignet, da auch gesunde Zellen beeinträchtigt werden können [182]. Gegen das fortgeschrittene Basalzellkarzinom wurde dennoch 2012 in den USA der Hedgehog-Inhibitor Vismodegib zugelassen und es befinden sich zahlreiche weitere Hedgehog-Inhibitoren gegen verschiedene Tumorarten in der klinischen Untersuchung [184]. Resistenzen von Tumorstammzellen ergeben sich häufig durch deregulierte Apoptose-Signalwege. So findet in CSCs beispielsweise eine Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 statt, sodass der Bcl-2-Inhibitor ABT-737 das Vorkommen von CSCs u.a. bei Brustkrebs reduzieren konnte [182].

Welche genauen Mechanismen die Umwandlung von normalen Tumorzellen hin zum aggressiven CSC-Phänotyp regulieren, ist bis heute nicht abschließend geklärt. Insbesondere das Zusammenspiel einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren wie SOX-2, OCT-4 und NANOG wurde als zentraler Bestandteil in der Ausbildung von Tumorstammzeleigenschaften identifiziert [185]. Diese Transkriptionsfaktoren macht man sich deshalb in der

Tumorforschung als Stammzellmarker für den Nachweis von CSCs zunutze [186]. NANOG ist ein Transkriptionsfaktor, der zur Gruppe der DNA-bindenden Homöobox-Proteine gehört [186] und wurde in der vorliegenden Arbeit als Marker für das Vorhandensein von CSCs im etablierten 3D-Tumormodell verwendet. Er ist wesentlich an der Aufrechterhaltung von Pluripotenz und Selbsterneuerung von humanen embryonalen Stammzellen beteiligt [187]. NANOG-mRNA kommt in menschlichen pluripotenten Stammzellen vor (und ist auch dort für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz mit verantwortlich) und in Tumorstammzellen, nicht aber in differenzierten Zellen [188, 189]. Eine Überexpression von NANOG bewirkt, dass embryonale Stammzellen in Zellkultur ihre Pluripotenz auch nach mehreren Passagen nicht verlieren [190]. Neue Studien haben gezeigt, dass NANOG im Mammakarzinom wesentlich stärker exprimiert wird als im gesunden Gewebe. Das Vorhandensein hoher NANOG-Spiegel korreliert deutlich mit aggressivem Tumorverlauf und schlechterer Prognose für den Patienten [191], es fördert Tumorprogression und Metastasierungswahrscheinlichkeit [187]. Zudem wurde eine Resistenz gegen Hormon- und Chemotherapien bei verstärkter Anwesenheit von NANOG festgestellt [189].

Asiedu *et al.* zeigten außerdem, dass die Anwesenheit von bestimmten löslichen Faktoren (TGF- β und TNF- α) Brustkrebszellen über den Weg der EMT (s. Kapitel 2.4.2) dazu veranlasst, Stammzeleigenschaften anzunehmen [175]. Auch Adipsin, ein Adipokin, das von Adipozyten und hASCs in die Tumormikroumgebung sezerniert wird, trägt zur Entstehung des CSC-Phänotyps bei [165]. Es ist zudem bekannt, dass Kollagen Typ I über die Aktivierung des Signaltransduktionsmoleküls FAK die Häufigkeit von Tumorstammzellen im Pankreaskarzinom erhöht [192]. Außerdem führt die bei Brustkrebs charakteristischerweise erhöhte Gewebesteifigkeit dazu, dass die CSCs ihre Fähigkeit zum Self-renewal und zur Tumorinitiation beibehalten [193]. Versican G3, das bei Brustkrebs überexprimiert wird, verstärkt das Self-Renewal und begünstigt infolgedessen Tumorstammzeleigenschaften [194]. Zwar gibt es zahlreiche weitere Anhaltspunkte zur Regulation von CSCs durch lösliche Faktoren und intrazelluläre Signalwege [195-197], die Rolle der EZM in der Steuerung des Tumorstammzell-Phänotyps wurde jedoch bisher wenig

untersucht [198]. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb ein 3D-Mikrotumormodell etabliert werden, das es ermöglicht, diesen Einfluss der EZM auf Tumorstammzeleigenschaften und damit auf die Tumoraggressivität *in vitro* untersuchen zu können.

3 Ziel der Arbeit

Tumorzellen, Stromazellen, EZM und lösliche Faktoren in der Tumormikroumgebung beeinflussen und verstärken sich gegenseitig in der Ausbildung eines malignen Phänotyps. Sowohl die fibrotische EZM als auch eine kleine Subpopulation von pluripotenten Tumorstammzellen sind bekanntermaßen für die Steigerung der Tumoraggressivität verantwortlich. Inwiefern diese beiden unabhängigen Faktoren im Kontext von Brustkrebs miteinander in Beziehung stehen, ist jedoch bis heute unklar.

Um untersuchen zu können, welchen Beitrag Tumorzellen, Stromazellen, EZM und lösliche Faktoren einzeln und im Zusammenspiel zur Malignität eines Tumors leisten, ist die Entwicklung geeigneter *in-vitro*-Modelle unabdingbar. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, ein 3D-Mikrotumormodell zu generieren, in dem eine Analyse dieser genannten Faktoren stattfinden könnte. An diesem Modell wurden darüber hinaus erste Untersuchungen von im Tumorkontext bekannten EZM-Proteinen durchgeführt. Um die dreidimensionale Anordnung von Tumorzellen und ihrer Gewebeumgebung adäquat wiedergeben zu können, beinhalteten die 3D-Tumorsphäroide sowohl Brustkrebszellen (MDA-MB-231) als auch Stromazellen (hASCs).

Die EZM als wichtiger Bestandteil der (Tumor-) Mikroumgebung sollte übersichtshalber durch H.E.-Färbung und detaillierter durch immunhistochemische Analyse nach zwei verschiedenen Kulturzeitpunkten charakterisiert werden, um EZM-Veränderungen im zeitlichen Verlauf darzustellen. Im Fokus der Analyse standen die beiden wichtigsten profibrotischen EZM-Proteine Fibronectin und Kollagen I, die maßgeblich an der Pathogenese von Brustkrebs beteiligt sind [199]. Zudem wurde das Vorkommen des Myofibroblastenmarkers α -SMA untersucht.

An den Sphäroiden einer Kontrollgruppe, die lediglich hASCs beinhaltete (Kontroll-Gewebesphäroide), sollte vergleichend eine Analyse der genannten EZM-Proteine sowie α -SMA durchgeführt werden. Um schließlich den Einfluss der von Tumorzellen sezernierten löslichen Faktoren in der Tumormikroumgebung herauszustellen, wurden Sphäroide aus hASCs in

tumorkonditioniertem Medium (TCM) gezüchtet (tumorassoziierte Gewebesphäroide) und darin ebenfalls Matrixproteine und α -SMA untersucht.

Abschließend erfolgte eine Korrelation der EZM-Analyse mit dem Vorhandensein von Tumorstammzellen in den 3D-Tumorsphäroiden. Dafür wurden die Tumorstammzellen mithilfe eines GFP-basierten Reporters für den Stammzellmarker NANOG (NANOG-GFP-Reporterzelllinie [200]) in mikroskopischen Aufnahmen der 3D-Tumorsphäroide nachgewiesen und im Kontext mit der EZM lokalisiert.

4 Material

4.1 Geräte

8-Kanal-Pipette	Eppendorf AG, DE-Hamburg
accu-jet® pro Pipettierhelfer	Brand GmbH & Co KG, DE-Wertheim
Analytische Waage Scaltec SBA 32	SCALTEC Instruments GmbH, DE-Göttingen
Gefrierschrank Igloo -86 °C	Telstar Life Science Solutions, NL-Woerden
Heracell™ 150i CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, DE-Darmstadt
HXP 120 V Kompaktlichtquelle	Leistungselektronik JENA GmbH, DE-Jena
Inverses Labormikroskop Leitz DM IL	Leica Microsystems, DE-Wetzlar
Inverses Mikroskop Axio Observer Z1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, DE-Jena
Inverses Mikroskop VisiScope IT 404	VWR International GmbH, DE-Darmstadt
Labgard Class II Laminar Flow Biological Safety Cabinet	NuAire, US-Plymouth, MN
Leica CM3050 S Kryostat	Leica Biosystems, DE-Nussloch
Mikroskopkamera AxioCam 105 color	Carl Zeiss AG, DE-Oberkochen
Mikroskopkamera AxioCam MRm	Carl Zeiss AG, DE-Oberkochen
Multipette® M4	Eppendorf AG, DE-Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, DE-Lauda Königshofen

Orbitalschüttler Rotamax 120	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, DE-Schwabach
Pipetten 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL	Gilson, Inc., US-Middleton, WI
Zentrifuge Mega Star 1.6R	VWR International GmbH, DE-Darmstadt

4.2 Chemikalien

1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DE-Steinheim
Bovine Serum Albumin lyophilized powder	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DE-Steinheim
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Thermo Fisher Scientific, DE-Darmstadt
DMEM/F-12 (Gibco® Life Technologies)	Thermo Fisher Scientific, DE-Darmstadt
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline powder	Thermo Fisher Scientific, DE-Darmstadt
Eosin-G-Lösung 0,5% wässrig	Carl Roth GmbH + Co. KG, DE-Karlsruhe
Fetal Bovine Serum – Fötales Kälberserum (FKS) (Gibco® Life Technologies)	Thermo Fisher Scientific, DE-Darmstadt
Fluoroshield™ histology mounting medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DE-Steinheim
Formaldehydlösung min. 37%	Merck KGaA, DE-Darmstadt
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DE-Steinheim
IHC Select® Proteinase K	Merck KGaA, DE-Darmstadt

Immunoselect Antifading Mounting Medium	DIANOVA GmbH, DE-Hamburg
Mayers Hämalaunlösung	Merck KGaA, DE-Darmstadt
Pen Strep (Gibco® Life Technologies)	Thermo Fisher Scientific, DE-Darmstadt
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DE-Steinheim
Trypsin-EDTA (0,05% 0,25%), phenol red	Thermo Fisher Scientific, DE-Darmstadt

4.3 Medien, Puffer und Lösungen

1X PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline powder (Thermo Fisher Scientific, DE-Darmstadt)
Citratpuffer	10 mM Natriumcitrat, 0,05% Tween 20 → pH 6,0
Medium für die Herstellung von Agarosegel	DMEM/F-12 (Gibco® Life Technologies) ohne Zusätze
Nährmedium für Sphäroide	DMEM/F-12 (Gibco® Life Technologies) 1% FKS (Gibco® Life Technologies) 1% Pen Strep (Gibco® Life Technologies)

Nährmedium für Zellkultur
(Vollmedium)

DMEM/F-12
(Gibco® Life Technologies)
10% FKS
(Gibco® Life Technologies)
1% Pen Strep
(Gibco® Life Technologies)

Proteinase-K-Puffer TE-CaCl₂

50 mM Tris Base, 1 mM EDTA,
5 mM CaCl₂, 0,5% TritonX-100
→ pH 8,0

4.4 Zellen

MDA-MB-231 human breast
adenocarcinoma

Zur Verfügung gestellt von:
Orthopädische Klinik König-Ludwig-
Haus, Würzburg

MDA-MB-231 NANOG-GFP
Reporterzelllinie

Zur Verfügung gestellt von:
Ofer Reizes, MD
Lerner Research Institute
Cleveland Clinic, Ohio, USA

Poietics™ human adipose derived
stem cells

Lonza Group AG, CH-Basel

4.5 Antikörper

Tab. 4.1: Primärantikörper

Primärantikörper	Typ	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
Anti-Alpha-Smooth-Muscle-Actin	Polyclonal IgG	Rabbit	1:200	Abcam (ab5694)
Anti-Collagen I	Polyclonal IgG	Rabbit	1:400	Abcam (ab34710)
Anti-Fibronectin	Polyclonal IgG	Rabbit	1:200	Santa Cruz Biotechnology (sc-9068)
Anti-Fibronectin	Monoclonal IgG	Mouse	1:200	Santa Cruz Biotechnology (sc-18825)

Tab. 4.2: Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Typ	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
Cy TM 2 AffiniPure Anti-Rabbit	Polyclonal IgG	Goat	1:200	Jackson ImmunoResearch (111-225-144)
Cy TM 3 AffiniPure Anti-Rabbit	Polyclonal IgG	Goat	1:200	Jackson ImmunoResearch (111-165-003)
Cy TM 3 AffiniPure Anti-Mouse	Polyclonal IgG	Goat	1:200	Jackson ImmunoResearch (115-165-003)

4.6 Verbrauchsmaterial

Ausgießform zum Einmalgebrauch (7x7x5 mm)	Simport® Scientific Inc., CA-Beloeil, QC
Combitips Advanced® 2,5 mL	Eppendorf AG, DE-Hamburg
Deckgläser 24 x 60 mm	R. Langenbrinck GmbH, DE-Emmendingen
Färbeküvette nach Hellendahl	R. Langenbrinck GmbH, DE-Emmendingen
Glas-Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co KG, DE-Wertheim
Mikrotomklingen	Leica Biosystems, DE-Nussloch
Nunc™ MicroWell™ 96-Well Mikrotiterplatten aus Polystyrol	Thermo Fisher Scientific, DE-Darmstadt
Greiner Bio-One™ 96-Well Conical Bottom (V) Non-binding Microplates	Greiner Bio-One GmbH, DE-Frickenhausen
Objektträger SuperFrost®,	R. Langenbrinck GmbH, DE-Emmendingen
Pipettenspitzen 20 µL, 200 µL, 1000 µL	Sarstedt AG & Co, DE-Nümbrecht
Reagenzreservoirs	Thermo Fisher Scientific, DE-Darmstadt

SafeSeal Reagiergefäß 1,5 mL und 2 mL	Sarstedt AG & Co, DE-Nümbrecht
Serologische Pipetten 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL	Greiner Bio-One GmbH, DE-Frickenhausen
Super PAP Pen Liquid Blocker Mini	Science Services GmbH, DE-München
Tissue-Tek® O.C.T.	Sakura Finetek, NL-Alphen aan den Rijn
Zellkulturflasche T175	Greiner Bio-One GmbH, DE-Frickenhausen
Amicon Ultra 0.5 mL Zentrifugen- Filter MWCO 3 kDa	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, DE-Steinheim
Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One GmbH, DE-Frickenhausen

4.7 Software

FIJI	Bildbearbeitung
GraphPad Prism 6	Statistische Auswertung
ZEN 2 (blue edition)	Software Fluoreszenzmikroskop

5 Methoden

5.1 Zellkultur

Zellkultur MDA-MB-231:

MDA-MB-231 (parental) und MDA-MB-231:NANOG-GFP-Brustkrebszellen wurden in T175-Zellkulturflaschen ausgesät und in Vollmedium (DMEM/F-12, 10% FKS, 1% Pen Strep) bei 37 °C und 5% CO₂ bis zur Subkonfluenz expandiert. MDA-MB-231:NANOG-GFP-Zellen besitzen hinter dem NANOG-Promotor eine GFP-Sequenz, die abgelesen und exprimiert wird, wenn NANOG transkribiert wird. Zellen mit hoher NANOG-Promotor-Aktivität fluoreszieren dann grün [200]. Das Kulturmedium wurde alle zwei Tage gewechselt. Zum Passagieren wurden die Zellen mit PBS gewaschen, anschließend trypsiniert (Trypsin-EDTA 0,05%) und nach Abstoppen mit Vollmedium gezählt und neu ausgesät.

Zellkultur hASC:

Für die Expansion wurden die Zellen in T175-Zellkulturflaschen in Vollmedium bei 37 °C und 5% CO₂ bis zur Subkonfluenz kultiviert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Zum Passagieren wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend trypsiniert (Trypsin-EDTA 0,25%). Das weitere Vorgehen entsprach dem oben für die Zellkultur der MDA-MB-231-Zellen beschriebenen.

5.2 Herstellung der 3D-Sphäroidkulturen

3D-Sphäroide wurden mithilfe der Liquid-Overlay-Technik hergestellt. Hierbei wurde der Boden einer 96-Well-Platte mit Agarose (1,5%) beschichtet, damit keine Zellen am Well-Boden anwachsen konnten. Nach Zugabe einer Zellsuspension aggregierten diese Zellen zu Sphäroiden [15, 43, 201, 202].

3D-Tumorsphäroide aus MDA-MB-231 und hASC (Tumor-hASC-Co):

MDA-MB-231-Zellen aus Passage 5 oder 6 bzw. MDA-MB-231:NANOG-GFP-Zellen und hASCs aus Passage 2 oder 3 wurden trypsiniert, wie oben beschrieben, und in low-serum-Medium (DMEM-F12, 1% FKS, 1% Pen Strep) resuspendiert. Die inneren 60 Wells einer 96-Well-Platte wurden mit Agarosegel beschichtet und 7000 Zellen (2000 MDA-MB-231 und 5000 hASCs, 100 µL

Medium) in Suspension pro Well ausgesät. In die äußeren Wells wurden jeweils 100 µL PBS (versetzt mit 1% Pen Strep) pipettiert. Dies verhinderte eine übermäßige Verdunstung von Medium aus den inneren Wells und garantierte homogene Kulturbedingungen.

Auf dem Orbitalschüttler erfolgte über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ die Sphäroidbildung. Am nächsten Tag wurden jeweils 100 µL DMEM/F-12 (1% FKS, 1% Pen Strep) pro Well zugegeben.

Mono-Sphäroide aus hASCs (hASC-Mono-Kontrolle):

Die hASCs wurden trypsinisiert und in DMEM/F-12 (1% FKS, 1% Pen Strep) resuspendiert. Analog zum Vorgehen bei den 3D-Tumorsphäroiden wurde in jedes mit Agarose beschichtete Well 100 µL der Zellsuspension (5000 hASCs) pipettiert und am nächsten Tag 100 µL DMEM/F-12 (1% FKS, 1% Pen Strep) pro Well zugegeben.

hASC-Mono-TCM:

Das Vorgehen unterschied sich von dem bei den hASC-Mono-Sphäroiden lediglich in der Zugabe des Mediums, das nach der Sphäroidbildung hinzugefügt wurde. In jedes Well der hASC-Mono-TCM-Gruppe wurden 100 µL vierfach konzentriertes TCM pipettiert (die resultierende Endkonzentration im Well war somit zweifach konzentriertes TCM).

Das TCM wurde aus MDA-MB-231-Zellen bzw. Zellen der MDA-MB-231:NANOG-GFP Reporterzelllinie gewonnen: 0,5 Millionen Zellen wurden in einer T175-Zellkulturflasche bis zu einer Konfluenz von ca. 90% kultiviert und anschließend 30 mL DMEM/F-12 (1% FKS, 1% Pen Strep) zugegeben. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und bei 4000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert.

Für die TCM-Aufkonzentrierung wurde das Mediumvolumen, welches von 7 Millionen Zellen konditioniert wurde, in ein Zentrifugen-Filter-Röhrchen (3 kDa MWCO) gegeben, und eine entsprechende Menge DMEM/F-12 (1% FKS, 1% Pen Strep) zugegeben, um ein Gesamtvolumen von 15 mL zu erhalten. Im Zentrifugen-Filter wurde die Suspension bei 4 °C und 4000 rpm für 30 min

zentrifugiert, um eine zehnfache Aufkonzentrierung des Mediums (1,5 mL im Filter) zu erreichen. Im Anschluss wurde das Medium durch Zugabe von frischem DMEM/F-12 (1% FKS, 1% Pen Strep) auf eine vierfache Aufkonzentrierung verdünnt.

5.3 Einbetten der 3D-Sphäroide

Nach drei bzw. fünf Tagen Inkubationszeit bei 37 °C und 5% CO₂ unter dynamischen Bedingungen auf dem Orbitalschüttler wurden die Sphäroide geerntet.

Für die Messung des Durchmessers wurden vor dem Einbetten mit einem inversen Mikroskop Hellfeldaufnahmen der Sphäroide in der 96-Well-Platte erstellt.

Die 3D-Sphäroide wurden (jeweils getrennt nach den drei Gruppen Tumor-hASC-Co, hASC-Mono-TCM, hASC-Mono-Kontrolle) in einem SafeSeal-Gefäß gesammelt und mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Sphäroide mit Formalin (3,7%) für 20 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Sphäroide mit jeweils 100 µL Methylenblau für 15 min gefärbt, um sie bei der Anfertigung von Kryoschnitten besser sichtbar zu machen. Anschließend wurden die Sphäroide erneut mit PBS gewaschen. Für die Anfertigung von Kryoschnitten wurden die Sphäroide in TissueTek® eingebettet und bei -80 °C gelagert.

5.4 Histologische Charakterisierung der 3D-Sphäroide

Mit dem Kryotom wurden Schnitte in einer Dicke von 8 µm angefertigt. Dabei wurde darauf geachtet, möglichst Schnitte aus der Sphäroid-Mitte zu erstellen.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die H.E.-Färbung wurden die Kryoschnitte in Färbeküvetten für 30 s in ddH₂O gewaschen, um das Tissue-Tek®-Einfriermaterial zu entfernen. Danach wurden die Schnitte für 30 s in Hämalan-Lösung nach Mayer gefärbt und anschließend 5 min unter laufendem Leitungswasser gebläut. Es folgte die Gegenfärbung mit Eosin 0,5% für 15 min. Abschließend wurden die Schnitte mit Glycerol eingedeckt.

Mikroskopische Aufnahmen wurden am inversen Mikroskop VisiScope IT 404 mit der Kamera Axiocam 105 color erstellt.

Immunhistochemische Analyse der EZM

Für die immunhistochemische Färbung der EZM wurden die Schnitte auf dem Objektträger zunächst mit einem Liquid Blocker umkreist. Das Tissue-Tek®-Einfriermaterial wurde durch Waschen für 1 min in PBS entfernt.

Für ein verbessertes Signal bei der Kollagen I-, Fibronectin- und α -SMA-Färbung wurden die Schnitte mit Proteinase K (in einer Konzentration von 1:20 im Proteinase-K-Puffer verdünnt) und 9 min bei RT verdaut.

Unspezifische Bindungsstellen wurden anschließend mit 1% BSA in PBS für 1 h bei RT geblockt. Die Antikörper wurden in 1% BSA in PBS verdünnt (s. Tab. 4.1) und jeweils 50 μ L der Lösung auf einen Schnitt pipettiert. Schließlich erfolgte die Inkubation in einer Feuchtekammer über Nacht bei 4°C.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte zweimal in PBS gewaschen und für 2 h bei RT mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (s. Tab. 4.2, Verdünnung 1:200) inkubiert.

Nach zweimaligem Waschen in PBS erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI in einer Verdünnung von 1:10000 in PBS für 5 min. Anschließend wurden die Schnitte mit Mounting-Medium (Immunoselect Antifading Mounting Medium, DIANOVA) eingedeckt.

Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Axio Observer Z1 mit der Kamera Axiocam MRm).

5.5 Bildbearbeitung und -analyse

Für die Bildbearbeitung und -analyse wurde das Programm FIJI (NIH) herangezogen.

Für die Bearbeitung der H.E.- und Fluoreszenzbilder wurden folgende Tools verwendet: Image \rightarrow Adjust \rightarrow Brightness Contrast sowie Image \rightarrow Adjust \rightarrow Color Balance für die einzelnen Farbkanäle.

Die Fluoreszenzintensität des EZM-Signals der unbearbeiteten Bilder wurde wie folgt analysiert:

- 1) Trennen der Kanäle unter Image → Color → Split Channels
- 2) Umkreisen des Sphäroids in jedem relevanten Kanal
- 3) Messung der Raw Integrated Density unter Analyze → Measure
- 4) Die Raw Integrated Density ist definiert als die Summe der vorhandenen Pixelwerte [203]. Dieser Wert wurde dann durch die Fläche des Sphäroids dividiert, um die jeweilige Intensität quantifizieren zu können:

$$\text{Intensität} = \frac{\text{RawIntDen}}{\text{Fläche}}$$

Für die Messung des Durchmessers wurden die Schritte 1 und 2, wie oben beschrieben, an Hellfeldaufnahmen durchgeführt. Anschließend erfolgte:

- 3) Messung des Umfangs (Perimeter) unter Analyze → Measure.
- 4) Errechnen des Durchmessers (d) aus $d = \frac{\text{Umfang}}{\pi}$.
- 5) Umrechnen der Pixeleinheiten in μm : 1 Pixeleinheit \triangleq 0,32 μm

5.6 Statistik

Die Ergebnisse wurden mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) untersucht und danach ein Tukey-Post-hoc-Test durchgeführt (GraphPad Prism V 6.0). Der n-Wert gibt an, wie viele unterschiedliche Sphäroide pro Gruppe untersucht wurden, die p-Werte sind jeweils in der Bildbeschriftung erläutert. Soweit nicht anders vermerkt, sind die angegebenen Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

6 Ergebnisse

6.1 Herstellung von 3D-Tumorsphäroiden mit der Liquid-Overlay-Technik

Um den Gewebekontext bei Brustkrebs und damit die Aspekte der Tumormikroumgebung adäquat zu rekapitulieren, wurden die 3D-Tumorsphäroide (Tumor-hASC-Co) aus MDA-MB-231-Brustkrebszellen und hASCs als stromale Komponente mit der Liquid-Overlay-Technik hergestellt (s. Abb. 6.1). Diese basiert darauf, dass die Zellsuspension auf einer Agaroseschicht ausgesät wird, auf der die Zellen nicht festwachsen können. Dadurch aggregieren sie zu dreidimensionalen Sphäroiden [15, 201].

Zu Beginn wurde die Sphäroidbildung mittels zweier unterschiedlicher Ansätze verglichen. Einerseits wurden nach der bereits etablierten Standardmethode [62] 96-Well-Platten mit Agarose beschichtet, die Zellsuspension zugegeben und auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Zum Vergleich wurden kommerziell erhältliche konische ULA-Platten verwendet, bei welchen das Anhaften von Zellen an die Oberfläche durch eine spezielle Beschichtung verhindert wird [204], was den Beschichtungsschritt mit Agarose überflüssig machte. Analog zur Agarose-Methode wurden die Wells der konischen ULA-Platten mit der Zellsuspension beschickt und die Sphäroidbildung unter gleichen Bedingungen auf dem Orbitalschüttler durchgeführt. Da lediglich im erstgenannten Verfahren mit konventionellen 96-Well-Platten und Agarosebeschichtung eine vollständige Sphäroidbildung erfolgte, wurde diese Methode für alle weiteren Experimente als Standard verwendet.

Für das Sphäroidmodell wurden die Sphäroide nach drei bzw. fünf Tagen Kulturdauer geerntet und fixiert, um auch zeitliche Aspekte der Tumor-Stroma-Interaktionen abbilden zu können. Danach erfolgte die Basischarakterisierung der 3D-Tumorsphäroide in Bezug auf deren Größe und Randbeschaffenheit. Schließlich wurde eine detaillierte histologische Analyse der in den Sphäroiden gebildeten EZM durchgeführt. Zum Abschluss der Charakterisierung wurde die Beschaffenheit der EZM an verschiedenen Kulturzeitpunkten festgehalten und quantifiziert.

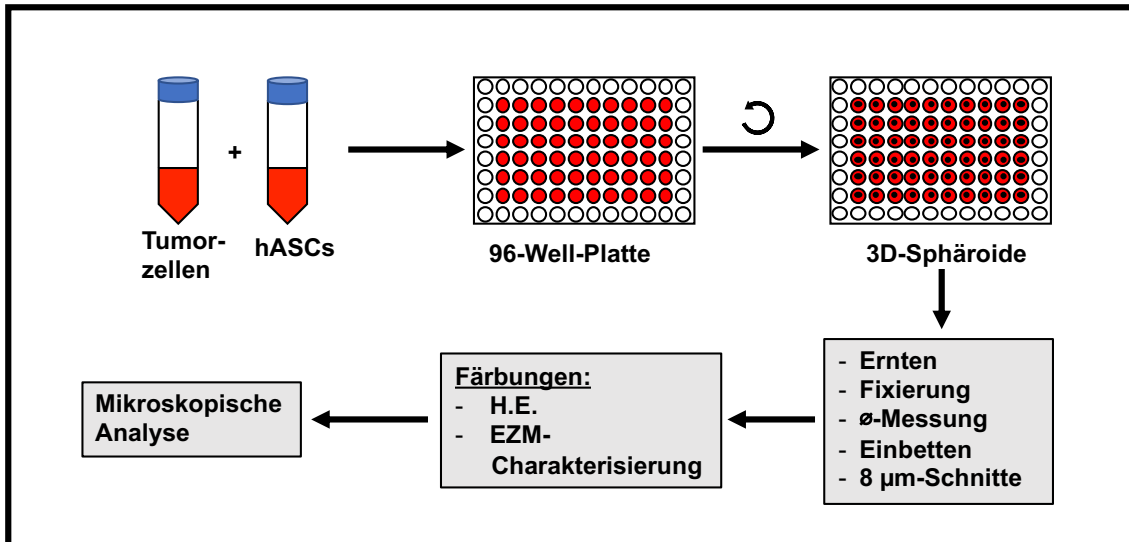


Abb. 6.1: Herstellung von 3D-Tumorsphäroiden mit der Liquid-Overlay-Technik

Kombination von Tumorzellen (MDA-MB-231) und Stromazellen (hASCs) als Zellsuspension in mit Agarose beschichteten 96-Well-Platten. Bildung von 3D-Tumorsphäroiden über Nacht unter dynamischen Bedingungen (Orbitalschüttler). Ernte, Fixierung und Charakterisierung der Tumorsphäroide nach einer Kulturdauer von 3 und 5 Tagen.

6.2 Etablierung der histologischen EZM-Charakterisierung

Um die EZM in den 3D-Tumorsphäroiden untersuchen zu können, wurden Kryoschnitte angefertigt. Zunächst wurden drei verschiedene Schnittdicken miteinander verglichen: 5 μm , 8 μm und 10 μm (s. Abb. 6.2 A). Die Schnitte wurden dann gegen die zwei wichtigsten profibrotischen Proteine der EZM im Tumor gefärbt – Kollagen I (grün) und Fibronectin (rot) [129]. Für die Sichtbarmachung der Zellkerne wurde zusätzlich mit DAPI (blau) gegengefärbt. In allen drei Fluoreszenzkanälen konnte mit steigender Schnittdicke eine Zunahme der Signalintensität beobachtet werden. Im 10- μm -Schnitt deuteten einige unscharfe Bereiche darauf hin, dass die Schnitte insgesamt zu dick waren, um EZM und Zellkerne in den Fluoreszenzbildern ausreichend auflösen zu können. Bei einer Schnittdicke von 5 μm war jedoch das Fluoreszenzsignal zu schwach. Zudem traten häufig dunkle Bereiche in den Fluoreszenzbildern auf, die darauf hinwiesen, dass die Schnitte gerissen und die Bestandteile des 3D-Tumorsphäroids nicht vollständig auf den Objektträger übertragen worden waren. Die 8- μm -Schnitte hingegen zeigten ein sehr homogenes Bild; sowohl die Signalintensität als auch die Schnittqualität bei der 8- μm -Variante erlaubten eine adäquate Darstellung von EZM und Zellkernen. Deshalb wurde diese Schnittdicke für alle weiteren Experimente als Standard festgelegt.

Für eine weitere Optimierung der Färbbedingungen wurden anschließend wieder Kryoschnitte gegen Kollagen I, Fibronectin und α -SMA gefärbt. Um ein möglichst spezifisches Signal der jeweiligen Matrixproteine zu erhalten, wurde eine Freilegung der Antigenbindungsstellen mit dem proteolytischen Enzym Proteinase K nach Standardprotokoll durchgeführt und mit immunhistochemischen Färbungen ohne enzymatischen Verdau verglichen (s. Abb. 6.2 B). Mit Proteinase-K-Verdau ergab sich dabei für die Antikörperfärbungen gegen Kollagen I, Fibronectin und α -SMA ein intensiveres und spezifischeres Fluoreszenzsignal. Daher wurde der enzymatische Verdau mit Proteinase K im Folgenden standardmäßig durchgeführt.

Zusammenfassend wurden nachstehende Färbeparameter etabliert (s. Abb. 6.2 C): Eine einheitliche Schnittdicke von 8 μm und enzymatischer Verdau mit

Proteinase K. Für die Färbung von Kollagen I war eine Primärantikörper-Verdünnung von 1:400 ausreichend. Die restlichen Primärantikörper sowie alle Sekundärantikörper wurden 1:200 verdünnt.

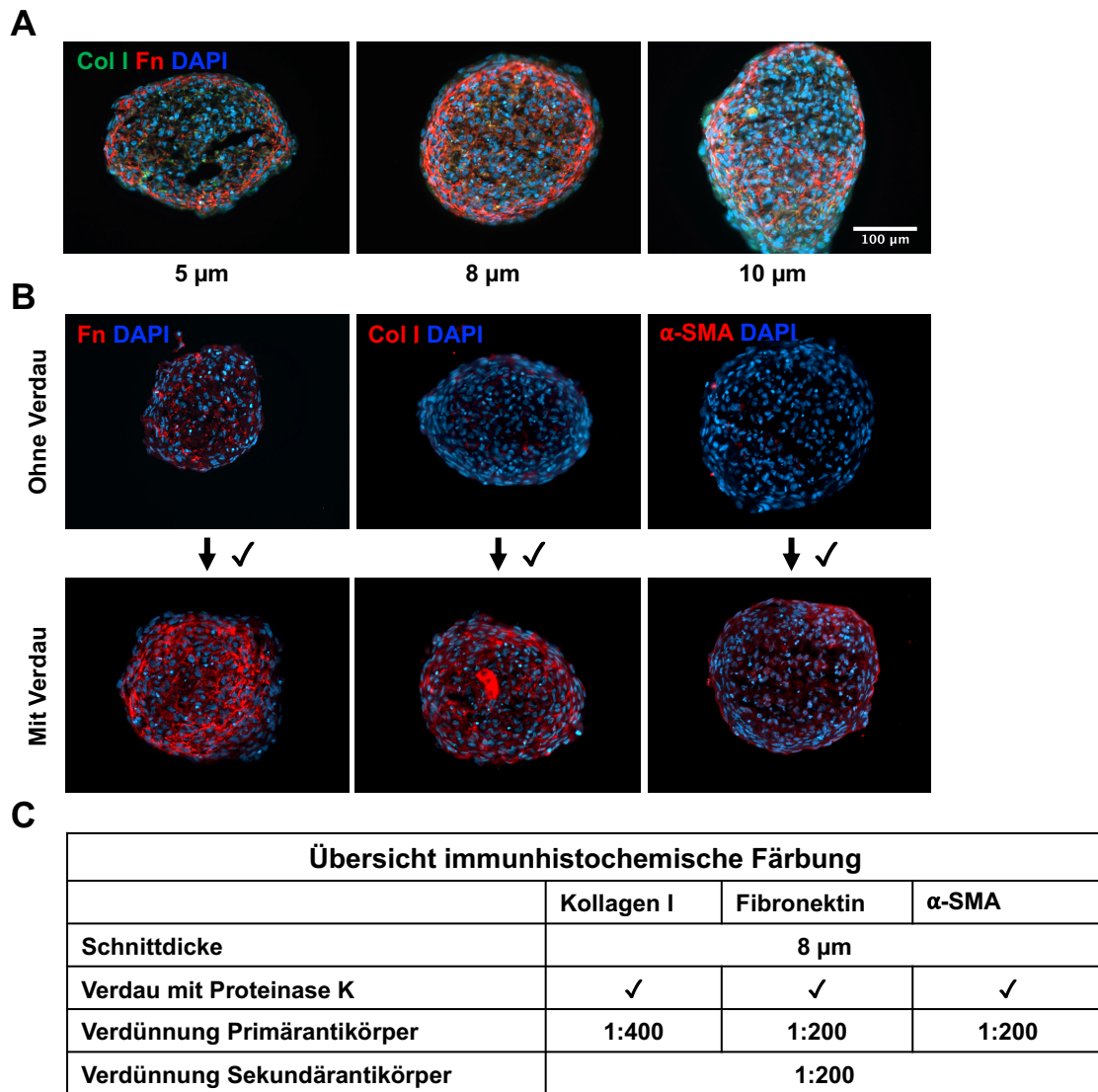


Abb. 6.2: Etablierung der histologischen EZM-Charakterisierung

(A) Vergleich unterschiedlicher Schnittdicken. 5-, 8- und 10-μm-Kryoschnitte wurden gegen Fibronektin (Fn) und Kollagen I (Col I) gefärbt. (B) Optimierung der EZM- und α-SMA-Färbung. Verwendung des Standardprotokolls mit (obere Reihe) und ohne (untere Reihe) zusätzlichen Verdau mit Proteinase K (Größenbalken = 100 μm). (C) Zusammenfassende Übersicht der etablierten Färbeparameter.

6.3 Charakterisierung der EZM in den 3D-Tumorsphäroiden

Aus *in-vivo*-Studien ist bekannt, dass die EZM im Mammakarzinom besonders reich an den profibrotischen Proteinen Fibronektin und Kollagen I ist [89]. Um herauszufinden, ob diese Eigenschaften der Tumormikroumgebung in den 3D-Tumorsphäroiden rekapituliert werden können, wurden Kryoschnitte von Sphäroiden (nach drei Tagen Kulturdauer) zunächst mit H.E. gefärbt (s. Abb. 6.3 A). Da hellrosa gefärbte Proteine zwischen den dunkelvioletten Zellkernen nur sehr schlecht zu erkennen waren, wurden für eine bessere Darstellung spezifische Antikörperfärbungen mit den bereits unter Kapitel 6.2 beschriebenen Färbeparametern gegen Fibronektin und Kollagen I durchgeführt (s. Abb. 6.3 B). Das Vorhandensein beider Proteine in den Sphäroiden war hier deutlich zu erkennen.

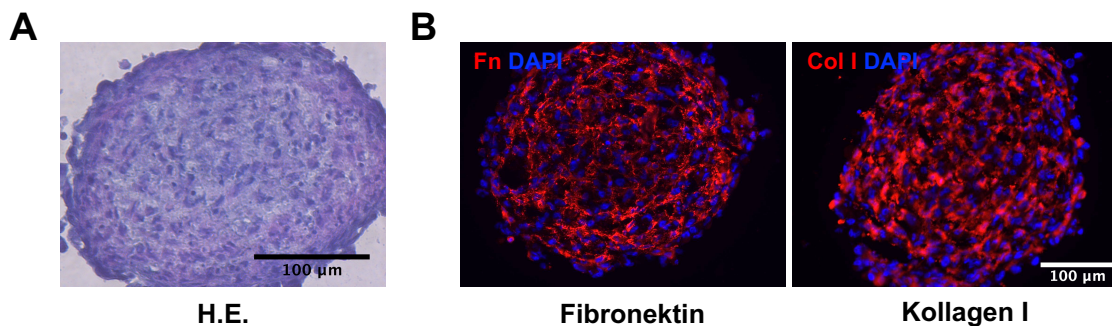


Abb. 6.3: Charakterisierung der EZM in den 3D-Tumorsphäroiden

(A) Mikroskopische Aufnahme eines H.E.-gefärbten Sphäroids. (B) Übersichtsfärbungen von Fibronektin (Fn) und Kollagen I (Col I). Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (Größenbalken = 100 µm).

6.4 Morphologische Charakterisierung der 3D-Tumorsphäroide und Vergleich mit Gewebesphäroiden sowie tumorassoziierten Gewebesphäroiden

Um den Einfluss der hASCs als wichtige stromale Komponente im Tumor auf die EZM zu untersuchen, wurden zusätzlich Sphäroide, die ausschließlich aus hASCs bestanden, hergestellt (Gewebesphäroide/hASC-Mono-Kontrolle) (s. Abb. 6.4 A). Des Weiteren wurden tumorassoziierte Gewebesphäroide (hASC-Mono-TCM) generiert zur Untersuchung des Einflusses von löslichen Faktoren in der Tumormikroumgebung auf die EZM: Das TCM enthielt die von Brustkrebszellen sezernierten löslichen Faktoren und wurde nach der Sphäroidbildung im Well zugegeben. Die 3D-Tumorsphäroide und die Gewebesphäroide wurden unter Standardbedingungen in low-serum-Medium kultiviert.

Nach einer Kulturdauer von drei Tagen erfolgte die Charakterisierung der ganzen, ungeschnittenen Sphäroide mittels Hellfeldmikroskopie (s. Abb. 6.4 B). Auf den Hellfeldaufnahmen war zunächst zu erkennen, dass die 3D-Tumorsphäroide den größten Durchmesser aufwiesen, die tumorassoziierten Gewebesphäroide den kleinsten. Diese Beobachtungen wurden mittels Quantifizierung bestätigt (s. Abb. 6.4 C): Mit einem mittleren Durchmesser von $342,1 \mu\text{m} \pm 7,1 \mu\text{m}$ waren die 3D-Tumorsphäroide am größten, gefolgt von den Kontroll-Gewebesphäroiden mit $320,8 \mu\text{m} \pm 4,4 \mu\text{m}$. Den kleinsten Durchmesser hatten die tumorassoziierten Gewebesphäroide mit einem Mittelwert von $316,8 \mu\text{m} \pm 6,2 \mu\text{m}$.

Außerdem wurde auf den Hellfeldaufnahmen deutlich, dass die 3D-Tumorsphäroide einen unscharf begrenzten Rand zeigten mit Zellen, die locker an der Sphäroidperipherie auflagern. Der Rand der Gewebesphäroide war hingegen scharf begrenzt.

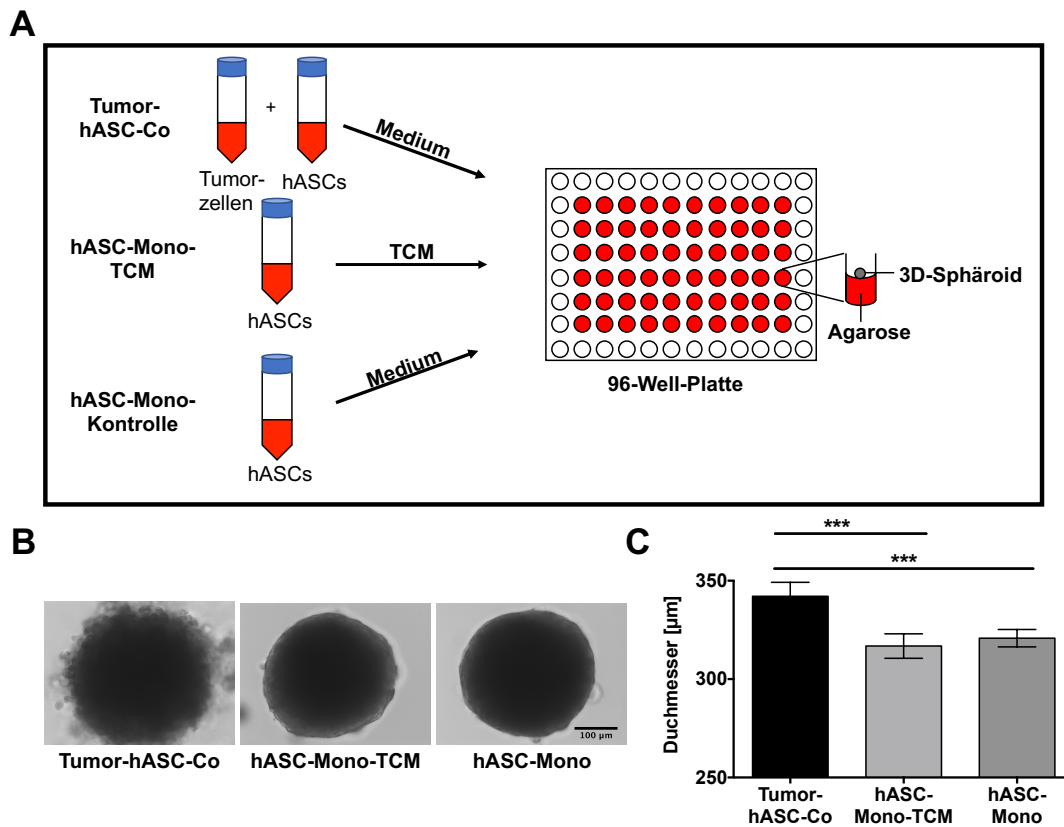


Abb. 6.4: Morphologische Charakterisierung der 3D-Tumorsphäroide und Vergleich mit Gewebesphäroiden sowie tumorassoziierten Gewebesphäroiden
(A) Herstellung von Sphäroiden der drei Gruppen Tumor-hASC-Co, hASC-Mono-TCM und hASC-Mono-Kontrolle. **(B)** Hellfeldaufnahmen von Tumor-hASC-Co-Sphäroiden, hASC-Mono-TCM- und hASC-Mono-Sphäroiden nach 3 Tagen Kulturdauer (Größenbalken = 100 µm). **(C)** Quantifizierung der Sphäroiddurchmesser ($n = 5$; $***p < 0,001$).

Um die Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung der Sphäroide sowie den Einfluss der löslichen Faktoren mit Unterschieden in Menge und Verteilung der EZM in Zusammenhang zu bringen, wurden zu Beginn H.E.-gefärbte Kryoschnitte von 3D-Tumorsphäroiden und Gewebesphäroiden miteinander verglichen (s. Abb. 6.5).

Deutlich erkennbar waren zunächst die schon in den Hellfeldaufnahmen beobachteten Unterschiede in Größe und Randbeschaffenheit: Die 3D-Tumorsphäroide zeigten den größten Durchmesser und gleichzeitig einen unscharf begrenzten Rand. Die Gewebesphäroide wiesen hingegen eine deutlich glatter abgegrenzte Oberfläche auf. Den kleinsten Durchmesser der drei Gruppen hatten die tumorassoziierten Gewebesphäroide.

In allen drei Sphäroidgruppen war EZM in Form von blassrosa Strukturen zu erkennen. Die H.E.-Färbung ermöglichte jedoch lediglich eine Übersicht; für die genauere Untersuchung der EZM in den Sphäroiden wurden im Folgenden Fluoreszenzfärbungen gegen einzelne EZM-typische Proteine durchgeführt.

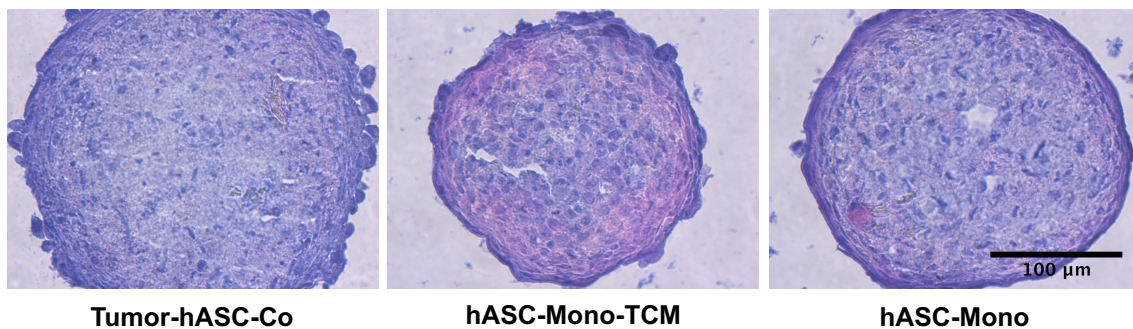


Abb. 6.5: Grundcharakterisierung der EZM
Mikroskopische Aufnahmen von H.E.-gefärbten Sphäroiden der Gruppen Tumor-hASC-Co, hASC-Mono-TCM und hASC-Mono (Größenbalken = 100 µm).

6.5 Immunhistochemische Färbung und histomorphometrische Betrachtung tumorrelevanter EZM-Proteine: Fibronektin

Um das Vorkommen der profibrotischen Proteine Fibronektin und Kollagen I in den 3D-Tumorsphäroiden (Tumor-hASC-Co) und in den Gewebesphäroiden (hASC-Mono-TCM und hASC-Mono-Kontrolle) genauer zu untersuchen, wurden Antikörperfärbungen mit den in Kapitel 6.2 etablierten Färbeparametern an Sphäroiden nach drei Tagen Kulturdauer durchgeführt.

Da Fibronektin bei der EZM-Deposition im Mammakarzinom sehr früh gebildet wird [205], wurde dieses als erstes Protein untersucht. An Tag 3 war signifikant weniger Fibronektin in den 3D-Tumorsphäroiden vorhanden als in den Gewebesphäroiden (s. Abb. 6.6 A). Auffällig war, dass der charakteristische fibrotische Rand lediglich in den Gewebesphäroiden existierte.

Um tiefere Einblicke bezüglich des zeitlichen Verlaufs der Fibrosierung in den Sphäroiden zu erhalten, wurden in einem weiteren Durchgang Sphäroide gezüchtet, die allerdings erst nach fünf Tagen Kulturdauer geerntet sowie anschließend gefärbt und mikroskopiert wurden.

Interessanterweise erkannte man an Tag 5 keine signifikanten Intensitätsunterschiede mehr zwischen den 3D-Tumorsphäroiden und den Gewebesphäroiden, und die gebildete Fibronektin-Menge war in allen Gruppen vergleichbar (s. Abb. 6.6 B). Auch zeigte sich die Randbetonung des Fibronektins in allen drei Gruppen gleichermaßen.

Schließlich schienen an Tag 3 in den tumorassoziierten Gewebesphäroiden ähnliche Mengen an Fibronektin vorzuliegen wie in den Kontroll-Gewebesphäroiden. Nach fünf Tagen Kulturdauer war in den Sphäroiden, die im TCM gezüchtet worden waren, eine Tendenz zu mehr Fibronektin als in den Kontroll-Gewebesphäroiden zu erkennen.

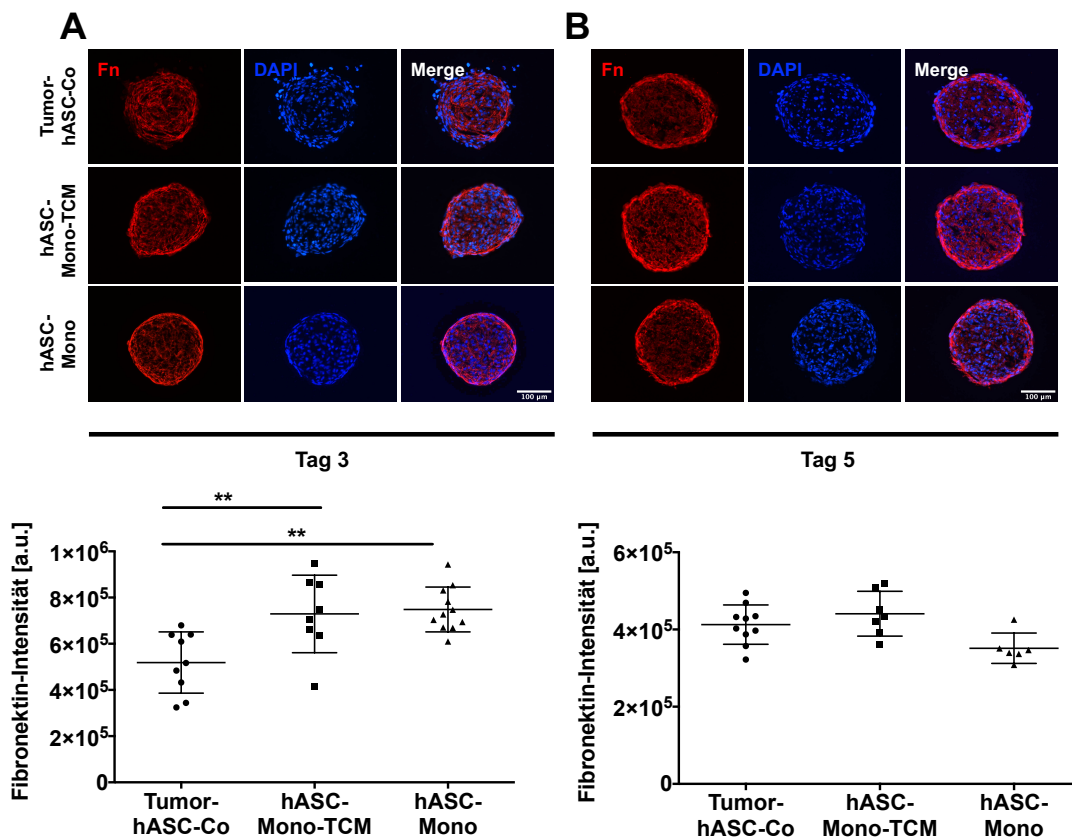


Abb. 6.6: Immunohistochemische Färbung und histomorphometrische Betrachtung tumorrelevanter EZM-Proteine: Fibronectin

Fluoreszenzfärbung gegen Fibronectin (Fn); Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (Größenbalken = 100 μm). (A) Fibronectin nach **3 Tagen** Kulturdauer. Quantifizierung: Einzelwerte und Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 9$ Tumor-hASC-Co, $n = 8$ hASC-Mono-TCM und $n = 11$ hASC-Mono; $**p < 0,01$). (B) Fibronectin nach **5 Tagen** Kulturdauer. Quantifizierung: Einzelwerte und Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 10$ Tumor-hASC-Co, $n = 7$ hASC-Mono-TCM und $n = 6$ hASC-Mono).

6.6 Relative Veränderungen der Fibronectin-Deposition in Tumor- und Gewebesphäroiden

Da die Kryoschnitte in den beiden Versuchen (Tag 3/Tag 5, s. Kapitel 6.5) an unterschiedlichen Tagen gefärbt und die Belichtungszeiten leicht angepasst worden waren, konnten die erhobenen absoluten Fibronectin-Mengen nicht ohne Weiteres miteinander verglichen werden.

Um dennoch die zeitliche Entwicklung der Mengen an Fibronectin von Tag 3 zu Tag 5 in den 3D-Tumorsphäroiden und in den tumorassoziierten Gewebesphäroiden darstellen zu können, wurden relative Daten generiert: Der Mittelwert der Kontroll-Gewebesphäroide des jeweiligen Tages diente als Referenz und wurde gleich 1 gesetzt. Die einzelnen Werte der anderen beiden Gruppen Tumor-hASC-Co und hASC-Mono-TCM von Tag 3 wurden folglich auf den Mittelwert der hASC-Mono-Gruppe von Tag 3 bezogen und davon Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Gleiches galt für die Werte an Tag 5 (s. Abb. 6.7). Bezogen auf die Gewebesphäroide nahm die Fibronectin-Menge von Tag 3 zu Tag 5 in den 3D-Tumorsphäroiden am stärksten zu. Auch in den tumorassoziierten Gewebesphäroiden konnte ein Anstieg der Fibronectin-Menge beobachtet werden.

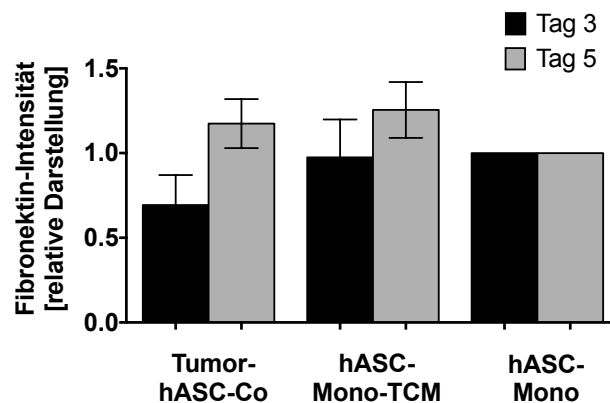


Abb. 6.7: Relative Veränderungen der Fibronectin-Deposition in Tumor- und Gewebesphäroiden

Relative Darstellung der Fibronectin-Intensität. hASC-Mono wurde als Referenz = 1 gesetzt. (Tag 3: $n = 9$ Tumor-hASC-Co, $n = 8$ hASC-Mono-TCM; Tag 5: $n = 10$ Tumor-hASC-Co, $n = 7$ hASC-Mono-TCM).

6.7 Immunhistochemische Färbung und histomorphometrische Betrachtung tumorrelevanter EZM-Proteine: Kollagen I

Während Umbauprozessen der EZM, z.B. im Zuge von malignen Prozessen, scheint die Anwesenheit von Fibronectin unabdingbare Voraussetzung zu sein, dass Kollagen I gebildet wird [206]. Da sich Fibronectin in den 3D-Tumorsphäroiden langsamer bildete als in den anderen Gruppen (s. Kapitel 6.5), erwartete man auch ein schwaches Kollagen-I-Signal in den 3D-Tumorsphäroiden. Tatsächlich war an Tag 3 in den Tumor- und Gewebesphäroiden etwa gleich viel Kollagen I zu sehen (s. Abb. 6.8 A). Mittels Quantifizierung wurde dieser Eindruck bestätigt: Die Intensitätsmittelwerte waren an Tag 3 in allen drei Gruppen etwa gleich hoch. Im Gegensatz zu Fibronectin konnte man eine Randbetonung von Kollagen I an Tag 3 nur in den tumorassoziierten Gewebesphäroiden beobachten.

Anschließend wurden die nach fünf Tagen Kulturdauer geernteten Sphäroide auch gegen Kollagen I gefärbt (s. Abb. 6.8 B). Auffällig war ein deutlich intensiveres Fluoreszenzsignal in den 3D-Tumorsphäroiden. Die Quantifizierung ergab eine signifikant höhere Kollagen-I-Menge in den 3D-Tumorsphäroiden als in den Gewebesphäroiden, deren Mittelwerte etwa gleich groß waren.

Die Verteilung von Kollagen I innerhalb der Sphäroide änderte sich ebenfalls deutlich im Zeitverlauf: War es an Tag 3 in den 3D-Tumorsphäroiden und in den Kontroll-Gewebesphäroiden noch homogen verteilt mit nur schwacher Randbetonung, erkannte man eine deutliche Randbetonung in allen drei Gruppen an Tag 5.

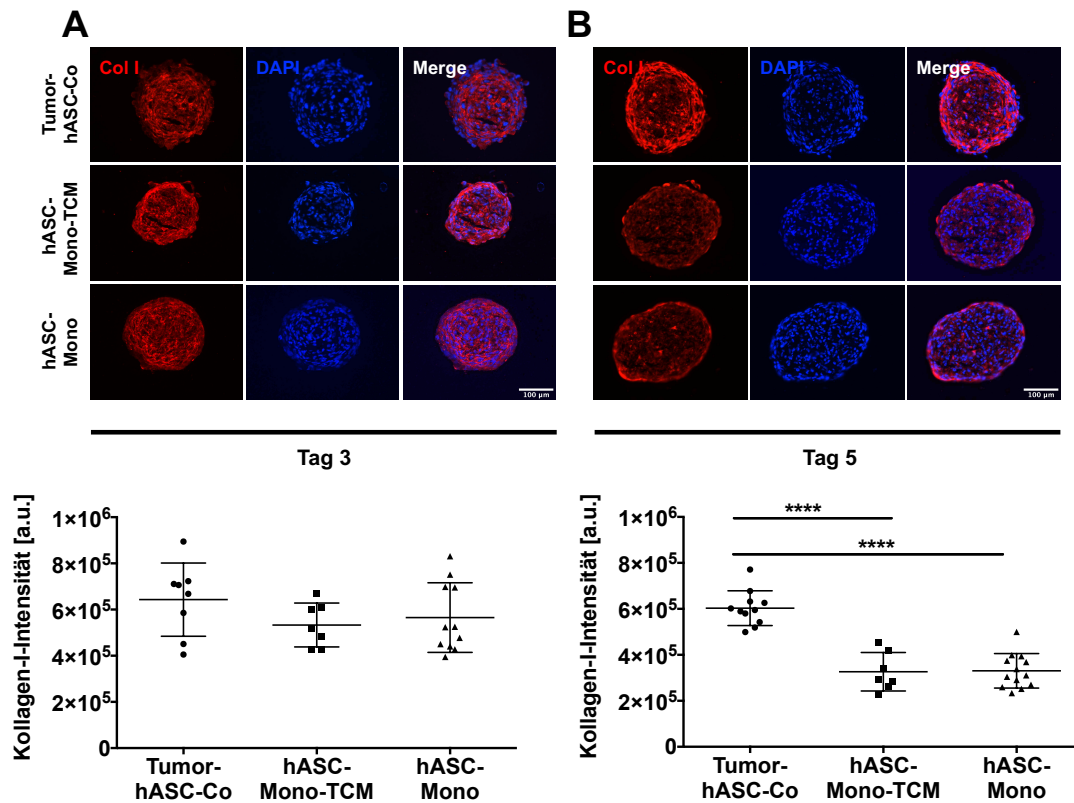


Abb. 6.8: Immunohistochemische Färbung und histomorphometrische Betrachtung tumorrelevanter EZM-Proteine: Kollagen I

Fluoreszenzfärbung gegen Kollagen I (Col I); Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (Größenbalken = 100 μm). **(A)** Kollagen I nach **3 Tagen** Kulturdauer. Quantifizierung: Einzelwerte und Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 8$ Tumor-hASC-Co, $n = 7$ hASC-Mono-TCM und $n = 11$ hASC-Mono; $***p < 0,001$). **(B)** Kollagen I nach **5 Tagen** Kulturdauer. Quantifizierung: Einzelwerte und Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 11$ Tumor-hASC-Co, $n = 7$ hASC-Mono-TCM und $n = 13$ hASC-Mono).

6.8 Relative Veränderungen der Kollagen-I-Deposition in Tumor- und Gewebesphäroiden und Untersuchung der Kolokalisation von Kollagen I und dem Kontraktilitätsmarker α -SMA

Um die zeitabhängige Entwicklung von Kollagen I von Tag 3 zu Tag 5 in den 3D-Tumorsphäroiden und in den tumorassoziierten Gewebesphäroiden untersuchen zu können, wurden die absoluten Intensitätswerte, wie oben für Fibronektin beschrieben, ebenfalls als relative Daten dargestellt (s. Abb. 6.9 A). Der Mittelwert der Kontroll-Gewebesphäroide am jeweiligen Tag wurde als Referenz gleich 1 gesetzt. Die Menge an Kollagen I nahm – verglichen mit der hASC-Mono-Gruppe – von Tag 3 zu Tag 5 in den 3D-Tumorsphäroiden deutlich zu, in den tumorassoziierten Gewebesphäroiden blieb sie nahezu unverändert. In den 3D-Tumorsphäroiden war an Tag 5 deutlich mehr Kollagen I als in den Gewebesphäroiden vorhanden. In den tumorassoziierten Gewebesphäroiden hingegen war die Kollagen-I-Menge etwa gleich hoch wie in der Bezugsgruppe.

Zwar erkannte man im Fall von Kollagen I kaum Intensitätsunterschiede zwischen der hASC-Mono- und der hASC-Mono-TCM-Gruppe (s. Abb. 6.8), obwohl bekannt ist, dass das TCM tumorfördernde Signalstoffe wie z.B. TGF- β und IL-8 enthält [20, 162]. Jedoch zeigte sich unter dem Einfluss der löslichen Faktoren in den tumorassoziierten Gewebesphäroiden ein profibrotischer, kapselartiger Rand. Um herauszufinden, ob im vorliegenden Mikrotumormodell unter dem Einfluss löslicher Faktoren eine Differenzierung von hASCs zu Myofibroblasten stattfand, wurden Sphäroide gegen den Myofibroblastenmarker α -SMA gefärbt. Zur Untersuchung einer Korrelation von Myofibroblasten- und Kollagen-I-Menge wurden tumorassoziierte Gewebesphäroide mit Kontroll-Gewebesphäroiden verglichen (s. Abb. 6.9 B).

Tatsächlich zeigte sich in der hASC-Mono-TCM-Gruppe eine deutliche Kolokalisation von α -SMA-positiven Zellen mit Kollagen I im Randbereich der Sphäroide. In den Kontroll-Gewebesphäroiden, die nicht unter tumorassoziierten Bedingungen kultiviert worden waren, zeigte sich hingegen eine homogene Verteilung von Kollagen I und nur ein diffuses, nicht lokalisiertes α -SMA-Signal.

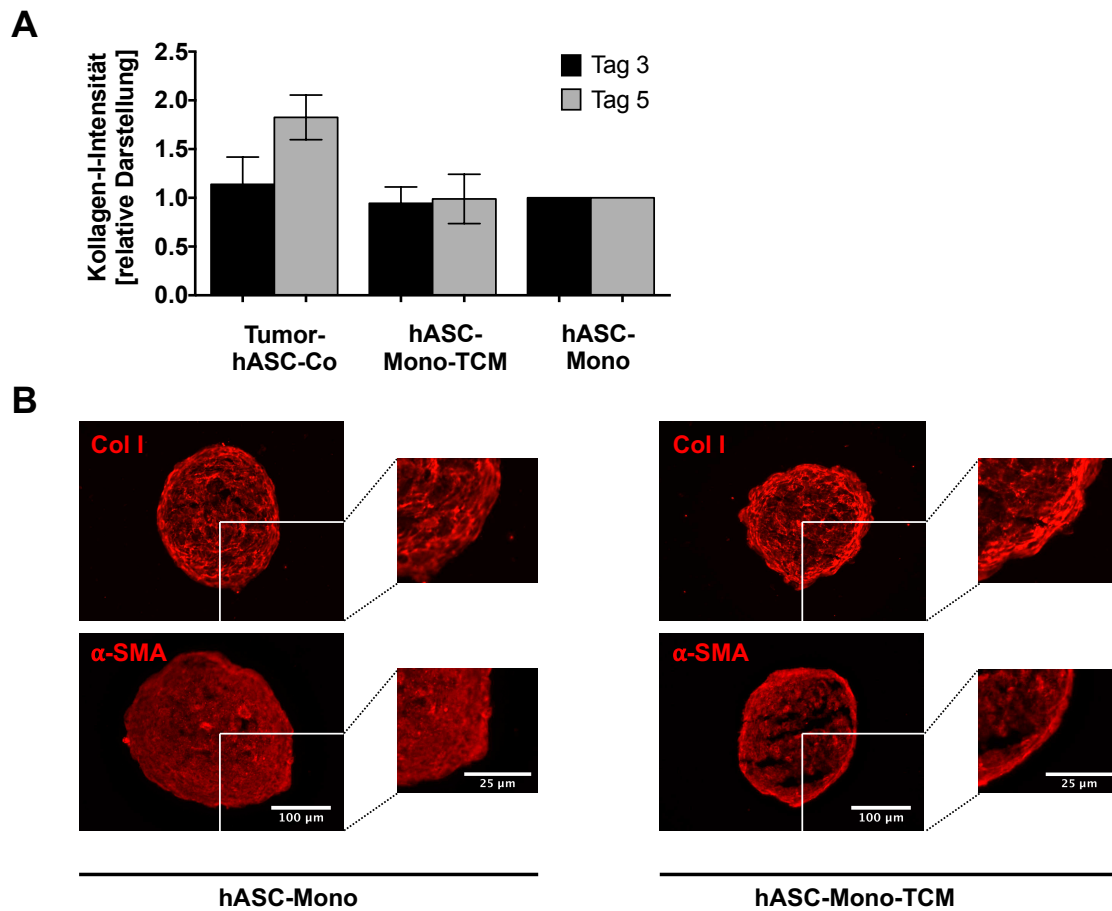


Abb. 6.9: Relative Veränderungen der Kollagen-I-Deposition in Tumor- und Gewebesphäroiden und Untersuchung der Kollokalisierung von Kollagen I und dem Kontraktilitätsmarker α -SMA

(A) Relative Darstellung der Kollagen-I-Intensität. hASC-Mono wurde als Referenz = 1 gesetzt. (Mittelwert \pm Standardabweichung, Tag 3: $n = 8$ Tumor-hASC-Co, $n = 7$ hASC-Mono-TCM; Tag 5: $n = 11$ Tumor-hASC-Co, $n = 7$ hASC-Mono-TCM). (B) Fluoreszenzfärbung von hASC-Mono- und hASC-Mono-TCM-Sphäroiden an Tag 3 gegen Kollagen I (Col I) bzw. α -SMA (Größenbalken = 100 μ m bzw. 25 μ m (Ausschnitte)).

6.9 Analyse von Tumorstammzellcharakteristika

Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Fibronectin- und Kollagen-I-reiche EZM die Aggressivität des Mammakarzinoms erhöht [133, 207]. Unter Zuhilfenahme der Tumorstammzellhypothese [30] wurde zum Abschluss untersucht, inwieweit die tumorassoziierte EZM CSC-Eigenschaften fördert und so potentiell zu einer Aggressivitätssteigerung beiträgt. Die Tumorstammzellhypothese besagt, dass Tumorgewebe (u.a. das Mamma-Karzinom) nicht nur aus differenzierten Tumorzellen besteht, sondern auch aus Tumorstammzellen, die eine erhöhte Aggressivität des Tumors bedingen [179, 181] (s. Abb. 6.10 A). Der Transkriptionsfaktor NANOG ist ein wichtiger Tumorstammzellmarker, der zum Nachweis von CSCs *in vitro* verwendet wird [208].

Um die Validität unserer Ergebnisse zu überprüfen, wurde in einem anschließenden Versuch die Kolo-kalisation der EZM-Proteine Fibronectin und Kollagen I mit Tumorstammzellen untersucht. Dazu wurde bei der Tumorsphäroid-Herstellung (anstatt der „normalen“ parentalen MDA-MB-231-Zelllinie) eine bereits etablierte Reporterzelllinie MDA-MB-231:NANOG-GFP verwendet (s. Abb. 6.10 B): Hinter den NANOG-Promotor ist hier eine GFP-Sequenz geschaltet, die im Zuge der Transkription von NANOG abgelesen und exprimiert wird, sodass Zellen mit hoher NANOG-Promotor-Aktivität grün fluoreszieren [200].

Sphäroide nach drei bzw. fünf Tagen Kulturdauer wurden gegen Fibronectin und Kollagen I gefärbt und anschließend mit DAPI gegengefärbt. Zur besseren Übersicht wurden die Kanäle getrennt und in Einzelbildern dargestellt: Von jedem Sphäroid das jeweilige Protein (rot) mit dem DAPI-Signal und andererseits das NANOG-Signal (grün) mit DAPI (s. Abb. 6.10 C).

In den vorangegangenen Experimenten hatte sich in den 3D-Tumorsphäroiden an Tag 3 ein vergleichsweise schwaches, homogen verteiltes Fibronectin-Signal gezeigt, das an Tag 5 hingegen bevorzugt am Rand der 3D-Tumorsphäroide in Erscheinung getreten war (s. Kapitel 6.5). Diese Beobachtungen deckten sich mit der Verteilung von Fibronectin im NANOG-Experiment. Ferner war zu erkennen, dass das homogen verteilte Fibronectin an Tag 3 mit einem schwachen,

gleichmäßig in den Sphäroiden verteilten NANOG-Signal vergesellschaftet war. Demgegenüber waren Fibronectin und NANOG an Tag 5 bevorzugt zusammen am Rand der Sphäroide zu finden. Die vermutete Kollokalisierung von Fibronectin und GFP-exprimierenden Tumorstammzellen in den 3D-Tumorsphäroiden traf folglich zu.

Den Beobachtungen aus Kapitel 6.7 zufolge war Kollagen I an Tag 3 ebenfalls relativ homogen in den 3D-Tumorsphäroiden verteilt, wohingegen sich nach fünf Tagen Kulturdauer ein deutlich intensiveres Kollagen-I-Signal an der Sphäroidperipherie abzeichnete. Im NANOG-Experiment offenbarte sich diese Tendenz in der Verteilung gleichermaßen und es wurden zudem folgende Zusammenhänge ersichtlich: Wenig Kollagen I an Tag 3 und eine vergleichsweise schwache Randbetonung gingen mit geringer NANOG-Intensität einher. Im Gegensatz dazu konnte man auch in diesem Fall an Tag 5 deutlich erkennen, dass Kollagen-I- und NANOG-Signal an der Sphäroidperipherie besonders in Erscheinung traten.

Insgesamt war zu beobachten, dass die Tumorzellen im etablierten Modell an Tag 5 phänotypische Charakteristika von CSCs annahmen. Außerdem zeigte sich in den Sphäroiden dort, wo mehr EZM zu finden war, auch gleichzeitig ein stärkeres NANOG-Signal. Menge und Verteilung an EZM-Proteinen schienen somit in dem entwickelten 3D-Mikrotumormodell in Korrelation mit Tumorstammzellcharakteristika zu stehen.

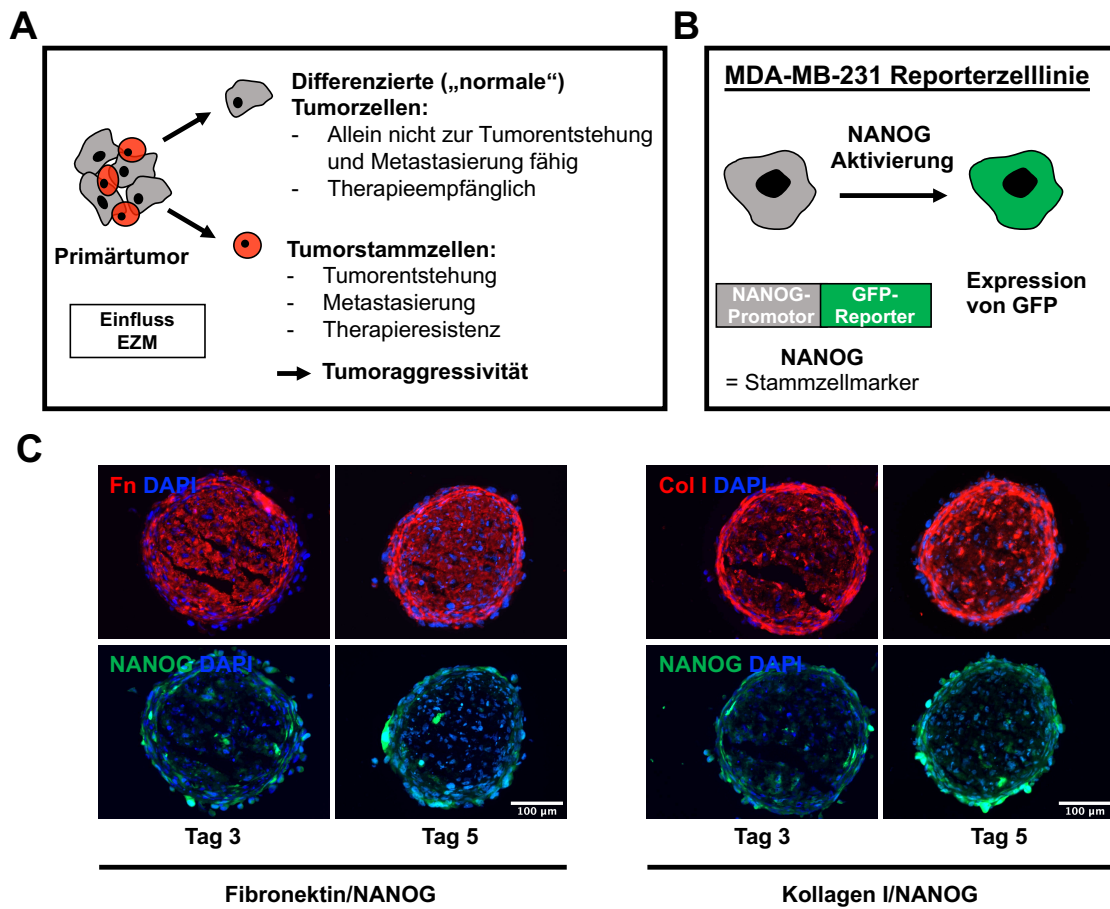


Abb. 6.10: Analyse von Tumorstammzellcharakteristika

(A) Schematische Darstellung der Tumorstammzellhypothese. (B) Schematische Darstellung der Funktionsweise der MDA-MB-231:NANOG-GFP-Reporterzelllinie. (C) Fluoreszenzfärbung von MDA-MB-231:NANOG-GFP-Co-Sphäroiden gegen Fibronectin (Fn) bzw. Kollagen I (Col I); Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI. Darstellung der Sphäroide in getrennten Kanälen: Fn bzw. Col I mit DAPI (oben) und NANOG mit DAPI (unten). Jeweils von Tag 3 und Tag 5.

7 Diskussion

Die Etablierung eines verlässlichen *in-vitro*-Modells, das die Pathophysiologie von Tumorzellen und ihrer Mikroumgebung *in-vivo*-ähnlich rekapituliert, ist essentiell, um deren Zusammenspiel bei der Tumorinitiation und -progression besser verstehen zu können. Veränderungen der Tumormikroumgebung wie die erhöhte Steifigkeit der EZM, die sich im Lauf der Tumorgenese ergeben, haben großen Einfluss auf die Tumorentwicklung und -aggressivität und behindern konventionelle Tumorthérapien [27, 209]. Ebenso wirken Tumorstammzellen auf die Aggressivität und die Therapieresistenz von Tumoren ein [210]. Darüber, wie diese einzelnen Faktoren sich gegenseitig beeinflussen, also auf welche Weise EZM und Tumorstammzellen zu einer Erhöhung der Tumoraggressivität führen können, ist bisher wenig bekannt. Um diese Aspekte *in vitro* untersuchen zu können, sollte in der vorliegenden Arbeit ein realitätsnahes 3D-Mikrotumormodell etabliert werden.

Die Auswahl einer geeigneten Herstellungsmethode stellt die Basis für die Reproduzierbarkeit und die adäquate Darstellung der zellulären Bestandteile und der sie umgebenden Mikroumgebung in den 3D-Sphäroiden dar. Vinci *et al.* untersuchten die Sphäroidbildung verschiedener Zelllinien in speziell beschichteten ULA-Platten und erkannten diese Methode im Vergleich zu Agar-beschichteten Wells als vorteilhaft an [33]. Agar als Material zur Beschichtung der Wells ist Agarose aber unterlegen, denn dessen Sulfatgruppen hemmen u.a. das Wachstum von Fibroblasten [23]. In unserem experimentellen Setup mit Verwendung kommerziell erhältlicher ULA-Platten mit konischem Boden fand jedoch keine regelmäßige Sphäroidbildung statt. Diese Beobachtung stimmt mit den Experimenten von Friedrich *et al.* überein, in denen verschiedene kommerziell erhältliche ULA-Platten zur Sphäroidbildung getestet wurden [62]. Ein möglicher Grund für das Scheitern der Herstellung von Sphäroiden könnte zum einen die konische Form der Wells gewesen sein: Vinci *et al.* verwendeten Well-Platten mit U-förmigem Boden. Zum anderen erfolgte dort die Sphäroidbildung im Gegensatz zu unserem Protokoll nicht unter dynamischen Bedingungen [33].

Aus zahlreichen *in-vivo*- und *in-vitro*-Studien ist bekannt, dass bei Brustkrebs die Menge an profibrotischen EZM-Bestandteilen im Vergleich zum gesunden Gewebe erhöht ist [18, 89, 129]. In unseren Versuchen war hingegen an Tag 3 in den 3D-Tumorsphäroiden, verglichen mit den Gewebesphäroiden, weniger EZM vorhanden. Der kleine Durchmesser der Gewebesphäroide ließ die Vermutung zu, dass die Zellen in den Gewebesphäroiden dichter gepackt gewesen sein könnten als in den Tumorsphäroiden. Dieser Aspekt könnte eine mögliche Ursache für die geringe EZM-Menge in den 3D-Tumorsphäroiden sein. Ebenso konnte in unseren Experimenten keine Aussage über die EZM-Menge pro Zelle gemacht werden, da in der Analyse der Kryoschnitte die Zellzahl pro Sphäroid nicht berücksichtigt wurde. Um diesen Aspekt zu untersuchen, könnte aufbauend auf unseren Erkenntnissen die Anzahl der Zellen manuell oder mithilfe eines Programms (z.B. FIJI) bestimmt werden. Des Weiteren gibt es Unterschiede in der EZM-Ablagerung abhängig vom Zelltyp, denn z.B. sind die meisten Tumorzellen nicht in der Lage, selbst EZM-Proteine zu exprimieren und können lediglich durch die Sekretion löslicher Faktoren die Umwandlung von hASCs in CAFs induzieren [205]. In den 3D-Tumorsphäroiden scheinen folglich nicht alle Zellen unmittelbar an der EZM-Ablagerung beteiligt zu sein, sondern hauptsächlich die hASCs. Warum in den 3D-Tumorsphäroiden insbesondere an Tag 3 weniger EZM vorhanden war als in den anderen Gruppen, lässt sich jedoch mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht abschließend erklären. Diesbezüglich dürften weiterführende Untersuchungen in Zukunft interessante Einblicke liefern.

Darüber hinaus kommen in den Gewebesphäroiden nur homotypische Zell-Zell-Kontakte vor, während sich im Gegenzug in den 3D-Tumorsphäroiden auch heterotypische Zell-Zell-Kontakte befinden [56]. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass die hASCs bei Anwesenheit von Tumorzellen in den 3D-Tumorsphäroiden auch eine andere EZM-Zusammensetzung verursachen als in den Monosphäroiden. Die Untersuchung der EZM in dieser Arbeit beschränkte sich auf die im Tumorkontext bekanntesten Proteine Fibronectin und Kollagen I, die eine eindeutige Dynamik im Zeitverlauf zwischen Tag 3 und Tag 5 zeigten. Im Zusammenhang mit Brustkrebs und CSCs sind jedoch u.a. auch Kollagen VI [211], Hyaluronsäure [212] sowie die Basalmembran-Proteine Kollagen IV und

Laminin [89] relevant, sodass es in einem nächsten Schritt sinnvoll wäre, weitere tumorspezifische EZM-Bestandteile in die Analyse mit einzubeziehen.

Eine andere zentrale Eigenschaft von Brustkrebs ist die erhöhte Gewebesteifigkeit [27]. Chandler *et al.* zeigten, dass von Brustkrebszellen sezernierte lösliche Faktoren u.a. verantwortlich für die Differenzierung von hASCs in CAFs sind und damit maßgeblich zur Gewebekontraktion beitragen [20]. TGF- β als Bestandteil des tumorkonditionierten Mediums induziert zudem über den Rho/ROCK-Signalweg die Kontraktilität der CAFs [154]. Dass von unseren drei Sphäroidgruppen die tumorassoziierten Gewebesphäroide den kleinsten mittleren Durchmesser aufwiesen, könnte folglich mit der Anwesenheit der löslichen Faktoren in dieser Gruppe erklärt werden.

Obwohl Wang *et al.* und Chandler *et al.* gezeigt haben, dass in Sphäroiden aus hASCs, die in tumorkonditioniertem Medium gezüchtet wurden, mehr EZM im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Kontrollmedium gebildet wurde [20, 205], war in unseren Versuchen kein Unterschied in der EZM-Menge zwischen tumorassoziierten Gewebesphäroiden und Kontroll-Gewebesphäroiden zu erkennen. Jedoch war die EZM-Verteilung anders, denn Kollagen I lagerte sich bevorzugt am Rand der tumorassoziierten Gewebesphäroide ab und war mit dem Myofibroblastenmarker α -SMA kolokalisiert, während sich in den Kontroll-Gewebesphäroiden ein gleichmäßiges Kollagen-I- und ein eher diffuses α -SMA-Signal zeigten (s. Abb. 6.9). Die abweichende Verteilung der Myofibroblasten und damit auch der EZM in den tumorassoziierten Gewebesphäroiden lag somit vermutlich an der Anwesenheit der löslichen Faktoren im TCM. Dass in den tumorassoziierten Gewebesphäroiden genauso wenig EZM zu erkennen war wie in den Kontroll-Gewebesphäroiden, legte die Vermutung nahe, dass die charakteristisch erhöhte EZM-Deposition an Tag 5 in den 3D-Tumorsphäroiden nur durch das Zusammenspiel von hASCs mit Tumorzellen möglich war. Insgesamt ergaben sich also deutliche Unterschiede im Aufbau der Mikroumgebung zwischen tumorassoziierten Gewebesphäroiden aus hASCs, die mit löslichen Faktoren interagieren und Tumorsphäroiden, die sich von den tumorassoziierten Gewebesphäroiden nur durch die Anwesenheit von

Tumorzellen unterscheiden. Daraus lässt sich erkennen, wie wichtig es ist, die Mikroumgebung im *in-vitro*-Modell so exakt wie möglich abzubilden.

EZM-Proteine werden insgesamt bevorzugt im Randbereich von Tumorsphäroiden abgelagert, weil Zellen dort nahezu unter 2D-Konditionen wachsen können, in direktem Kontakt zu Kulturmedium und folglich mit unbegrenztem Angebot an Nährstoffen und Sauerstoff [3]. Zellen, die am Rand sitzen, erfahren zudem andere mechanische Kräfte als Zellen im Sphäroidinneren. Tse *et al.* zeigten in ihrem 2D-Modell, dass mechanische Kräfte, die auf 67NR-Brustkrebszellen einwirkten, deren Fähigkeit zur Migration erhöhten. Gleichzeitig wurde vermehrt Fibronektin an der Grenzfläche zwischen Zellen und Substrat gebildet [213]. Dass die Ausprägung dieser Charakteristika auch in dem etablierten 3D-Sphäroidmodell vorhanden war, zeigten die Analysen nach 5 Tagen Kulturdauer, in denen eine deutliche Konzentration der EZM im Randbereich der Sphäroide zu beobachten war. Die Fibrosierung nahm im zeitlichen Kulturverlauf insbesondere in den 3D-Tumorsphäroiden zu, passend zu Berichten von Acerbi *et al.*, die zeigten, dass Kollagen I im Lauf der Entwicklung von Brustkrebs verstärkt abgelagert wird [27].

Auf Hellfeldaufnahmen der ganzen Sphäroide sowie auf den H.E.-Übersichtsaufnahmen war eine unterschiedliche Randmorphologie der Sphäroide zu erkennen. So zeichneten sich die Gewebesphäroide durch einen glatten, scharf begrenzten Rand aus, während in der Peripherie der 3D-Tumorsphäroide Zellen locker auflagen. Der direkte Vergleich ließ die Vermutung zu, dass es sich bei den randständigen Zellen in den 3D-Tumorsphäroiden um Tumorzellen gehandelt haben könnte. Dass in unserem NANOG-Experiment insbesondere die randständigen Zellen grün fluoresziert hatten und folglich einen Stammzellmarker exprimierten, der spezifisch für Tumorzellen ist, bestätigte diese Hypothese. Weiterhin wäre es möglich, die randständigen Zellen in höherer Vergrößerung zu betrachten, um tumorspezifische morphologische Charakteristika wie Zell- und Kernpolymorphie sowie atypische Mitosefiguren zu untersuchen [214]. Anhand der Beobachtungen von Peela *et al.*, die in ihrem Hydrogel-Sphäroidmodell feststellten, dass sich MDA-MB-231 Brustkrebszellen – im Gegensatz zur weit weniger aggressiven Zelllinie MCF7 – ab Tag 3 in Kultur

verstärkt in der Sphäroidperipherie abgelagerten und einen invasiven Phänotyp annahmen [215], könnte es sich auch in unseren 3D-Tumorsphäroiden bei den randständigen Zellen um Tumorzellen der Invasionsfront gehandelt haben. Um diese Vermutung zu überprüfen, könnte in einem nächsten Schritt beispielsweise der von Vinci *et al.* beschriebene Invasionsassay, bei dem die Invasion von Zellen aus dem Sphäroid in Matrigel® getestet wird, auf das etablierte Modell angewendet werden [33]. In den NANOG-Tumorsphäroiden ließen sich darüber hinaus Tumorstammzelleigenschaften in den invasiven Zellen untersuchen.

Die Rekapitulation von Tumorstammzelleigenschaften stellt einen weiteren wichtigen Aspekt in der Etablierung des Tumormodells dar. Aus der Literatur ist bekannt, dass CSCs in besonderem Maße mit der EZM interagieren und sich deshalb bevorzugt an der Schnittstelle zwischen Tumor und EZM anlagern [216]. Diese Charakteristika konnten auch in unserem Modell dargestellt werden, denn an Tag 5 war NANOG zusammen mit EZM-Proteinen hauptsächlich in der Sphäroidperipherie zu finden. Ein möglicher Grund dafür, dass die Tumorzellen einen CSC-Phänotyp annahmen, könnte der Verlust epithelialer Eigenschaften gewesen sein. Wang *et al.* zeigten in Tumorsphäroiden aus BT-20-Brustkrebszellen, dass viele Tumorstammzellen den Prozess der EMT durchlaufen hatten [191]. Auch Aktas *et al.* beobachteten, dass im Spenderblut von Brustkrebspatientinnen die Mehrheit der CSCs gleichzeitig Tumorstammzelleigenschaften und Eigenschaften der EMT aufwies [176]. Für die Darstellung dieser Charakteristika im etablierten Modell wäre es also darüber hinaus sinnvoll, Marker der EMT auch in den NANOG-Tumorsphäroiden zu untersuchen (z.B. erhöhte Expression von α -SMA und N-Cadherin bzw. reduziertes Vorkommen von E-Cadherin [217]).

Zellen, die die EMT durchlaufen haben, also CAFs, können im Kontext von Tumoren wiederum mitverantwortlich für die Ablagerung profibrotischer EZM-Proteine sein [20]. In unseren Experimenten war die Korrelation zwischen NANOG und Kollagen I deutlicher zu erkennen als zwischen NANOG und Fibronektin. Passend dazu entwickelte sich Kollagen I zwischen Tag 3 und Tag 5 in unseren Tumorsphäroiden schneller als Fibronektin, obwohl Fibronektin Kollagen I bekanntermaßen in der Entwicklung als Grundgerüst dient [206, 218].

Diese Beobachtungen ließen die Vermutung zu, dass für die Kollagen-I-Ablagerung lediglich wichtig ist, dass Fibronectin vorhanden ist, nicht aber wie viel. Deshalb kann Fibronectin allenfalls eine Initiatorfunktion zugerechnet werden. Die Erkenntnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Wang *et al.*, die herausfanden, dass Fibronectin durch die Freilegung kryptischer Bindungsstellen ein Grundgerüst für die Ablagerung von Kollagen I zur Verfügung stellt. Später tritt Fibronectin jedoch in den Hintergrund, sodass Kollagen I die primäre Rolle in der Mechanotransduktion von Signalen aus dem veränderten Tumorstroma zu übernehmen scheint [205].

Aus der Literatur ist zudem bekannt, dass isoliert betrachtet sowohl profibrotische EZM als auch Tumorstammzellen die Aggressivität von Tumoren erhöhen [89, 174, 175, 195]. Dass die beiden Faktoren im etablierten Modell zusammenhängen, zeigte die Kolo-kalisation von EZM-Proteinen und GFP-exprimierenden Tumorstammzellen. Wie sie sich jedoch gegenseitig in der Ausbildung eines aggressiven Phänotyps beeinflussen, ist noch nicht abschließend geklärt. Erste Ansätze lassen eine verstärkte Mechanotransduktion ausgehend von einer steifen, profibrotischen EZM vermuten [219]. Begum *et al.* identifizierten im Fall des Pankreaskarzinoms die Aktivierung des Signaltransduktionsmoleküls FAK als ursächlich für das durch Kollagen I hervorgerufene erhöhte Vorkommen von CSCs, indem sie phosphoryliertes Tyrosin-397 als Marker verwendeten [192]. Weiterführende Untersuchungen zur Mechanotransduktion und insbesondere zur FAK-Aktivität könnten diesen Aspekt am Sphäroidmodell näher beleuchten.

Trotzdem bleibt das etablierte 3D-Mikrotumormodell ein Modell und ist nicht in der Lage, die vielschichtige Krankheit Brustkrebs exakt *in vitro* abzubilden. Mehrere Aspekte stellen Limitationen des Modells dar. So führte die Wahl der benutzten Zelllinie dazu, dass die Ergebnisse nicht uneingeschränkt in die *in-vivo*-Situation übertragen werden können. Die verwendete MDA-MB-231-Tumorzelllinie vermag zwar wichtige Eigenschaften eines aggressiven (TNBC) Brustkrebs-Typs in die *in-vitro*-Situation zu übertragen. Viele der in der Forschung verwendeten Zelllinien waren jedoch vor Jahrzehnten als Modell-Zelllinien gewonnen worden und wurden seither auf flachen Oberflächen erhalten

bzw. im gefrorenen Zustand aufbewahrt. Diese Zelllinien enthalten dementsprechend bevorzugt diejenigen Tumor-Subklone, die am besten an diese (realitätsfernen) 2D-Bedingungen angepasst sind [6]. In neuen Ansätzen wird deshalb die Verwendung von patienteneigenen primären Tumorzellen für die Entwicklung von 3D-Modellen erforscht. Bedeutender Vorteil ist die Möglichkeit, das gleiche Tumormodell sowohl *in vitro* als auch *in vivo* verwenden zu können [8]. Dadurch erhofft man sich, bessere Erkenntnisse über patientenindividuelles Therapieanschlagen und individuelle Tumorthérapien zu erhalten [34]. Aufgrund des limitierten Zugangs zu solchen primären Tumorzellen eignet sich die Methode jedoch nicht für Massentests [10].

Das etablierte 3D-Mikrotumormodell hat zwar noch Schwächen, nichtsdestotrotz kann es einige wichtige Kernaspekte der Tumorzellen und ihrer Mikroumgebung realitätsnah *in vitro* wiedergeben. Insgesamt ist die Suche nach einem idealen Modell für die Krebsforschung zwar noch lange nicht abgeschlossen. Das etablierte Modell bietet jedoch eine vielversprechende Grundlage, deren Weiterentwicklung in Zukunft potentiell in der Tumor- und Medikamentenforschung Anwendung finden kann.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Brustkrebs ist eine der häufigsten Krebserkrankungen der Frau und zeichnet sich sowohl durch histologische als auch durch molekulare Heterogenität aus. Je nach Subtyp ergeben sich sehr unterschiedliche Prognosen in Bezug auf die Überlebensraten der Patientinnen [220]. Zudem ist die Entwicklung einer fibrotisch veränderten Tumormikroumgebung sowie die Anwesenheit von Tumorstammzellen von prognostischer Bedeutung [174, 221]. Wie genau sich diese beiden Faktoren gegenseitig regulieren und beeinflussen, ist bis heute jedoch nicht geklärt. Um auch aggressive Krebserkrankungen therapieren zu können, ist es unabdingbar, die zugrundeliegenden zellulären und molekularen Vorgänge zu identifizieren und in die Medikamentenforschung einzubeziehen.

Konventionelle 2D-Monolayer-Modelle stellen zwar eine vergleichsweise einfache Methode zur *in-vitro*-Kultivierung von Tumorzellen dar, zeigen jedoch deutliche Limitationen im Hinblick auf die adäquate Darstellung einiger tumorspezifischer Aspekte. Deshalb war das Ziel dieser Arbeit, ein 3D-Mikrotumormodell herzustellen, das die oben genannten Aspekte von Brustkrebs möglichst *in-vivo*-ähnlich rekapitulieren kann. Um die Auswirkungen der Komponenten (Tumorzellen, Stromazellen und lösliche Faktoren) einzeln und getrennt voneinander analysieren zu können, wurden drei Gruppen von Sphäroiden gezüchtet: Aus MDA-MB-231-Brustkrebszellen des aggressiven TNBC-Subtyps wurden zusammen mit stromalen hASCs in der Liquid-Overlay-Technik 3D-Tumorsphäroide (Tumor-hASC-Co) hergestellt. Darüber hinaus wurden stromale hASCs alleine in Kontrollmedium (Kontroll-Gewebesphäroide/hASC-Mono) sowie in tumorkonditioniertem Medium (tumorassoziierte Gewebesphäroide/hASC-Mono-TCM), das die von Tumorzellen sezernierten löslichen Faktoren beinhaltet, gezüchtet. Damit konnte in den 3D-Tumorsphäroiden die EZM-Bildung in Anwesenheit von Tumorzellen und löslichen Faktoren untersucht werden. Die tumorassoziierten Gewebesphäroide ermöglichten die Erforschung der alleinigen Auswirkungen von löslichen Faktoren. Außerdem wurde der Beitrag zur EZM-Bildung von stromalen Zellen in Monokultur in den Kontrollsphäroiden untersucht.

Nach drei Tagen Kulturdauer hatte sich erstaunlicherweise in den 3D-Tumorsphäroiden weniger EZM gebildet als in den Gewebesphäroiden. Die Fibrosierung nahm von Tag 3 zu Tag 5 aber vor allem im Randbereich der 3D-Tumorsphäroide zu, sodass sich dort zum späteren Kulturzeitpunkt das erwartete erhöhte Vorkommen profibrotischer EZM-Proteine zeigte. Grund dafür war vermutlich die Anwesenheit der Brustkrebszellen in den 3D-Tumorsphäroiden.

Generell fördern die im TCM enthaltenen löslichen Faktoren die Ausbildung einer fibrotischen EZM [20]. Obwohl die hASCs in den tumorassoziierten Gewebesphäroiden unter dem Einfluss der löslichen Faktoren standen, zeigte sich keine vermehrte Ablagerung von EZM-Proteinen im Vergleich zu den Kontroll-Gewebesphäroiden. Dagegen war die Verteilung der EZM anders, denn Kollagen I war insbesondere in der Peripherie der tumorassoziierten Gewebesphäroide zusammen mit dem Myofibroblastenmarker α -SMA zu finden. Die Kolo-kalisation war durchaus zu erwarten, denn CAFs exprimieren im Kontext von Tumoren bekanntermaßen den Großteil der profibrotischen EZM [143].

Die beobachteten Unterschiede in der EZM-Menge und -Verteilung zwischen Tumor- und Gewebesphäroiden verdeutlichte noch einmal die Notwendigkeit, Zellen und Mikroumgebung möglichst *in-vivo*-ähnlich zu rekapitulieren. Das etablierte Modell ermöglichte es zudem, den Einfluss von hASCs, löslichen Faktoren und Tumorzellen auch losgelöst voneinander zu betrachten.

Mithilfe der etablierten MDA-MB-231:NANOG-GFP-Zelllinie wurde in einem abschließenden Versuchsteil das Vorkommen von Tumorstammzellen in den 3D-Mikrotumoren untersucht und im Kontext mit der EZM lokalisiert. Nach drei Tagen Kulturdauer war wenig EZM homogen in den Sphäroiden verteilt, an Tag 5 fluoreszierten Fibronectin, Kollagen I und NANOG gemeinsam bevorzugt am Rand der Sphäroide. Wie aus der Literatur bekannt ist, bedingen sowohl die fibrotisch veränderte EZM als auch die Anwesenheit von Tumorstammzellen isoliert eine erhöhte Aggressivität von Tumoren *in vivo* [89, 175]. Dass NANOG und die profibrotische EZM in unseren 3D-Tumorsphäroiden kolo-kalisiert waren, unterstützte die Vermutung, dass beide sich gegenseitig in der Ausbildung eines aggressiven Phänotyps beeinflussen. Weiterführende Forschung zu diesem

Thema dürfte in Zukunft präzisere Erkenntnisse darüber liefern, wie genau sich EZM und CSCs beeinflussen. So bleibt zu klären, ob primär die pathologische EZM die Ausbildung von CSCs fördert oder eher die Anwesenheit von CSCs erst die Entwicklung einer tumorfördernden EZM bedingt.

Das etablierte 3D-Mikrotumormodell rekapituliert Teile der profibrotischen EZM sowie Tumorstammzellcharakteristika und damit einige wichtige Eigenschaften von Brustkrebs, die aus früheren Studien bekannt sind. Durch die Testung weiterer tumorspezifischer EZM-Proteine, zusätzlicher Tumormarker und funktioneller Assays beispielsweise zur Tumorzellinvasion sollten zusätzliche zentrale Aspekte von Brustkrebs am Modell untersucht werden. Bei entsprechender Weiterentwicklung könnte das Modell so in Zukunft als potentiell Instrument in der Tumorforschung genutzt werden und dort beispielsweise für die Wirkstofftestung neuer Substanzen herangezogen werden.

9 Literaturverzeichnis

1. Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., and Jemal, A., *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(2): p. 87-108.
2. Redig, A.J. and McAllister, S.S., *Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis*. J Intern Med, 2013. **274**(2): p. 113-126.
3. Zanoni, M., Piccinini, F., Arienti, C., Zamagni, A., Santi, S., Polico, R., Bevilacqua, A., and Tesei, A., *3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained*. Sci Rep, 2016. **6**: 19103.
4. Gencoglu, M.F., Barney, L.E., Hall, C.L., Brooks, E.A., Schwartz, A.D., Corbett, D.C., Stevens, K.R., and Peyton, S.R., *Comparative Study of Multicellular Tumor Spheroid Formation Methods and Implications for Drug Screening*. ACS Biomater Sci Eng, 2018. **4**(2): p. 410-420.
5. Soysal, S.D., Tzankov, A., and Muenst, S.E., *Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer*. Pathobiology, 2015. **82**(3-4): p. 142-152.
6. Weigelt, B., Ghajar, C.M., and Bissell, M.J., *The need for complex 3D culture models to unravel novel pathways and identify accurate biomarkers in breast cancer*. Adv Drug Deliv Rev, 2014. **69-70**: p. 42-51.
7. Jovanović, B., Pickup, M.W., Chytil, A., Gorska, A.E., Johnson, K.C., Moses, H.L., and Owens, P., *TβRIII Expression in Human Breast Cancer Stroma and the Role of Soluble TβRIII in Breast Cancer Associated Fibroblasts*. Cancers (Basel), 2016. **8**(11): p. 100.
8. Edmondson, R., Broglie, J.J., Adcock, A.F., and Yang, L., *Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors*. Assay Drug Dev Technol, 2014. **12**(4): p. 207-218.
9. Pampaloni, F., Reynaud, E.G., and Stelzer, E.H.K., *The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(10): p. 839-845.
10. Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W., and Kunz-Schughart, L.A., *Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again*. J Biotechnol, 2010. **148**(1): p. 3-15.
11. Breslin, S. and O'Driscoll, L., *The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance*. Oncotarget, 2016. **7**(29): p. 45745-45756.

12. Birgersdotter, A., Sandberg, R., and Ernberg, I., *Gene expression perturbation in vitro—a growing case for three-dimensional (3D) culture systems*. *Semin Cancer Biol*, 2005. **15**(5): p. 405-412.
13. Griffith, L.G. and Swartz, M.A., *Capturing complex 3D tissue physiology in vitro*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(3): p. 211-224.
14. Yamada, K.M. and Cukierman, E., *Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D*. *Cell*, 2007. **130**(4): p. 601-610.
15. Lin, R.Z. and Chang, H.Y., *Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research*. *Biotechnol J*, 2008. **3**(9-10): p. 1172-1184.
16. Hanahan, D. and Weinberg, R.A., *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-674.
17. Li, H., Fan, X., and Houghton, J., *Tumor microenvironment: The role of the tumor stroma in cancer*. *J Cell Biochem*, 2007. **101**(4): p. 805-815.
18. Houthuijzen, J.M. and Jonkers, J., *Cancer-associated fibroblasts as key regulators of the breast cancer tumor microenvironment*. *Cancer Metastasis Rev*, 2018. **37**(4): p. 577-597.
19. Bissell, M.J. and Hines, W.C., *Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression*. *Nat Med*, 2011. **17**(3): p. 320-329.
20. Chandler, E.M., Seo, B.R., Califano, J.P., Andresen Eguiluz, R.C., Lee, J.S., Yoon, C.J., Tims, D.T., Wang, J.X., Cheng, L., Mohanan, S., Buckley, M.R., Cohen, I., Nikitin, A.Y., Williams, R.M., Gourdon, D., Reinhart-King, C.A., and Fischbach, C., *Implanted adipose progenitor cells as physicochemical regulators of breast cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(25): p. 9786-9791.
21. Shiga, K., Hara, M., Nagasaki, T., Sato, T., Takahashi, H., and Takeyama, H., *Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth*. *Cancers (Basel)*, 2015. **7**(4): p. 2443-2458.
22. Fischbach, C., Chen, R., Matsumoto, T., Schmelzle, T., Brugge, J.S., Polverini, P.J., and Mooney, D.J., *Engineering tumors with 3D scaffolds*. *Nat Methods*, 2007. **4**(10): p. 855-860.
23. Costa, E.C., de Melo-Diogo, D., Moreira, A.F., Carvalho, M.P., and Correia, I.J., *Spheroids Formation on Non-Adhesive Surfaces by Liquid Overlay Technique: Considerations and Practical Approaches*. *Biotechnol J*, 2018. **13**(1).

24. Maeda, T., Desouky, J., and Friedl, A., *Syndecan-1 expression by stromal fibroblasts promotes breast carcinoma growth in vivo and stimulates tumor angiogenesis*. *Oncogene*, 2006. **25**(9): p. 1408-1412.
25. Ishihara, S., Inman, D.R., Li, W.J., Ponik, S.M., and Keely, P.J., *Mechano-Signal Transduction in Mesenchymal Stem Cells Induces Prosaposin Secretion to Drive the Proliferation of Breast Cancer Cells*. *Cancer Res*, 2017. **77**(22): p. 6179-6189.
26. Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A., *Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion*. *Cell*, 2005. **121**(3): p. 335-348.
27. Acerbi, I., Cassereau, L., Dean, I., Shi, Q., Au, A., Park, C., Chen, Y.Y., Liphardt, J., Hwang, E.S., and Weaver, V.M., *Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM stiffening and immune cell infiltration*. *Integr Biol (Camb)*, 2015. **7**(10): p. 1120-1134.
28. Kakarala, M. and Wicha, M.S., *Implications of the Cancer Stem-Cell Hypothesis for Breast Cancer Prevention and Therapy*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(17): p. 2813-2820.
29. Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N., Pratesi, G., Petrangolini, G., Coradini, D., Pilotti, S., Pierotti, M.A., and Daidone, M.G., *Isolation and In vitro Propagation of Tumorigenic Breast Cancer Cells with Stem/Progenitor Cell Properties*. *Cancer Res*, 2005. **65**(13): p. 5506-5511.
30. Visvader, J.E. and Lindeman, G.J., *Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(10): p. 755-768.
31. Friedrich, J., Ebner, R., and Kunz-Schughart, L.A., *Experimental anti-tumor therapy in 3-D: Spheroids – old hat or new challenge?* *Int J Radiat Biol*, 2007. **83**(11-12): p. 849-871.
32. Sant, S. and Johnston, P.A., *The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery*. *Drug Discov Today Technol*, 2017. **23**: p. 27-36.
33. Vinci, M., Gowan, S., Boxall, F., Patterson, L., Zimmermann, M., Court, W., Lomas, C., Mendiola, M., Hardisson, D., and Eccles, S.A., *Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation*. *BMC Biol*, 2012. **10**: p. 29.

34. Peela, N., Truong, D., Saini, H., Chu, H., Mashaghi, S., Ham, S.L., Singh, S., Tavana, H., Mosadegh, B., and Nikkhah, M., *Advanced biomaterials and microengineering technologies to recapitulate the stepwise process of cancer metastasis*. *Biomaterials*, 2017. **133**: p. 176-207.
35. Baker, B.M. and Chen, C.S., *Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues*. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 13): p. 3015-3024.
36. Cox, T.R. and Eler, J.T., *Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer*. *Dis Model Mech*, 2011. **4**(2): p. 165-178.
37. Tibbitt, M.W. and Anseth, K.S., *Dynamic Microenvironments: The Fourth Dimension*. *Sci Transl Med*, 2012. **4**(160): p. 160ps124.
38. Bonnans, C., Chou, J., and Werb, Z., *Remodelling the extracellular matrix in development and disease*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(12): p. 786-801.
39. Tibbitt, M.W. and Anseth, K.S., *Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture*. *Biotechnol Bioeng*, 2009. **103**(4): p. 655-663.
40. Loessner, D., Stok, K.S., Lutolf, M.P., Hutmacher, D.W., Clements, J.A., and Rizzi, S.C., *Bioengineered 3D platform to explore cell-ECM interactions and drug resistance of epithelial ovarian cancer cells*. *Biomaterials*, 2010. **31**(32): p. 8494-8506.
41. Shiras, A., Bhosale, A., Patekar, A., Shepal, V., and Shastry, P., *Differential expression of CD44(S) and variant isoforms v3, v10 in three-dimensional cultures of mouse melanoma cell lines*. *Clin Exp Metastasis*, 2002. **19**(5): p. 445-455.
42. L'Espérance, S., Bachvarova, M., Tetu, B., Mes-Masson, A.M., and Bachvarov, D., *Global gene expression analysis of early response to chemotherapy treatment in ovarian cancer spheroids*. *BMC Genomics*, 2008. **9**: p. 99.
43. Weiswald, L.B., Bellet, D., and Dangles-Marie, V., *Spherical cancer models in tumor biology*. *Neoplasia*, 2015. **17**(1): p. 1-15.
44. Thoma, C.R., Zimmermann, M., Agarkova, I., Kelm, J.M., and Krek, W., *3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014. **69-70**: p. 29-41.
45. Trédan, O., Galmarini, C.O., Patel, K., and Tannock, I.F., *Drug Resistance and the Solid Tumor Microenvironment*. *J Natl Cancer Inst*, 2007. **99**(19): p. 1441-1454.

46. Weigelt, B., Lo, A.T., Park, C.C., Gray, J.W., and Bissell, M.J., *HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **122**(1): p. 35-43.
47. Torisawa, Y.S., Takagi, A., Shiku, H., Yasukawa, T., and Matsue, T., *A multicellular spheroid-based drug sensitivity test by scanning electrochemical microscopy*. Oncol Rep, 2005. **13**(6): p. 1107-1112.
48. Smyrek, I., Mathew, B., Fischer, S.C., Lissek, S.M., Becker, S., and Stelzer, E.H.K., *E-cadherin, actin, microtubules and FAK dominate different spheroid formation phases and important elements of tissue integrity*. Biology Open, 2018: bio.037051.
49. Powan, P., Luanpitpong, S., He, X., Rojanasakul, Y., and Chanvorachote, P., *Detachment-induced E-cadherin expression promotes 3D tumor spheroid formation but inhibits tumor formation and metastasis of lung cancer cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2017. **313**(5): p. C556-C566.
50. Tian, X., Liu, Z., Niu, B., Zhang, J., Tan, T.K., Lee, S.R., Zhao, Y., Harris, D.C.H., and Zheng, G., *E-Cadherin/ β -Catenin Complex and the Epithelial Barrier*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: 567305.
51. Jang, G.B., Kim, J.Y., Cho, S.D., Park, K.S., Jung, J.Y., Lee, H.Y., Hong, I.S., and Nam, J.S., *Blockade of Wnt/ β -catenin signaling suppresses breast cancer metastasis by inhibiting CSC-like phenotype*. Sci Rep, 2015. **5**: 12465.
52. Howe, G.A. and Addison, C.L., *β 1 integrin: an emerging player in the modulation of tumorigenesis and response to therapy*. Cell Adh Migr, 2012. **6**(2): p. 71-77.
53. Zhao, X. and Guan, J.-L., *Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(8): p. 610-615.
54. Provenzano, P.P. and Keely, P.J., *Mechanical signaling through the cytoskeleton regulates cell proliferation by coordinated focal adhesion and Rho GTPase signaling*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 8): p. 1195-1205.
55. Kenny, P.A., Lee, G.Y., and Bissell, M.J., *Targeting the tumor microenvironment*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 3468-3474.
56. Regier, M.C., Alarid, E.T., and Beebe, D.J., *Progress towards understanding heterotypic interactions in multi-culture models of breast cancer*. Integr Biol (Camb), 2016. **8**(6): p. 684-692.

57. Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., Qian, Z.R., Du, J., Davis, A., Mongare, M.M., Gould, J., Frederick, D.T., Cooper, Z.A., Chapman, P.B., Solit, D.B., Ribas, A., Lo, R.S., Flaherty, K.T., Ogino, S., Wargo, J.A., and Golub, T.R., *Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion*. *Nature*, 2012. **487**(7408): p. 500-504.
58. Maeda, T., Alexander, C.M., and Friedl, A., *Induction of Syndecan-1 Expression in Stromal Fibroblasts Promotes Proliferation of Human Breast Cancer Cells*. *Cancer Res*, 2004. **64**(2): p. 612-621.
59. Guo, S. and Deng, C.X., *Effect of Stromal Cells in Tumor Microenvironment on Metastasis Initiation*. *Int J Biol Sci*, 2018. **14**(14): p. 2083-2093.
60. Salvatore, V., Teti, G., Bolzani, S., Focaroli, S., Durante, S., Mazzotti, M.C., and Falconi, M., *Simulating tumor microenvironment: changes in protein expression in an in vitro co-culture system*. *Cancer Cell Int*, 2014. **14**(40).
61. Ungefroren, H., Sebens, S., Seidl, D., Lehnert, H., and Hass, R., *Interaction of tumor cells with the microenvironment*. *Cell Commun Signal*, 2011. **9**: 18.
62. Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R., and Kunz-Schughart, L.A., *Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach*. *Nat Protoc*, 2009. **4**(3): p. 309-324.
63. Ivascu, A. and Kubbies, M., *Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis*. *J Biomol Screen*, 2006. **11**(8): p. 922-932.
64. Breslin, S. and O'Driscoll, L., *Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery*. *Drug Discov Today*, 2013. **18**(5-6): p. 240-249.
65. Fischbach, C., Seufert, J., Staiger, H., Hacker, M., Neubauer, M., Gopferich, A., and Blunk, T., *Three-dimensional in vitro model of adipogenesis: comparison of culture conditions*. *Tissue Eng*, 2004. **10**(1-2): p. 215-229.
66. Choi, J.H., Gimble, J.M., Lee, K., Marra, K.G., Rubin, J.P., Yoo, J.J., Vunjak-Novakovic, G., and Kaplan, D.L., *Adipose tissue engineering for soft tissue regeneration*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2010. **16**(4): p. 413-426.
67. Kelm, J.M., Timmins, N.E., Brown, C.J., Fussenegger, M., and Nielsen, L.K., *Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types*. *Biotechnol Bioeng*, 2003. **83**(2): p. 173-180.

68. Rodday, B., Hirschhaeuser, F., Walenta, S., and Mueller-Klieser, W., *Semiautomatic Growth Analysis of Multicellular Tumor Spheroids*. J Biomol Screen, 2011. **16**(9): p. 1119-1124.
69. Gupta, P., Ismadi, M.-Z., Verma, P.J., Fouras, A., Jadhav, S., Bellare, J., and Hourigan, K., *Optimization of agitation speed in spinner flask for microcarrier structural integrity and expansion of induced pluripotent stem cells*. Cytotechnology, 2016. **68**(1): p. 45-59.
70. Hirschhaeuser, F., Leidig, T., Rodday, B., Lindemann, C., and Mueller-Klieser, W., *Test system for trifunctional antibodies in 3D MCTS culture*. J Biomol Screen, 2009. **14**(8): p. 980-990.
71. Barrila, J., Radtke, A.L., Crabbé, A., Sarker, S.F., Herbst-Kralovetz, M.M., Ott, C.M., and Nickerson, C.A., *Organotypic 3D cell culture models: using the rotating wall vessel to study host-pathogen interactions*. Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(11): p. 791-801.
72. Radtke, A.L. and Herbst-Kralovetz, M.M., *Culturing and Applications of Rotating Wall Vessel Bioreactor Derived 3D Epithelial Cell Models*. J Vis Exp, 2012(62): p. 3868.
73. Nguyen, K.T. and West, J.L., *Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications*. Biomaterials, 2002. **23**(22): p. 4307-4314.
74. Greiner, A.M., Richter, B., and Bastmeyer, M., *Micro-Engineered 3D Scaffolds for Cell Culture Studies*. Macromol Biosci, 2012. **12**(10): p. 1301-1314.
75. Kleinman, H.K. and Martin, G.R., *Matrigel: basement membrane matrix with biological activity*. Semin Cancer Biol, 2005. **15**(5): p. 378-386.
76. Chandler, E.M., Berglund, C.M., Lee, J.S., Polacheck, W.J., Gleghorn, J.P., Kirby, B.J., and Fischbach, C., *Stiffness of photocrosslinked RGD-alginate gels regulates adipose progenitor cell behavior*. Biotechnol Bioeng, 2011. **108**(7): p. 1683-1692.
77. Sodunke, T.R., Turner, K.K., Caldwell, S.A., McBride, K.W., Reginato, M.J., and Noh, H.M., *Micropatterns of Matrigel for three-dimensional epithelial cultures*. Biomaterials, 2007. **28**(27): p. 4006-4016.
78. Sung, K.E. and Beebe, D.J., *Microfluidic 3D models of cancer*. Adv Drug Deliv Rev, 2014. **79-80**: p. 68-78.
79. van Duinen, V., Trietsch, S.J., Joore, J., Vulto, P., and Hankemeier, T., *Microfluidic 3D cell culture: from tools to tissue models*. Curr Opin Biotechnol, 2015. **35**: p. 118-126.

80. Nelson, C.M., VanDuijn, M.M., Inman, J.L., Fletcher, D.A., and Bissell, M.J., *Tissue Geometry Determines Sites of Mammary Branching Morphogenesis in Organotypic Cultures*. *Science*, 2006. **314**(5797): p. 298-300.
81. Lee, V.K., Kim, D.Y., Ngo, H., Lee, Y., Seo, L., Yoo, S., Vincent, P.A., and Dai, G., *Creating perfused functional vascular channels using 3D bio-printing technology*. *Biomaterials*, 2014. **35**(28): p. 8092-8102.
82. Halldorsson, S., Lucumi, E., Gomez-Sjoberg, R., and Fleming, R.M.T., *Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices*. *Biosens Bioelectron*, 2015. **63**: p. 218-231.
83. Rimann, M. and Graf-Hausner, U., *Synthetic 3D multicellular systems for drug development*. *Curr Opin Biotechnol*, 2012. **23**(5): p. 803-809.
84. Yu, M., Bardia, A., Aceto, N., Bersani, F., Madden, M.W., Donaldson, M.C., Desai, R., and Zhu, H., *Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility*. *Science*, 2014. **345**(6193): p. 216-220.
85. Welsch, U., Kummer, W. (Hrsg.), Deller, T., *Histologie - Das Lehrbuch*. 5. Auflage. 2018, München: Urban & Fischer Verlag. S. 553.
86. Bissell, M.J. and Radisky, D., *Putting tumours in context*. *Nature*, 2001. **1**: p. 46-54.
87. Nelson, C.M. and Bissell, M.J., *Modeling dynamic reciprocity: engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation*. *Semin Cancer Biol*, 2005. **15**(5): p. 342-352.
88. Gudjonsson, T., Adriance, M.C., Sternlicht, M.D., Petersen, O.W., and Bissell, M.J., *Myoepithelial cells: their origin and function in breast morphogenesis and neoplasia*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2005. **10**(3): p. 261-272.
89. Insua-Rodríguez, J. and Oskarsson, T., *The extracellular matrix in breast cancer*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016. **97**: p. 41-55.
90. Bissell, M.J., Hall, H.G., and Parry, G., *How Does the Extracellular Matrix Direct Gene Expression?* *J Theor Biol*, 1982. **99**(1): p. 31-68.
91. Barrila, J., Crabbé, A., Yang, J., Franco, K., and Nydam, S.D., *Modeling Host-Pathogen Interactions in the Context of the Microenvironment: Three-Dimensional Cell Culture Comes of Age*. *Infect Immun*, 2018. **86**(11): e00282-18.
92. Welsch, U., Kummer, W. (Hrsg.), Deller, T., *Histologie - Das Lehrbuch*. 5. Auflage. 2018, München: Urban & Fischer Verlag. S. 121.

93. Ohashi, T. and Erickson, H.P., *Fibronectin aggregation and assembly: the unfolding of the second fibronectin type III domain*. J Biol Chem, 2011. **286**(45): p. 39188-39199.
94. Bachman, H., Nicosia, J., Dysart, M., and Barker, T.H., *Utilizing Fibronectin Integrin-Binding Specificity to Control Cellular Responses*. Adv Wound Care, 2015. **4**(8): p. 501-511.
95. Park, J. and Schwarzbauer, J.E., *Mammary epithelial cell interactions with fibronectin stimulate epithelial-mesenchymal transition*. Oncogene, 2014. **33**(13): p. 1649-1657.
96. Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S.R., Anuradha, E., and Solomon, F.D., *3D cell culture systems: advantages and applications*. J Cell Physiol, 2015. **230**(1): p. 16-26.
97. Welsch, U., Kummer, W. (Hrsg.), Deller, T., *Histologie - Das Lehrbuch*. 5. Auflage. 2018, München: Urban & Fischer Verlag. S. 123.
98. Gordon, M.K. and Hahn, R.A., *Collagens*. Cell Tissue Res, 2010. **339**(1): p. 247-257.
99. Shoulders, M.D. and Raines, R.T., *Collagen Structure and Stability*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**(1): p. 929-958.
100. Shi, F., Harman, J., Fujiwara, K., and Sottile, J., *Collagen I matrix turnover is regulated by fibronectin polymerization*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **298**(5): p. C1265-1275.
101. Arendt, L.M., Rudnick, J.A., Keller, P.J., and Kupferwasser, C., *Stroma in Breast Development and Disease*. Semin Cell Dev Biol, 2010. **21**(1): p. 11-18.
102. Junttila, M.R. and de Sauvage, F.J., *Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response*. Nature, 2013. **501**(7467): p. 346-354.
103. Yoshimura, K., Suga, H., and Eto, H., *Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation*. Regen Med, 2009. **4**(2): p. 265-273.
104. Makki, J., *Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance*. Clin Med Insights Pathol, 2015. **8**: p. 23-31.
105. Truong, D., Puleo, J., Llave, A., Mouneimne, G., Kamm, R.D., and Nikkhah, M., *Breast Cancer Cell Invasion into a Three Dimensional Tumor-Stroma Microenvironment*. Sci Rep, 2016. **6**: 34094.
106. Vargo-Gogola, T. and Rosen, J.M., *Modelling breast cancer: one size does not fit all*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(9): p. 659-672.

107. Mao, Y., Keller, E.T., Garfield, D.H., Shen, K., and Wang, J., *Stroma Cells in Tumor Microenvironment and Breast Cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 2013. **32**(1-2): p. 303-315.
108. Kao, J., Salari, K., Bocanegra, M., Choi, Y.L., Girard, L., Gandhi, J., Kwei, K.A., Hernandez-Boussard, T., Wang, P., Gazdar, A.F., Minna, J.D., and Pollack, J.R., *Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery*. *PLoS One*, 2009. **4**(7): p. e6146.
109. Chavez, K.J., Garimella, S.V., Lipkowitz, S., Eng-Wong, J., and Zujewski, J.A., *Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer*. *Breast Dis*, 2010. **32**(1-2): p. 35-48.
110. Hudis, C.A. and Gianni, L., *Triple-negative breast cancer: an unmet medical need*. *Oncologist*, 2011. **16 Suppl 1**: p. 1-11.
111. Dean-Colomb, W. and Esteva, F.J., *Her2-positive breast cancer: herceptin and beyond*. *Eur J Cancer*, 2008. **44**(18): p. 2806-2812.
112. Badve, S. and Nakshatri, H., *Oestrogen-receptor-positive breast cancer: towards bridging histopathological and molecular classifications*. *J Clin Pathol*, 2009. **62**(1): p. 6-12.
113. Degenhardt, T., Harbeck, N., and Würstlein, R., *Individuelle Tumorthherapie beim Mammakarzinom – Möglichkeiten der Vermeidung von Über- und Untertherapie unter besonderer Berücksichtigung zielgerichteter Therapien*. *Deutsche Zeitschrift für Onkologie*, 2015. **47**(02): p. 57-65.
114. de Kruijf, E.M., H., v.N.J.G., van de Velde, C.J.H., Putter, H., Smit, V.T.H.B.M., Liefers, G.J., Kuppen, P.J.K., Tollenaar, R.A.E.M., and Mesker, W.E., *Tumor-stroma ratio in the primary tumor is a prognostic factor in early breast cancer patients, especially in triple-negative carcinoma patients*. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. **125**(3): p. 687-696.
115. Hanahan, D. and Coussens, L.M., *Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment*. *Cancer Cell*, 2012. **21**(3): p. 309-322.
116. Balis, F.M., *Evolution of anticancer drug discovery and the role of cell-based screening*. *J Natl Cancer Inst*, 2002. **94**(2): p. 78-79.
117. Rich, A.R., *On the frequency of occurrence of occult carcinoma of the prostate*. *Int J Epidemiol*, 2007. **36**(2): p. 274-277.
118. Folkman, J. and Kalluri, R., *Cancer without disease*. *Nature*, 2004. **427**(6977): p. 787.

119. Terada, M., Adachi, Y., Sawaki, M., Hattori, M., Yoshimura, A., Naomi, G., Kotani, H., Iwase, M., Kataoka, A., Onishi, S., Sugino, K., Mori, M., Horisawa, N., Sasaki, E., Yatabe, Y., and Iwata, H., *Occult breast cancer may originate from ectopic breast tissue present in axillary lymph nodes*. Breast Cancer Res Treat, 2018. **172**(1): p. 1-7.
120. Schaefer, M.H. and Serrano, L., *Cell type-specific properties and environment shape tissue specificity of cancer genes*. Sci Rep, 2016. **6**: 20707.
121. Romagnolo, A.P.G., Romagnolo, D.F., and Selmin, O.I., *BRCA1 as Target for Breast Cancer Prevention and Therapy*. Anticancer Agents Med Chem, 2015. **15**(1): p. 4-14.
122. Potter, J.D., *Morphogens, morphostats, microarchitecture and malignancy*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(6): p. 464-474.
123. Chaturvedi, P., Gilkes, D.M., Wong, C.C., Luo, W., Zhang, H., Wei, H., Naoharu, T., Schito, L., Levchenko, A., and Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factor-dependent breast cancer-mesenchymal stem cell bidirectional signaling promotes metastasis*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 189-205.
124. Glentis, A., Oertle, P., Mariani, P., Chikina, A., El Marjou, F., Attieh, Y., Zaccarini, F., Lae, M., Loew, D., Dingli, F., Sirven, P., Schoumacher, M., Gurchenkov, B.G., Plodinec, M., and Vignjevic, D.M., *Cancer-associated fibroblasts induce metalloprotease-independent cancer cell invasion of the basement membrane*. Nat Commun, 2017. **8**(1): 924.
125. Finak, G., Bertos, N., Pepin, F., Sadekova, S., Souleimanova, M., Zhao, H., Chen, H., Omeroglu, G., Meterissian, S., Omeroglu, A., Hallett, M., and Park, M., *Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer*. Nat Med, 2008. **14**(5): p. 518-527.
126. Boyd, N.F., Guo, H., Martin, L.J., Sun, L., Stone, J., Fishell, E., Jong, R.A., Hislop, G., Chiarelli, A., Minkin, S., and Yaffe, M.J., *Mammographic Density and the Risk and Detection of Breast Cancer*. N Engl J Med, 2007. **356**(3): p. 227-236.
127. Balkwill, F.R., Capasso, M., and Hagemann, T., *The tumor microenvironment at a glance*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 23): p. 5591-5596.
128. Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R.A., *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(5): p. 349-363.

129. Levental, K.R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J.N., Egeblad, M., Erler, J.T., Fong, S.F., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., Yamauchi, M., Gasser, D.L., and Weaver, V.M., *Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling*. Cell, 2009. **139**(5): p. 891-906.
130. Song, Y.H., Warncke, C., Choi, S.J., Choi, S., Chiou, A.E., Ling, L., Liu, H.Y., Daniel, S., Antonyak, M.A., Cerione, R.A., and Fischbach, C., *Breast cancer-derived extracellular vesicles stimulate myofibroblast differentiation and pro-angiogenic behavior of adipose stem cells*. Matrix Biol, 2017. **60-61**: p. 190-205.
131. Erler, J.T. and Weaver, V.M., *Three-dimensional context regulation of metastasis*. Clin Exp Metastasis, 2009. **26**(1): p. 35-49.
132. Egeblad, M., Rasch, M.G., and Weaver, V.M., *Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution*. Curr Opin Cell Biol, 2010. **22**(5): p. 697-706.
133. Bae, Y.K., Kim, A., Kim, M.K., Choi, J.E., Kang, S.H., and Lee, S.J., *Fibronectin expression in carcinoma cells correlates with tumor aggressiveness and poor clinical outcome in patients with invasive breast cancer*. Hum Pathol, 2013. **44**(10): p. 2028-2037.
134. Wang, J.P. and Hielscher, A., *Fibronectin: How Its Aberrant Expression in Tumors May Improve Therapeutic Targeting*. J Cancer, 2017. **8**(4): p. 674-682.
135. De Wever, O., Demetter, P., Mareel, M., and Bracke, M., *Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth*. Int J Cancer, 2008. **123**(10): p. 2229-2238.
136. Darby, I.A., Laverdet, B., Bonte, F., and Desmouliere, A., *Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing*. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2014. **7**: p. 301-311.
137. Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J.J., Gabbiani, G., and Chaponnier, C., *Alpha-Smooth Muscle Actin Expression Upregulates Fibroblast Contractile Activity*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(9): p. 2730-2741.
138. Moulin, V., Larochele, S., Langlois, C., Thibault, I., Lopez-Valle, C.A., and Roy, M., *Normal skin wound and hypertrophic scar myofibroblasts have differential responses to apoptotic inductors*. J Cell Physiol, 2004. **198**(3): p. 350-358.
139. Boyd, N.F., Rommens, J.M., Vogt, K., Lee, V., Hopper, J.L., Yaffe, M.J., and Paterson, A.D., *Mammographic breast density as an intermediate phenotype for breast cancer*. Lancet Oncol, 2005. **6**(10): p. 798-808.

140. Desmoulière, A., Guyot, C., and Gabbiani, G., *The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(5-6): p. 509-517.
141. Coussens, L.M. and Werb, Z., *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-867.
142. Nakamura, K. and Smyth, M.J., *Targeting cancer-related inflammation in the era of immunotherapy*. Immunol Cell Biol, 2017. **95**(4): p. 325-332.
143. Otranto, M., Sarrazy, V., Bonte, F., Hinz, B., Gabbiani, G., and Desmoulière, A., *The role of the myofibroblast in tumor stroma remodeling*. Cell Adh Migr, 2012. **6**(3): p. 203-219.
144. Wittmann, K. and Fischbach, C., *Contextual Control of Adipose-Derived Stem Cell Function: Implications for Engineered Tumor Models*. ACS Biomater Sci Eng, 2017. **3**(8): p. 1483-1493.
145. Radisky, D.C., Kenny, P.A., and Bissell, M.J., *Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT?* J Cell Biochem, 2007. **101**(4): p. 830-839.
146. Pollard, T.D. and Cooper, J.A., *Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement*. Science, 2009. **326**(5957): p. 1208-1212.
147. Perrin, B.J. and Ervasti, J.M., *The actin gene family: function follows isoform*. Cytoskeleton (Hoboken), 2010. **67**(10): p. 630-634.
148. Schildmeyer, L.A., Braun, R., Taffet, G., Debiase, M., Burns, A.E., Bradley, A., and Schwartz, R.J., *Impaired vascular contractility and blood pressure homeostasis in the smooth muscle α -actin null mouse*. FASEB J, 2000. **14**(14): p. 2213-2220.
149. Dugina, V., Fontao, L., Chaponnier, C., Vasiliev, J., and Gabbiani, G., *Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 18): p. 3285-3296.
150. Bochaton-Piallat, M.-L., Gabbiani, G., and Hinz, B., *The myofibroblast in wound healing and fibrosis: answered and unanswered questions*. F1000Research, 2016. **5**.
151. Yamashita, M., Ogawa, T., Zhang, X., Hanamura, N., Kashikura, Y., Takamura, M., Yoneda, M., and Shiraishi, T., *Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome*. Breast Cancer, 2012. **19**(2): p. 170-176.

152. Stylianopoulos, T., Munn, L.L., and Jain, R.K., *Reengineering the Physical Microenvironment of Tumors to Improve Drug Delivery and Efficacy: From Mathematical Modeling to Bench to Bedside*. Trends in Cancer, 2018. **4**(4): p. 292-319.
153. Heldin, C.H., Rubin, K., Pietras, K., and Ostman, A., *High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(10): p. 806-813.
154. Erdogan, B. and Webb, D.J., *Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis*. Biochem Soc Trans, 2017. **45**(1): p. 229-236.
155. Comer, K.A., Dennis, P.A., Armstrong, L., Catino, J.J., Kastan, M.B., and Kumar, C.C., *Human smooth muscle α -actin gene is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein*. Oncogene, 1998. **16**(10): p. 1299-1308.
156. Petersen, O.W., Nielsen, H.L., Gudjonsson, T., Villadsen, R., Rank, F., Niebuhr, E., Bissell, M.J., and Rønnov-Jessen, L., *Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Breast Cancer Can Provide a Nonmalignant Stroma*. Am J Pathol, 2003. **162**(2): p. 391-402.
157. Yang, J. and Weinberg, R.A., *Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis*. Dev Cell, 2008. **14**(6): p. 818-829.
158. Janda, E., Lehmann, K., Killisch, I., Jechlinger, M., Herzig, M., Downward, J., Beug, H., and Grunert, S., *Ras and TGF β cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways*. J Cell Biol, 2002. **156**(2): p. 299-313.
159. Thiery, J.P., *Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-454.
160. Mishra, P.J., Mishra, P.J., Humeniuk, R., Medina, D.J., Alexe, G., Mesirov, J.P., Ganesan, S., Glod, J.W., and Banerjee, D., *Carcinoma-Associated Fibroblast-Like Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells*. Cancer Res, 2008. **68**(11): p. 4331-4339.
161. Jotzu, C., Alt, E., Welte, G., Li, J., Hennessy, B.T., Devarajan, E., Krishnappa, S., Pinilla, S., Droll, L., and Song, Y.H., *Adipose tissue-derived stem cells differentiate into carcinoma-associated fibroblast-like cells under the influence of tumor-derived factors*. Anal Cell Pathol (Amst), 2010. **33**(2): p. 61-79.

162. Seo, B.R., Bhardwaj, P., Choi, S., Gonzalez, J., Andresen Eguiluz, R.C., Wang, K., Mohanan, S., Morris, P.G., Du, B., Zhou, X.K., Vahdat, L.T., Verma, A., Elemento, O., Hudis, C.A., Williams, R.M., Gourdon, D., Dannenberg, A.J., and Fischbach, C., *Obesity-dependent changes in interstitial ECM mechanics promote breast tumorigenesis*. *Sci Transl Med*, 2015. **7**(301): p. 301ra130.
163. Cozzo, A.J., Fuller, A.M., and Makowski, L., *Contribution of Adipose Tissue to Development of Cancer*. *Compr Physiol*, 2017. **8**(1): p. 237-282.
164. Paszek, M.J., Zahir, N., Johnson, K.R., Lakins, J.N., Rozenberg, G.I., Gefen, A., Reinhart-King, C.A., Margulies, S.S., Dembo, M., Boettiger, D., Hammer, D.A., and Weaver, V.M., *Tensional homeostasis and the malignant phenotype*. *Cancer Cell*, 2005. **8**(3): p. 241-254.
165. Goto, H., Shimono, Y., Funakoshi, Y., Imamura, Y., Toyoda, M., Kiyota, N., Kono, S., Takao, S., Mukohara, T., and Minami, H., *Adipose-derived stem cells enhance human breast cancer growth and cancer stem cell-like properties through adipisin*. *Oncogene*, 2019. **38**(6): p. 767-779.
166. Bhomwick, N.A., Chytil, A., Plieth, D., Gorska, A.E., Dumont, N., Shappell, S., Washington, M.K., Neilson, E.G., and Moses, H.L., *TGF- β Signaling in Fibroblasts Modulates the Oncogenic Potential of Adjacent Epithelia*. *Science*, 2004. **303**(5659): p. 848-851.
167. Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., and Moses, H.L., *Enhanced hepatocyte growth factor signaling by type II transforming growth factor- β receptor knockout fibroblasts promotes mammary tumorigenesis*. *Cancer Res*, 2007. **67**(10): p. 4869-4877.
168. Xu, X., Zheng, L., Yuan, Q., Zhen, G., Crane, J.L., Zhou, X., and Cao, X., *Transforming growth factor- β in stem cells and tissue homeostasis*. *Bone Res*, 2018. **6**: p. 2.
169. Waugh, D.J. and Wilson, C., *The Interleukin-8 Pathway in Cancer*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(21): p. 6735-6741.
170. Nakagawa, H., Liyanarachchi, S., Davuluri, R.V., Auer, H., Martin, E.W., Jr., de la Chapelle, A., and Frankel, W.L., *Role of cancer-associated stromal fibroblasts in metastatic colon cancer to the liver and their expression profiles*. *Oncogene*, 2004. **23**(44): p. 7366-7377.
171. Ferrara, N., Hillan, K.J., and Novotny, W., *Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **333**(2): p. 328-335.

172. Iglesias, J.M., Beloqui, I., Garcia-Garcia, F., Leis, O., Vazquez-Martin, A., Eguiara, A., Cufi, S., Pavon, A., Menendez, J.A., Dopazo, J., and Martin, A.G., *Mammosphere formation in breast carcinoma cell lines depends upon expression of E-cadherin*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e77281.
173. Atlasi, Y., Looijenga, L., and Fodde, R., *Cancer Stem Cells, Pluripotency, and Cellular Heterogeneity: A WNTer Perspective*. Curr Top Dev Biol, 2014. **107**: p. 373-404.
174. Geng, S.Q., Alexandrou, A.T., and Li, J.J., *Breast cancer stem cells: Multiple capacities in tumor metastasis*. Cancer Lett, 2014. **349**(1): p. 1-7.
175. Asiedu, M.K., Ingle, J.N., Behrens, M.D., Radisky, D.C., and Knutson, K.L., *TGF β /TNF α -mediated epithelial-mesenchymal transition generates breast cancer stem cells with a claudin-low phenotype*. Cancer Res, 2011. **71**(13): p. 4707-4719.
176. Aktas, B., Tewes, M., Fehm, T., Hauch, S., Kimmig, R., and Kasimir-Bauer, S., *Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients*. Breast Cancer Res, 2009. **11**(4): p. R46.
177. Chen, W., Dong, J., Haiech, J., Kilhoffer, M.C., and Zeniou, M., *Cancer Stem Cell Quiescence and Plasticity as Major Challenges in Cancer Therapy*. Stem Cells Int, 2016. **2016**: 1740936.
178. Piggott, L., Omidvar, N., Marti Perez, S., French, R., Eberl, M., and Clarkson, R.W., *Suppression of apoptosis inhibitor c-FLIP selectively eliminates breast cancer stem cell activity in response to the anti-cancer agent, TRAIL*. Breast Cancer Res, 2011. **13**(5): p. R88.
179. Idowu, M.O., Kmiecik, M., Dumur, C., Burton, R.S., Grimes, M.M., Powers, C.N., and Manjili, M.H., *CD44(+)/CD24(-/low) cancer stem/progenitor cells are more abundant in triple-negative invasive breast carcinoma phenotype and are associated with poor outcome*. Hum Pathol, 2012. **43**(3): p. 364-373.
180. Perou, C.M., *Molecular stratification of triple-negative breast cancers*. Oncologist, 2010. **15 Suppl 5**: p. 39-48.
181. Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H.M., Jones, L.D., Visvader, J., Weissman, I.J., and Wahl, G.M., *Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells*. Cancer Res, 2006. **66**(19): p. 9339-9344.
182. Wang, T., Shigdar, S., Gantier, M.P., Hou, Y., Wang, L., Li, Y., Al Shamaileh, H., Yin, W., Zhou, S.-F., Zhao, X., and Duan, W., *Cancer stem cell targeted therapy: progress amid controversies*. Oncotarget, 2015. **6**(42): p. 44191-44206.

183. Lombardo, Y., Scopelliti, A., Cammareri, P., Todaro, M., Iovino, F., Ricci-Vitiani, L., Gulotta, G., Dieli, F., de Maria, R., and Stassi, G., *Bone Morphogenetic Protein 4 Induces Differentiation of Colorectal Cancer Stem Cells and Increases Their Response to Chemotherapy in Mice*. *Gastroenterology*, 2011. **140**(1): p. 297-309.
184. Sandhiya, S., Melvin, G., Kumar, S.S., and Dkhar, S.A., *The dawn of hedgehog inhibitors: Vismodegib*. *J Pharmacol Pharmacother*, 2013. **4**(1): p. 4-7.
185. Liu, A., Yu, X., and Liu, S., *Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: small genes make a big difference*. *Chin J Cancer*, 2013. **32**(9): p. 483-487.
186. Pan, G. and Thomson, J.A., *Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency*. *Cell Res*, 2007. **17**(1): p. 42-49.
187. Lu, X., Mazur, S.J., Lin, T., Appella, E., and Xu, Y., *The pluripotency factor nanog promotes breast cancer tumorigenesis and metastasis*. *Oncogene*, 2014. **33**(20): p. 2655-2664.
188. Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A., *Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells*. *Cell*, 2003. **113**(5): p. 643-655.
189. Mato Prado, M., Frampton, A.E., Stebbing, J., and Krell, J., *Gene of the month: NANOG*. *J Clin Pathol*, 2015. **68**(10): p. 763-765.
190. Darr, H., Mayshar, Y., and Benvenisty, N., *Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features*. *Development*, 2006. **133**(6): p. 1193-1201.
191. Wang, D., Lu, P., Zhang, H., Luo, M., Zhang, X., Wei, X., Gao, J., Zhao, Z., and Liu, C., *Oct-4 and Nanog promote the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer stem cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients*. *Oncotarget*, 2014. **5**(21): p. 10803–10815.
192. Begum, A., Ewachiw, T., Jung, C., Huang, A., Norberg, K.J., Marchionni, L., McMillan, R., Penchev, V., Rajeshkumar, N.V., Maitra, A., Wood, L., Wang, C., Wolfgang, C., DeJesus-Acosta, A., Laheru, D., Shapiro, I.M., Padval, M., Pachter, J.A., Weaver, D.T., Rasheed, Z.A., and Matsui, W., *The extracellular matrix and focal adhesion kinase signaling regulate cancer stem cell function in pancreatic ductal adenocarcinoma*. *PLoS One*, 2017. **12**(7): e0180181.

193. Cordenonsi, M., Zanconato, F., Azzolin, L., Forcato, M., Rosato, A., Frasson, C., Inui, M., Montagner, M., Parenti, Anna R., Poletti, A., Daidone, Maria G., Dupont, S., Basso, G., Bicciato, S., and Piccolo, S., *The Hippo Transducer TAZ Confers Cancer Stem Cell-Related Traits on Breast Cancer Cells*. *Cell*, 2011. **147**(4): p. 759-772.
194. Du, W.W., Fang, L., Yang, X., Sheng, W., Yang, B.L., Seth, A., Zhang, Y., Yang, B.B., and Yee, A.J., *The role of versican in modulating breast cancer cell self-renewal*. *Mol Cancer Res*, 2013. **11**(5): p. 443-455.
195. Northey, J.J., Przybyla, L., and Weaver, V.M., *Tissue Force Programs Cell Fate and Tumor Aggression*. *Cancer Discov*, 2017. **7**(11): p. 1224-1237.
196. Matsui, W.H., *Cancer stem cell signaling pathways*. *Medicine (Baltimore)*, 2016. **95**(1 Suppl 1): p. S8-S19.
197. Korkaya, H., Liu, S., and Wicha, M.S., *Regulation of Cancer Stem Cells by Cytokine Networks: Attacking Cancer's Inflammatory Roots*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(19): p. 6125-6129.
198. Ikushima, H. and Miyazono, K., *TGF β signalling: a complex web in cancer progression*. *Nat Rev Cancer*, 2010. **10**(6): p. 415-424.
199. Schedin, P. and Keely, P.J., *Mammary Gland ECM Remodeling, Stiffness, and Mechanosignaling in Normal Development and Tumor Progression*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011. **3**(1): p. a003228.
200. Thiagarajan, P.S., Hitomi, M., Hale, J.S., Alvarado, A.G., Otvos, B., Sinyuk, M., Stoltz, K., Wiechert, A., Mulkearns-Hubert, E., Jarrar, A., Zheng, Q., Thomas, D., Egelhoff, T., Rich, J.N., Liu, H., Lathia, J.D., and Reizes, O., *Development of a Fluorescent Reporter System to Delineate Cancer Stem Cells in Triple-Negative Breast Cancer*. *Stem Cells*, 2015. **33**(7): p. 2114-2125.
201. Santini, M.T. and Rainaldi, G., *Three-Dimensional Spheroid Model in Tumor Biology*. *Pathobiology*, 1999. **67**(3): p. 148-157.
202. Costa, E.C., Gaspar, V.M., Coutinho, P., and Correia, I.J., *Optimization of liquid overlay technique to formulate heterogenic 3D co-cultures models*. *Biotechnol Bioeng*, 2014. **111**(8): p. 1672-1685.
203. <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/146-30.html#sub:Set-Measurements...> [cited 06.04.2020]
204. https://www.gbo.com/fileadmin/user_upload/Downloads/Brochures/Brochures BioScience/F073048 Microplate Selection Guide E.pdf [cited 06.04.2020]

205. Wang, K., Wu, F., Seo, B.R., Fischbach, C., Chen, W., Hsu, L., and Gourdon, D., *Breast cancer cells alter the dynamics of stromal fibronectin-collagen interactions*. Matrix Biol, 2017. **60-61**: p. 86-95.
206. Sottile, J. and Hocking, D.C., *Fibronectin Polymerization Regulates the Composition and Stability of Extracellular Matrix Fibrils and Cell-Matrix Adhesions*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(10): p. 3546-3559.
207. Fang, M., Yuan, J., Peng, C., and Li, Y., *Collagen as a double-edged sword in tumor progression*. Tumour Biol, 2014. **35**(4): p. 2871-2882.
208. Zhang, W., Sui, Y., Ni, J., and Yang, T., *Insights into the Nanog gene: A propeller for stemness in primitive stem cells*. Int J Biol Sci, 2016. **12**(11): p. 1372-1381.
209. Joyce, M.H., Lu, C., James, E.R., Hegab, R., Allen, S.C., Suggs, L.J., and Brock, A., *Phenotypic Basis for Matrix Stiffness-Dependent Chemoresistance of Breast Cancer Cells to Doxorubicin*. Front Oncol, 2018. **8**: p. 337.
210. Ishiwata, T., *Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: Novel therapeutic targets for cancer*. Pathol Int, 2016. **66**(11): p. 601-608.
211. Karousou, E., D'Angelo, M.L., Kouvidi, K., Vigetti, D., Viola, M., Nikitovic, D., De Luca, G., and Passi, A., *Collagen VI and hyaluronan: the common role in breast cancer*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: 606458.
212. Bourguignon, L.Y.W., Peyrollier, K., Xia, W., and Gilad, E., *Hyaluronan-CD44 Interaction Activates Stem Cell Marker Nanog, Stat-3-mediated MDR1 Gene Expression, and Ankyrin-regulated Multidrug Efflux in Breast and Ovarian Tumor Cells*. J Biol Chem, 2008. **283**(25): p. 17635-17651.
213. Tse, J.M., Cheng, G., Tyrrell, J.A., Wilcox-Adelman, S.A., Boucher, Y., Jain, R.K., and Munn, L.L., *Mechanical compression drives cancer cells toward invasive phenotype*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(3): p. 911-916.
214. Böcker, W., et al. (Hrsg.), Pathologie. 5. Auflage. 2012, München: Urban & Fischer Verlag. S. 126.
215. Peela, N., Sam, F.S., Christenson, W., Truong, D., Watson, A.W., Mouneimne, G., Ros, R., and Nikkhah, M., *A three dimensional micropatterned tumor model for breast cancer cell migration studies*. Biomaterials, 2016. **81**: p. 72-83.

216. Rasheed, Z.A., Yang, J., Wang, Q., Kowalski, J., Freed, I., Murter, C., Hong, S.-M., Koorstra, J.-B., Rajeshkumar, N.V., He, X., Goggins, M., Iacobuzio-Donahue, C., Berman, D.M., Laheru, D., Jimeno, A., Hidalgo, M., Maitra, A., and Matsui, W., *Prognostic Significance of Tumorigenic Cells With Mesenchymal Features in Pancreatic Adenocarcinoma*. *J Natl Cancer Inst*, 2010. **102**(5): p. 340-351.
217. Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., Campbell, L.L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J., and Weinberg, R.A., *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. *Cell*, 2008. **133**(4): p. 704-715.
218. Kubow, K.E., Vukmirovic, R., Zhe, L., Klotzsch, E., Smith, M.L., Gourdon, D., Luna, S., and Vogel, V., *Mechanical forces regulate the interactions of fibronectin and collagen I in extracellular matrix*. *Nat Commun*, 2015. **6**: 8026.
219. Pang, M.F., Siedlik, M.J., Han, S., Stallings-Mann, M., Radisky, D.C., and Nelson, C.M., *Tissue Stiffness and Hypoxia Modulate the Integrin-Linked Kinase ILK to Control Breast Cancer Stem-like Cells*. *Cancer Res*, 2016. **76**(18): p. 5277-5287.
220. Malhotra, G.K., Zhao, X., Band, H., and Band, V., *Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers*. *Cancer Biol Ther*, 2010. **10**(10): p. 955-960.
221. Kaushik, S., Pickup, M.W., and Weaver, V.M., *From transformation to metastasis: deconstructing the extracellular matrix in breast cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 2016. **35**(4): p. 655-667.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, deren Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Doktor Katharina Schober, die mich sowohl im experimentellen Teil als auch in der Niederschrift der Arbeit bis zum Schluss hervorragend betreut hat. Mit konstruktiver Kritik und fachlicher Unterstützung trug sie wesentlichen Anteil am Erfolg dieser Arbeit. Für ihre stets offene Tür, ihre Geduld und ihre ständige Motivation möchte ich mich herzlich bedanken.

Herrn Professor Dr. Jürgen Groll danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, an seinem Lehrstuhl zu promovieren.

Herrn Professor Dr. Torsten Blunk danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die zahlreichen fachlichen und inhaltlichen Ratschläge.

Auch möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des FMZ für das freundliche Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft bedanken. Insbesondere danke ich Herrn Doktor Thomas Böck für seine Geduld, seine Ratschläge und seine gewissenhafte Unterstützung. Christiane Höfner gilt mein Dank für ihre Hilfe im Labor und für ihre freundliche Art.

Schließlich danke ich meiner Familie, Alex und meinen Freunden herzlich für ihre Unterstützung und ihre Geduld während meiner Promotion.