

**Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Universität Würzburg**

**Vorstand: Professor Dr. med. Süleyman Ergün**

**Rekrutierung von Stromazellen aus gefäßwandresidenten  
Vorläuferzellen während der Tumorgenese**

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Anja Kuhn  
aus Remseck**

**Würzburg, Dezember 2019**



**Referent:** Prof. Dr. Süleyman Ergün

**Korreferent:** Prof. Dr. Harald Schulze

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 16.12.2020

**Die Promovendin ist Ärztin.**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Maligne Tumore</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Tumorstroma</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2.1 Extrazelluläre Matrix (ECM)</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2.2 Tumor-assoziierte Fibroblasten (CAFs)</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2.3 Adipozyten</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2.4 Immunzellen</b> .....	<b>5</b>
1.2.4.1 Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs).....	6
1.2.4.2 T-Lymphozyten .....	7
1.2.4.3 B-Lymphozyten.....	8
<b>1.2.5 Das Blutgefäßsystem</b> .....	<b>8</b>
<b>1.3 Angiogenese</b> .....	<b>9</b>
<b>1.4 Stammzellen der Gefäßwand</b> .....	<b>12</b>
<b>1.5 Das Aortenringmodell als Werkzeug zum Studium der Angiogenese</b> .....	<b>14</b>
<b>1.6 Multizelluläre Tumorsphäroide (MCTS)</b> .....	<b>16</b>
<b>1.7 Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>18</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Fertiglösungen</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1.3 Puffer und Lösungen</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1.4 Medien und Kits</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1.5 Antikörper</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2.1 Zellkultur</b> .....	<b>24</b>
2.2.1.1 Verwendete Zelllinien.....	24
2.2.1.2 Zellzahlbestimmung.....	25
2.2.1.3 Zellkulturführung.....	25
2.2.1.4 Herstellung von Tumorsphäroiden .....	25
2.2.1.5 Herstellung von Alginatebeads .....	26

<b>2.2.2 Aorten-Tumor-Konfrontationsassay</b> .....	27
2.2.2.1 Herstellung von Aortenringen .....	27
2.2.2.2 Herstellung der Kollagenmischung.....	27
2.2.2.3 Ring-Sphäroid-Konfrontationsassay .....	28
2.2.2.4 Ring-Bead-Konfrontationsassay .....	28
2.2.2.5 Fixierung und Einbettung der Konfrontationsassays .....	29
<b>2.2.3 Diaminobenzidinfärbung</b> .....	29
<b>2.2.4. Mikroskopie</b> .....	31
<b>2.2.5 Elektronische Bildverarbeitung</b> .....	32
<b>2.2.6 Statistische Auswertung</b> .....	32
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>33</b>
<b>3.1 Aortenring-Tumorsphäroid-Konfrontationsassay</b> .....	33
<b>3.2 Etablierung des Aortenring-Bead-Konfrontationsassays</b> .....	39
<b>3.2.1 Hohe Stabilität der Alginatebeads</b> .....	39
<b>3.2.2 Etablierung des Konfrontationsassays</b> .....	42
3.2.2.1 „Proof of principle“ – der erste Aortenring-Bead-Konfrontationsassay .....	42
3.2.2.3 Zeitlicher Ablauf des Aortenring-Bead-Konfrontationsassays.....	45
<b>3.3 Auswanderungsaktivität von Zellen während des Aortenring-Bead-Konfrontationsassays</b> .....	46
<b>3.3.1 Ungerichtete Auswanderung der Zellen</b> .....	46
<b>3.3.2 Zunehmende Migration während des Versuchszeitraumes</b> .....	49
<b>3.3.3 Verstärkte Auswanderung bei Ko-Kultivierung mit Tumorbeads</b> .....	51
<b>3.3.4 Vergleich der Auswanderung zwischen den verschiedenen Tumorzelllinien</b> .....	52
<b>3.4 Charakterisierung der ausgewanderten Zellen mittels DAB-Färbungen</b> .....	57
<b>3.4.1 Fehlen von F4/80 - positiven ausgewanderten Zellen</b> .....	57
<b>3.4.2 Auswanderung einzelner CD34 - positiver Zellen</b> .....	58
<b>3.4.3 Höherer Anteil an CD31 – positiven Zellen bei Ko-Kultivierung mit Tumorbeads</b> .....	60
<b>3.4.4 Mehrheit der ausgewanderten Zellen ist NG2 – positiv</b> .....	62
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>65</b>

<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>78</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>80</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>90</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>92</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>93</b>
<b>Publikationen .....</b>	
<b>Danksagung.....</b>	
<b>Lebenslauf .....</b>	

# 1. Einleitung

## 1.1 Maligne Tumore

Bösartige Neubildungen belegen seit Jahren den zweiten Platz in der Statistik der häufigsten Todesursachen in Deutschland. Im Jahr 2016 starb ein Viertel der Menschen, insgesamt 238.396 an einer Krebserkrankung oder deren Folgen. Nur übertroffen werden diese von Herz-/Kreislaufkrankungen mit einem Anteil von 37,2 % der Todesursachen [1]. An der Höhe der Krankheitskosten, die maligne Tumore pro Jahr verursachen lässt sich ebenfalls die Bedeutung dieser Krankheitsgruppe belegen: sie betragen 19,9 Milliarden € im Jahr 2015 [2].

Tumore bilden eine heterogene Gruppe bezüglich Ursprungs, Manifestationsalter, Metastasierung und Überlebensraten. Es gibt jedoch einige Eigenschaften, die alle Tumore besitzen. Hanahan und Weinberg definierten im Jahr 2000 sechs sogenannte „hallmarks of cancer“ – Kennzeichen, die allen Krebsarten trotz ihrer Diversität gemeinsam sind und auf dem Weg der normalen zur neoplastischen Zelle erworben werden [3]: erstens die dauerhafte Verfügbarkeit von Wachstumssignalen, entweder durch Wachstumsfaktoren aus Tumorzellen [4-8] oder Tumorstromazellen [9-13]; zweitens der Wirkungsverlust von Wachstumssuppressoren, beispielsweise durch inaktivierende Mutationen im Rb-Tumorsuppressorgen, das die Fortführung des Zellzyklus überwacht [14]; drittens die Ausschaltung von Mechanismen, die den programmierten Zelltod auslösen, wiederum durch Mutationen z.B. im Tumorsuppressorgen p53 [15, 16], das bei normaler Funktion als Reaktion auf DNA-Strangbrüche den Zellzyklus anhält und die Apoptose einleitet. Ein weiteres, das vierte Kennzeichen von malignen Tumoren ist die replikative Immortalität, d.h. die Fähigkeit, unendlich viele Zellzyklen zu durchlaufen, ohne einen ruhenden Zustand oder den Beginn der Apoptose zu erreichen. Das fünfte besteht in der Induktion der Angiogenese, d.h. der Neubildung von Gefäßen zur Versorgung des Tumorgewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen. Schließlich ist auch die Aktivierung von Invasion und Metastasierung eine von Hanahan und Weinberg definierte „hallmark“; dies erfolgt z.B. durch die Herunterregulierung von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen wie E-Cadherin [17] oder durch

die sogenannte Epitheliale-mesenchymale-Transition von Tumorzellen [18-20]. Im Jahr 2011 erfolgte eine Neuauflage der „hallmarks of cancer“ mit zwei neuen Gemeinsamkeiten: der Modulation des Zellstoffwechsels hin zur aeroben Glykolyse und dem Entzug vor der Kontrolle durch das Immunsystem [21].

Wichtige Entwicklungsstufen sind hierbei Mutationen im Genom, dem Erbgut der Zelle. Entscheidende Gene sind Onkogene, die bei einer aktivierenden Mutation zur Entstehung von Krebs, z.B. durch konstante Wachstumssignale beitragen. Auch Tumorsuppressorgene, deren Funktion beispielsweise die Kontrolle des Zellzyklus und die Einleitung der Apoptose, also des programmierten Zelltodes ist, spielen hierbei eine wichtige Rolle. Die Inaktivierung dieser Gene kann zur Ausbildung maligner Tumore führen. Beispiel hierfür sind das oben erwähnte Rb-Gen oder die Mutation des APC-Genes, die zur Entwicklung des FAP-Syndroms mit Entstehung kolorektaler Karzinome führt [22].

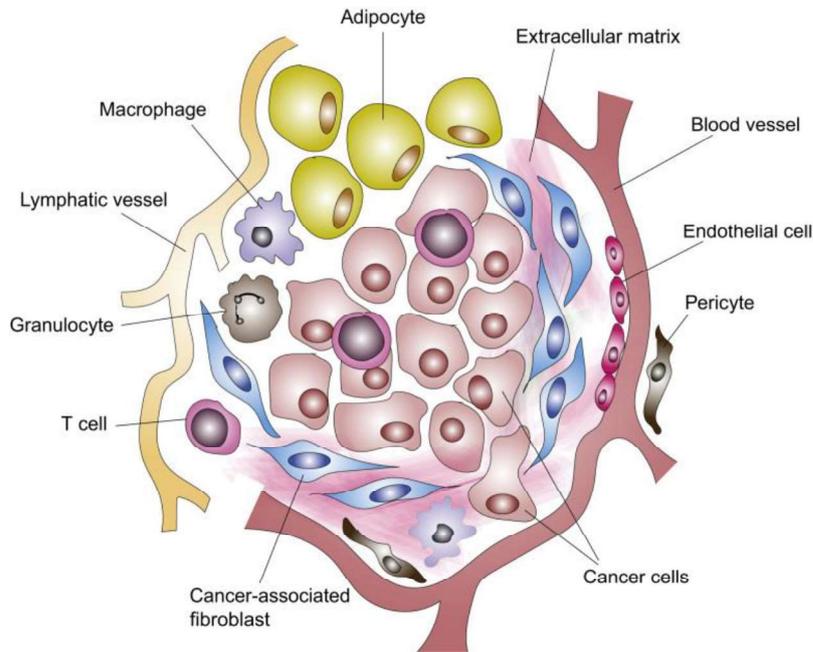
Klassischerweise basiert die Tumorthherapie auf drei Säulen: der operativen Entfernung, der Radio- und der Chemotherapie. Jeder dieser Therapieansätze ist jedoch limitiert. So kann die Operation am Primärtumor eine bereits stattgefundenene Metastasierung nicht kurieren, ebenso kann der Tumor technisch nicht operabel sein, wenn z.B. lebenswichtige Strukturen und/oder Organe entfernt werden müssten. Auch der allgemeine Gesundheitszustand des Patienten kann eine Operation unmöglich machen. Die Strahlentherapie führt durch den Einsatz ionisierender Strahlung zum Zelltod und kann allein, aber auch kombiniert mit einer Operation oder Chemotherapie durchgeführt werden. Eine Vielzahl an Nebenwirkungen wie eine Knochenmarkdepression, die Entstehung eines durch die Therapie geförderten (Zweit-) Malignoms oder die Entwicklung einer Strahlenresistenz limitieren den Einsatz dieser Therapieform. Die verschiedenen Chemotherapeutika (= Zytostatika) hemmen vielfach die DNA-Replikation, z.B. durch Einbau falscher Basen oder Induktion von Strangbrüchen. Dadurch sollen gezielt die schnell proliferierenden Krebszellen angegriffen werden [23, 24]. Die Zytostatika richten sich jedoch gegen genetisch heterogene und instabile Zellen [25-27]. Dies führt zu einem Selektionsdruck und der Expansion resistenter Klone, welche trotz Therapie weiter proliferieren und somit zum erneuten Tumorwachstum führen [28].

Aufgrund der genannten Limitationen der klassischen Tumortherapie wurde in den vergangenen Jahrzehnten nach weiteren Angriffspunkten in der Onkologie gesucht. Ein Ziel dabei war die Angiogenese als eines der „hallmarks of cancer“ und in der Tat erhielt im Jahr 2004 der monoklonale VEGF-A-Antikörper Bevacizumab eine Zulassung der US-amerikanischen „Food and Drug Administration“ zur Behandlung von metastasiertem kolorektalem Karzinom in Kombination mit Zytostatika [29]. Mittlerweile ist Bevacizumab auch in Deutschland zur Behandlung verschiedener maligner Tumore zugelassen. Somit rückte das Tumorstroma als mögliches therapeutisches Angriffsziel in den Fokus. Denn auch die Gesamtheit nicht maligner Zellen und extrazellulärer Matrix (ECM) im Tumor, welche als Tumorstroma bezeichnet wird, beeinflusst Erfolg bzw. Misserfolg der Chemotherapie. Geringe Perfusion, erhöhter interstitieller Druck und eine dichte ECM führen zu einer erschwerten Penetration des Tumorgewebes durch Chemotherapeutika, was deren Effizienz vermindert [30]. Auch die Zellen des Tumorstromas tragen durch diverse (Wachstums-) Faktoren zur Resistenz gegenüber Zytostatika bei [31-33].

## **1.2 Tumorstroma**

In Tumoren finden sich nicht nur genetisch veränderte maligne Zellen, für die die „hallmarks of cancer“ zutreffen, sondern beispielsweise auch Zellen, die die Tumorgefäße bilden, sowie eine Vielzahl anderer Zelltypen. All diese Zellen bilden gemeinsam mit der extrazellulären Matrix sowie Wachstumsfaktoren und Enzymen das sog. Tumorstroma oder die Tumormikroumgebung [34].

Dieses Konzept von einem Tumor als komplexes Gebilde aus verschiedenen Komponenten ist nicht neu. So hat Rudolf Virchow bereits 1863 Leukozyten im Tumorstroma entdeckt und die Hypothese aufgestellt, dass chronische Inflammation zur Krebsentstehung beiträgt. In der Tat finden sich auch Zellen des Immunsystems innerhalb des Tumorstromas, vor allem Makrophagen. Hier soll ein Überblick über die Bestandteile der Tumormikroumgebung gegeben werden.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Tumorstromas mit den wichtigsten enthaltenen Zelltypen. Aus [35]; Nutzung mit Erlaubnis des Verlags.

### 1.2.1 Extrazelluläre Matrix (ECM)

Die extrazelluläre Matrix der Tumore enthält verschiedene Komponenten wie Kollagene [36], Fibronectin [37] und Proteoglykane [38], sowie Wachstumsfaktoren und Hormone, die von Tumor- oder Tumorstromazellen sezerniert wurden. Sie kann bis zu 60% des Tumolvolumens einnehmen und ist durch im Vergleich zu normaler ECM stärkere Ablagerung von Proteinen und somit höhere Dichte und Steifigkeit gekennzeichnet [30]. Dies wird z.B. durch die Quervernetzung von Kollagen durch die Lysyloxidase erreicht und resultiert in stärkerem Tumorwachstum [39]. Zudem kann die dichte ECM die malignen Zellen vor dem Einsatz zytostatischer Medikamente schützen [40][30].

### 1.2.2 Tumor-assoziierte Fibroblasten (CAFs)

Fibroblasten werden z.B. im Rahmen der Wundheilung aktiviert und dann Myofibroblasten genannt. Sie proliferieren stärker und produzieren vermehrt ECM wie verschiedene Kollagene und Fibronectin, um den Verschluss der Wunde zu bewirken [41]. CAFs stellen eine Untergruppe von Fibroblasten dar, die sich dauerhaft in einem aktivierten Zustand befinden. Sie können das Tumorwachstum auf vielfältige Weise unterstützen und beeinflussen. So bilden sie den Stromal cell-derived factor 1 (SDF1), der über den Rezeptor CXCR4 an Tumorzellen positiv auf das Wachstum wirkt [42]. Zur Wachstumsförderung und verstärkten Invasivität trägt auch Galektin 1 bei, nachgewiesen

u.a. bei Brust-, Pankreas- und Magenkarzinomen [43-45]. Weitere von CAFs produzierte Wachstumsfaktoren sind Hepatocyte Growth Factor (HGF), Fibroblast Growth Factor (FGF) und Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1). Proinflammatorische Eigenschaften durch Hochregulation entsprechender Gene u.a. durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B in CAFs lassen sich in verschiedenen Tumoren nachweisen. Dies führte zu einem verstärkten Tumorwachstum, der Rekrutierung von Makrophagen und einer höheren Dichte an Blutgefäßen [46]. CAFs beteiligen sich auch an der Angiogenese, indem sie die Rekrutierung von endothelialen Vorläuferzellen fördern, über die Produktion von Interleukin (IL)-6 die Expression von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) fördern und auch selbst VEGF produzieren [42, 47, 48]. Die CAFs tragen zu einer stärkeren Migration und Invasion von Tumorzellen in Lymphgefäße und dadurch zur Metastasierung bei, beispielsweise durch die Produktion von IL-22 [49, 50]. CAFs unterstützen somit das Tumorwachstum, die Angiogenese und die Invasion von Tumorzellen in andere Gewebe.

Umgekehrt können auch die Tumorzellen zur Proliferation von CAFs durch Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren wie Transforming Growth Factor (TGF)  $\beta$ , FGF2 und Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) beitragen [51].

### **1.2.3 Adipozyten**

Übergewicht ist ein Risikofaktor für die Entstehung einiger Tumorentitäten wie Brustkrebs. Deswegen wurde die Rolle von Adipozyten besonders bei der Entstehung und Progression von Mammakarzinomen untersucht. Adipozyten produzieren eine Vielzahl an Hormonen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die unter anderem Makrophagen rekrutieren und damit ein proinflammatorisches Milieu erzeugen. Zudem werden auch pro-angiogene Faktoren sezerniert. Gemeinsam sorgen diese Eigenschaften für Bedingungen, die die Tumorentstehung begünstigen [52]. Auch zur Invasion von Tumorzellen können Adipozyten z.B. durch die Produktion von IL-6 beitragen [53, 54].

### **1.2.4 Immunzellen**

Grundsätzlich wird zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem unterschieden. Das angeborene Immunsystem wird direkt bei Kontakt mit einem Erreger aktiv. Identifiziert werden hierbei PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), die in verschiedenen Mikroorganismen, aber nicht im Wirt vorhanden sind. Dies erfolgt mittels PRRs (pathogen recognition receptors) wie z.B. Toll-like oder NOD-like

Rezeptoren, die von Zellen der angeborenen Immunantwort exprimiert werden [55]. Es wird keine Adaptation auf ein Antigen benötigt. Zellen dieser Immunantwort sind natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten und Mastzellen. Das erworbene Immunsystem benötigt eine externe Aktivierung durch Antigene. Daraufhin werden durch B-Lymphozyten und die aus den B-Lymphozyten hervorgehenden Plasmazellen spezifische Antikörper gegen das fremde Antigen/Molekül gebildet. Weitere Zellen der spezifischen Immunantwort sind T-Lymphozyten, die nach einer Antigenpräsentation durch interdigitierende dendritische Zellen und/oder Makrophagen eine Zelllyse oder Apoptose der infizierten Zellen bewirken können. Zellen des Immunsystems spielen bei der Tumorentstehung und Progression eine vielschichtige Rolle. So können sie entartete Zellen erkennen und unschädlich machen, sie besitzen aber auch pro-tumorigene Eigenschaften.

#### 1.2.4.1 Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs)

Makrophagen können Tumorzellen zerstören und dadurch das Tumorstadium hemmen. Sie haben aber auch eine Vielzahl an Eigenschaften, die den Tumor unterstützen können. Diese konträren Aktivitäten zeigen, dass Makrophagen eine heterogene Population bilden. Die klassisch aktivierten M1 Makrophagen und die alternativ aktivierten M2 Makrophagen bilden dabei die entgegengesetzten Endpunkte eines Kontinuums an Subpopulationen. Dabei bestimmen die Eigenschaften der Umgebung bzw. deren Sekretion von Zytokinen die Differenzierung der Makrophagen. TAMs können den M2 Makrophagen zugeordnet werden [56, 57]. Als solche präsentieren sie wenig Antigene und können die T-Zell-Aktivierung und -Proliferation durch Sekretion von Prostaglandinen, IL-10 und TGF $\beta$  hemmen [57]. Das Vorhandensein von TAMs im Tumorstroma ist mit einer schlechten Prognose verbunden [34]. Unter anderem durch Sekretion von IL-1 $\beta$  fördern sie die Migration und Invasion von Tumorzellen und tragen zu einer höheren Rate an Metastasen und einer geringeren Überlebensrate bei [58, 59]. Sie produzieren Matrixmetalloproteinasen (MMPs), die durch Abbau der ECM zu einer leichteren Migration der neoplastischen Zellen beitragen können; zudem wird Kollagen auch direkt von TAMs aufgenommen und verstoffwechselt [60, 61]. Bei Inhibierung von TAMs konnte eine reduzierte Bildung von Metastasen sowie eine verstärkte Apoptose von Tumorzellen beobachtet werden [62-64]. TAMs spielen zudem eine bedeutende Rolle in der Angiogenese. Leek *et al.* konnte eine Korrelation zwischen einer hohen

Anzahl an Tumorgefäßen und einer dichten Infiltration mit Makrophagen bei Brustkrebs nachweisen [65]. In der Tat produzieren Makrophagen einige wichtige Zytokine, welche die Angiogenese fördern, wie VEGF, basicFGF (bFGF, FGF2), und Tumor Nekrose Faktor (TNF)- $\alpha$  [66].

Tumore ihrerseits bilden ebenfalls eine Vielzahl an Zytokinen, die zur Aktivierung von Makrophagen und zur deren Differenzierung in M2-Makrophagen und damit zur Ausstattung des Tumors mit TAMs beitragen. Hypoxie spielt hierbei eine entscheidende Rolle. Mammakarzinome können durch die Bildung von Laktat unter hypoxischen Bedingungen den ERK/STAT3-Signalweg aktivieren und dadurch TAMs rekrutieren [67]. VEGF wird ebenfalls bei Hypoxie verstärkt freigesetzt und führt zur Einwanderung von Makrophagen in das Tumorstroma [68]. Auch durch IL-13 und IL-4 wird die Polarisation hin zu einem M2-Phänotyp unterstützt [62, 64].

#### 1.2.4.2 T-Lymphozyten

Es gibt verschiedene Subtypen von T-Lymphozyten. Eine wichtige Gruppe sind die CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen. Sie sind in der Lage, durch direkte Zellyse oder Einleitung der Apoptose den Tod von Zellen, die entsprechende Antigene präsentieren, zu bewirken. Die CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (T<sub>H</sub>) lassen sich in eine Vielzahl von Subtypen u.a. in die T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen unterteilen. T<sub>H</sub>1-Zellen werden durch Makrophagen aktiviert und bilden daraufhin Zytokine, welche ihrerseits Makrophagen und zytotoxische T-Zellen stimulieren. Zudem fördern sie die Produktion von IgG-Antikörpern in Plasmazellen. T<sub>H</sub>2-Zellen stimulieren Plasmazellen zur Produktion spezifischer Antikörper der Klasse IgE und unterstützen damit vor allem die Bekämpfung extrazellulärer Parasiten.

T-Lymphozyten finden sich abhängig von der Tumorentität in verschiedenen Bereichen des Tumors, wie z.B. im Zentrum, im Randbereich oder in den drainierenden Lymphknoten. Es ist berichtet worden, dass eine hohe Dichte an CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Lymphozyten mit einer höheren Überlebensrate korreliert. Dies trifft auch für die T<sub>H</sub>1-Zellen und die von ihnen produzierten Zytokine wie Interferon (INF)- $\gamma$  zu. T<sub>H</sub>2-Zellen dagegen können sowohl mit einer höheren Aggressivität der Tumore korrelieren, als auch bei anderen Tumorentitäten mit einer besseren Prognose [69-71]. CD4<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (T<sub>regs</sub>) bilden eine weitere Untergruppe der T-Lymphozyten, die eine immunsuppressive Funktion ausüben. Bei gesunden Personen ist es ihre Aufgabe, die

Entwicklung von Autoimmun-Erkrankungen oder Allergien zu verhindern. Sie können antigenpräsentierende Zellen hemmen und bilden eine Vielzahl inhibitorischer Zytokine. Im Tumorstroma sorgen die  $T_{\text{regs}}$  damit jedoch dafür, eine effektive Immunantwort gegen die entarteten Zellen zu verhindern und ihr Vorhandensein ist bei vielen Tumorentitäten wie Brust-, Cervix-, Nierenzell- oder Pankreaskarzinom mit einer schlechten Prognose verbunden [72].

#### 1.2.4.3 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten können Antigene erkennen, sie mittels B-Zellrezeptor binden und internalisieren sowie anschließend Bestandteile derselben auf ihrer Oberfläche präsentieren.  $T_H2$ -Zellen interagieren daraufhin mit den B-Lymphozyten und aktivieren sie zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen.

B-Lymphozyten haben anti-tumorigene Eigenschaften. In Brustkrebsgewebe ist eine erhöhte Anzahl einer Subpopulation zu finden, welche  $INF-\gamma$  produziert und Vorgänge unterstützt, welche gegen den Tumor gerichtet sind, nämlich die Verstärkung der  $T_H1$ -Antwort und die Suppression der Aktivität der  $T_{\text{regs}}$  [73]. B-Lymphozyten produzieren ebenfalls das Chemokin CCL22, welches T-Zellen anlockt [74] und können auch direkt den Zelltod bei Zellen, die den entsprechenden Rezeptor tragen (wie Tumorzellen) durch Produktion des Fas-Liganden auslösen [75].

Das Vorhandensein von B-Lymphozyten kann allerdings auch pro-tumorigene Effekte haben. So können sie IL-10 produzieren, welches die Proliferation von T-Zellen und deren Differenzierung in T-Helferzellen supprimiert [76]. Bei Abwesenheit von B-Lymphozyten kam es im Mausmodell dagegen zu einem verminderten Tumorwachstum sowie zu einer erhöhten Rate an T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NKs) und deren Aktivität. Die Anzahl an  $T_{\text{reg}}$  war dagegen vermindert [77]. So können B-Lymphozyten hauptsächlich durch die Suppression einer ausreichenden Immunantwort die Tumorprogression unterstützen.

#### **1.2.5 Das Blutgefäßsystem**

Die Tumorzellen sind zur Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen auf Blutgefäße angewiesen, um überleben und wachsen zu können. Über diese können Tumorzellen auch an andere Stellen innerhalb des Körpers gelangen und nach Extravasation in dem Gewebe

entfernter Organe Metastasen bilden. Das Vorhandensein von Metastasen verschlechtert die Prognose vieler Tumorerkrankungen erheblich.

Die neuen Gefäße zur Versorgung der neoplastischen Erkrankung unterscheiden sich jedoch von normalen Gefäßen: die Endothelzellen präsentieren sich in irregulärer Größe und Form und haben nur lockere Zell-Zell-Kontakte, was zu undichten Gefäßen führt [78]. Dies resultiert in einem höheren interstitiellen Druck. Die Perizyten, die in gesunden Kapillaren den Endothelzellen eng anliegt und mit ihnen Zell-Zell-Kontakte bildet, ist bei Tumorgefäßen geringer ausgebildet, die Perizyten sind teilweise nur locker um das Endothel der Tumorgefäße angeordnet [79]. Die Gefäße sind unregelmäßig verzweigt, weisen unterschiedlich große Lumina und einen stark geschlängelten Verlauf auf [80]. Zudem ist der Blutfluss zeitlich und örtlich heterogen und diese Mischung aus Unter- und Überversorgung beeinträchtigt die Therapie mit intravenösen Chemotherapeutika [81, 82].

Durch die ungeordnete Gestaltung der Tumorgefäße existieren nach wie vor hypoxische Bereiche. Der Mangel an Sauerstoff kann die Immunantwort gegen die Neoplasie hemmen. So verringert sich durch die Hypoxie die Adhäsion von NK-Zellen an Endothelzellen in Mammakarzinomen [83]. Hypoxie-induziertes VEGF wird weiterhin von Tumorzellen produziert und bewirkt die Einwanderung von  $T_{regs}$ , welche die gegen den Tumor gerichteten Aktivitäten von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen hemmen [84]. Hypoxie kann ebenfalls zur Selektion eines metastatischen Phänotyps beitragen [85] und neben der Chemotherapie (s.o.) auch die Erfolgsaussichten der Radiotherapie beeinträchtigen [86]. So unterstützt die Hypoxie, die durch die irregulären Gefäße teilweise aufrechterhalten wird, die Tumorprogression auf vielfältige Weise.

Die Bildung neuer Blutgefäße wird als Angiogenese bezeichnet und ist als „hallmark of cancer“ ein wichtiger Faktor bei der Tumorprogression. Der genaue Ablauf der Angiogenese und deren Bedeutung für das Tumorwachstum sollen im Folgenden erläutert werden.

### **1.3 Angiogenese**

Angiogenese tritt im Rahmen einiger Erkrankungen wie Krebs auf. Sie kommt allerdings auch physiologisch vor, nämlich im Rahmen der Wundheilung und des weiblichen Zyklus. Ruhende, stabile Blutgefäße bestehen aus einer Schicht aus Endothelzellen, die

miteinander über Verbindungproteine wie VE-Cadherin und Claudine vernetzt sind. Daran anschließend finden sich bei Kapillaren und postkapillären Venolen Perizyten. Beide Zelltypen bilden eine gemeinsame Basalmembran [80]. Angiogenese geschieht am häufigsten durch das sogenannte Sprouting, bei dem die neuen Blutgefäße aus Zellen bereits bestehender Gefäße gebildet werden, aktiviert durch z.B. den Wachstumsfaktor VEGF [87]. Als Reaktion auf solche angiogenen Signale lösen die Endothelzellen ihre Zell-Zell-Kontakte auf und bauen die Basalmembran durch MMPs ab, um auswandern zu können [80, 88]. Die Migration von Endothelzellen ist einer der ersten und wichtigsten Schritte der Angiogenese [89]. Kommen diese Zellen wieder in Kontakt miteinander, so verlieren sie ihren mobilen Phänotyp, bilden dichte Zell-Zell-Kontakte aus und formen auf diese Weise ein neues Lumen [90]. Die Integration von Perizyten oder glatten Muskelzellen mit Hilfe von PDGF-BB aus Endothelzellen und TGF $\beta$ 1 leistet einen weiteren wichtigen Beitrag zur Reifung des Gefäßes [91]. Eine Vielzahl von Faktoren kann die Angiogenese beeinflussen. Der bekannteste und wichtigste darunter ist VEGF, welcher unter Hypoxie, die z.B. im wachsenden Tumor entsteht, vermehrt produziert wird [92]. VEGF fördert die Proliferation von Endothelzellen, den Abbau der ECM und die Ausbildung von Filopodien an Endothelzellen, die dann zu „tip cells“, den führenden Zellen der Angiogenese werden [88, 93]. Auch der Placental Growth Factor (PlGF), ein Mitglied der VEGF-Familie, fördert Endothelzellproliferation, -überleben und -migration [94]. Während er unter physiologischen Bedingungen kaum nachweisbar ist, wird er bei verschiedenen Tumorarten hochreguliert und ist mit einer schlechten Prognose verbunden [95, 96]. Weitere Faktoren in der Regulation der Angiogenese sind FGF, der in Zusammenarbeit mit VEGF pro-angiogene Effekte hat und die Proliferation von Endothelzellen fördert, Angiopoietin (Ang), das pro- und anti-angiogene Wirkung zeigen kann und HGF, der eine Rolle bei Tumorwachstum und -angiogenese in verschiedenen Tumorentitäten, wie Karzinomen, Sarkomen, Melanomen und ZNS-Tumoren spielt [97-100].

Wie schon bei der Aufzählung der einzelnen Wachstumsfaktoren zu erkennen ist, spielt die Angiogenese auch bei der Tumorprogression eine wichtige Rolle als eine der „hallmarks of cancer“: Studien von Folkman konnten schon vor Jahrzehnten zeigen, dass Tumore ohne die Bildung neuer Blutgefäße nicht größer als 1-2mm<sup>3</sup> werden können [101]. Sie sind klinisch nicht erkennbar, metastasieren nicht und sind nicht tödlich. Erst

wenn Tumore ihre eigenen Blutgefäße rekrutieren können, können sie ihr malignes Potential entfalten. Der Übergang von einem nicht vaskularisierten Status in einen angiogenen Phänotyp wird als „angiogenic switch“ bezeichnet [102]. Zunächst wird die Neoplasie über Diffusion mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Mit zunehmendem Fortschreiten des Tumorwachstums ist die Diffusionsstrecke nicht mehr ausreichend und es kommt in einigen Tumorbereichen zur Ausbildung von Hypoxie. Durch diese werden sog. Hypoxie-induzierte Faktoren (HIFs) vermehrt stabilisiert, Transkriptionsfaktoren, die an die Promotorregion entsprechender Gene binden und deren vermehrte Ablesung bedingen [103, 104]. Moleküle, die daraufhin gebildet werden sind, pro-angiogen. Als Beispiele genannt seien hier VEGF-A [105], endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) [106] und PlGF [107]. Tumorzellen bilden zudem auch PDGF-BB, FGF2, TGF- $\beta$  und Ang [97, 108]; sie fördern auf diese Weise die Angiogenese. Auch die Zellen des Tumorstromas bilden pro-angiogene Stimuli. CAFs beteiligen sich an der Angiogenese, indem sie die Rekrutierung von endothelialen Vorläuferzellen fördern, über die Produktion von IL-6 die Expression von VEGF erhöhen und auch selbst VEGF produzieren [42, 47, 48]. Makrophagen bilden einige wichtige Zytokine, welche die Angiogenese fördern, wie VEGF, FGF2 und TNF $\alpha$  [66]. Konsequenterweise führte ihre Ablation mithilfe von Apoptose-auslösenden Clodronatliposomen zu einer verringerten VEGF-Konzentration und der Abnahme der Angiogenese [109]. Auch die Tumorendothelzellen scheinen einen Einfluss auf die Angiogenese zu haben. So produzierten Brustkrebszellen in Anwesenheit von Endothelzellen vermehrt VEGF und Ang2 [108].

Offene Fragen ergeben sich momentan noch, was die Herkunft der neuen Gefäßzellen im Tumor angeht. So konnten Nolan et al. zeigen, dass Endothelzellen, die aus dem Knochenmark stammten, während der frühen Phase der Angiogenese in Tumorgefäße integriert wurden, während in späteren Stadien der Tumorentwicklung Endothelzellen aus der Peripherie genutzt wurden [110]. Zwei Gruppen zeigten die mögliche Herkunft der Endothelzellen aus Tumorstammzellen [111, 112], während Cheng et al. die Herkunft von Perizyten, aber nicht von Endothelzellen aus Tumorstammzellen nachwies [113]. Zengin et al. zeigten einen weiteren möglichen Herkunftsort von Endothelzellen auf: Durch Ko-Kultivierung mit Tumorzellen konnten endotheliale Vorläuferzellen (EPCs) aus der Gefäßwand rekrutiert werden [114]. Dieses lokale Reservoir von Zellen kommt

vor allem in einem frühen Stadium der Tumorgenese als Quelle von Stroma- und Gefäßzellen in Betracht.

#### **1.4 Stammzellen der Gefäßwand**

Die reife Wand großer Gefäße besteht aus drei Schichten: direkt an das Lumen angrenzend findet sich die *Tunica intima*, die aus einer Lage von Endothelzellen, ihrer Basalmembran und dem subendothelialen Raum besteht. Daran anschließend liegt die *Tunica media*, die im wesentlichen glatte Muskelzellen und elastische Kollagenfasern enthält. In der äußersten Schicht, der *Tunica adventita* der Gefäßwand befinden sich Kollagenfasern, Fibroblasten, Immunzellen, Nervenfasern und *Vasa vasorum*. Dies sind kleine Gefäße aus Endothelzellen und Perizyten, die vor allem in der Adventitia der großen Blutgefäße zu finden sind und der Ernährung dicker Gefäßwände dienen [115]. Die Gefäßwand enthält allerdings nicht nur reife, ruhende Zellen, sondern auch eine Vielzahl von Stamm- und Vorläuferzellen. Diese wurden in den letzten Jahren zunehmend untersucht und charakterisiert. Stammzellen aus der Gefäßwand können sich zu einer Vielzahl vaskulärer und nicht-vaskulärer Zellen differenzieren und zur Bildung von Neointima beitragen. Auch reife Zellen können sich noch differenzieren; so können Perizyten ihr Vorläuferpotential entfalten, wenn sie von der Wand abgelöst sind [116].

Im Folgenden sollen nun die Stammzellen in den verschiedenen Wandschichten der Blutgefäße beschrieben werden.

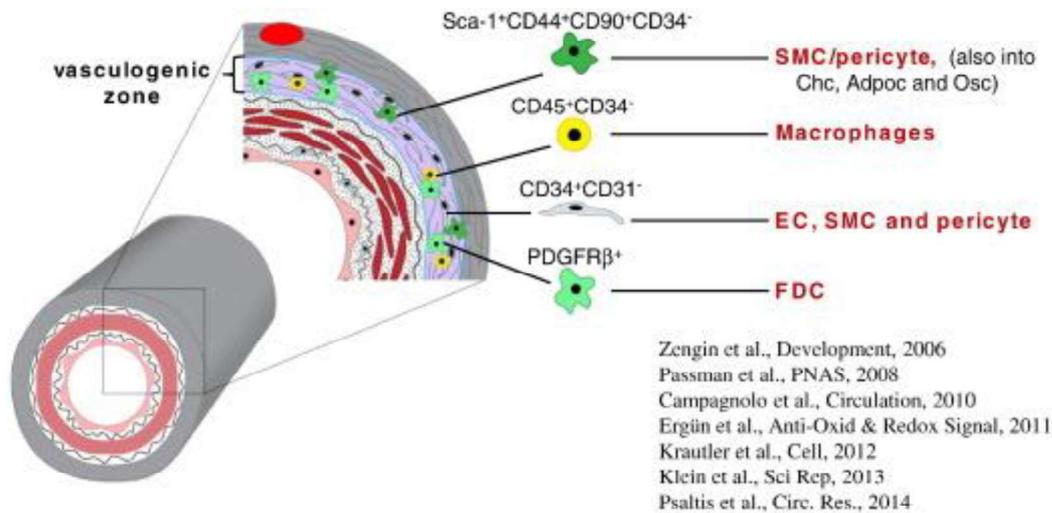
In der subendothelialen Zone befinden sich EPCs. 2005 konnten Ingram et al. erstmals zeigen, dass sich EPCs in der Intima befinden und lokale Gefäßschäden reparieren oder in den Blutstrom gelangen können [117]. Dies wurde von weiteren Gruppen bestätigt und es konnte gezeigt werden, dass diese EPCs eine Rolle in der Angiogenese spielen [118, 119]. Zudem finden sich in der Intima mesenchymale Stammzellen mit dem Potential zur Differenzierung in Adipo-, Chondro- und Osteozyten [120, 121].

Die *Tunica media* verschiedener Gefäße enthält eine Sox17<sup>+</sup>Sox10<sup>+</sup>S100β<sup>+</sup> Zellpopulation, die in neuronale Zellen und Zellen mesenchymaler Abstammung (glatte Muskelzellen, Adipo-, Chondro- und Osteozyten) differenzieren können [122].

In der Adventitia finden sich die meisten Stammzellpopulationen. Zenign et al. führten den Begriff der vaskulogenen Zone ein, die sich in der *Tunica adventitia* am Übergang zur Media befindet. In der vaskulogenen Zone der menschlichen *A. thoracica interna*

konnte diese Gruppe eine Population von CD34<sup>+</sup>KDR<sup>+</sup>CD31<sup>-</sup> - Vorläuferzellen identifizieren, die sich zu allen vaskulären, aber auch nicht-vaskulären Zelltypen wie Makrophagen differenzieren können [114]. Von dieser und anderen Arbeitsgruppen wurden EPCs in der Adventitia beschrieben, die unter dem Einfluss von VEGF differenzierten und kapilläre Strukturen ausbildeten [114, 117, 123]. Die *Tunica adventitia* beherbergt auch Vorläuferzellen für Perizyten und glatte Muskelzellen. CD34<sup>+</sup>CD31<sup>-</sup> - Zellen aus der Adventitia der menschlichen *V. saphena* besitzen ein großes Differenzierungspotential, u.a. in Perizyten. Diese können während der Angiogenese auch in Gefäße integriert werden [124]. Ebenso verhält es sich mit einer Gruppe CD44<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup> - Zellen [125]. Weiterhin fanden sich in der Adventitia CD34<sup>+</sup>CD31<sup>-</sup>CD146<sup>-</sup> - Zellen, die Marker mesenchymaler Stammzellen (CD90, CD44, CD73 und CD105) aufweisen und bei Behandlung mit Angiotensin-2 Perizyten-Marker ausbilden (CD146, PDGFR- $\beta$  und NG2) [126]. In der Region, in der sich Sca1<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> -Vorläuferzellen für glatte Muskelzellen fanden – nämlich in der Adventitia nahe der Grenze zur *Tunica media*, wo auch die vaskulogene Zone beheimatet ist – wurde auch eine Zone mit Zellen mit Sonic Hedgehog (Shh)-Signal-Domäne entdeckt, die sich unter experimentellen Bedingungen in glatte Muskelzellen differenzieren ließen [127]. Shh<sup>-/-</sup> - Embryonen wiesen deutlich weniger adventitiale Sca1<sup>+</sup> -Vorläuferzellen auf. Dieser Signalweg ist offensichtlich von großer Bedeutung für die genannten Vorläuferzellen [127]. Auch Immunzellen können sich aus adventitialen Vorläuferzellen entwickeln. So können follikulär dendritische Zellen aus perivaskulären Zellen gebildet werden [128], es finden sich dort Vorläuferzellen von CD68<sup>+</sup> - Makrophagen [114] und Sca-1<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> - Makrophagen-Vorläuferzellen in Gefäßen der Maus [129]. In Rattenaorten bewirkte M-CSF das Auswandern von proliferierenden CD45<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>CD169<sup>+</sup> $\alpha$ SMA<sup>+</sup>CD163<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup> - Zellen, die zu Makrophagen und dendritischen Zellen differenzierten und Riesenzellen bildeten. Diese wiederum besaßen phagozytische und pro-angiogene Eigenschaften durch die Produktion von VEGF [130]. Zudem konnte kürzlich aus den adventitiellen Stammzellen der Mauseorta unter experimentellen Bedingungen spontanschlagende Kardiomyozyten generiert werden, wobei auch hierbei adventitielle Makrophagen eine entscheidende Rolle spielen [131]. Somit befinden sich in der Gefäßwand zahlreiche Vorläuferzellen, die zu Zelltypen

differenzieren können, die im Tumorstroma und der Angiogenese eine wichtige Rolle spielen.



**Abbildung 2:** Die vaskulogene Zone mit darin beherbergten Stamm- und Vorläuferzellen. Aus [115]; Nutzung mit Erlaubnis des Verlags.

## 1.5 Das Aortenringmodell als Werkzeug zum Studium der Angiogenese

Wie bereits ausgeführt ist die Angiogenese ein wichtiger Schritt in der Tumorprogression. Das Aortenringmodell, das im Englischen als Aortic Ring Assay (ARA) bezeichnet wird, dient dem Studium der Angiogenese unter *ex vivo* Bedingungen, da es ermöglicht, die angiogenetische Sprouting von gefäßähnlichen Strukturen im Beisein aller Gefäßwandschichten ermöglicht. 1990 konnten Nicosia und Ottinetti erstmalig zeigen, dass aus den präparierten Geweberingen einer Rattenaorta, die in Fibrin oder Kollagen eingebettet und dann mit Medium versetzt wurden, sich verzweigende Gefäß- oder Kapillar-ähnliche Ausprossungen ausbildeten – auch ohne Zugabe von Serum oder weiteren Wachstumsfaktoren [132]. Dieser Prozess ist selbstlimitierend und geht von den Schnittflächen des Ringes aus. Später wurde das Aortenringmodell auch auf Gefäße anderer Spezies ausgeweitet, wie Mäuse, Schweine und Menschen; diese Spezies benötigten jedoch teilweise weitere Stimulation, z.B. durch die Zugabe von Serum. Die aussprossenden Zellen sind Endothelzellen, Perizyten, Fibroblasten und Makrophagen [133]. Dies sind Zelltypen, die im Tumorstroma eine bedeutende Rolle spielen. Zunächst wandern Makrophagen und Fibroblasten aus der Adventitia in die periaortale Matrix aus. Es folgen Endothelzellen, welche kapillarartige Ausprossungen bilden, die an der

abluminalen Seite durch die Integration von Perizyten stabilisiert werden [132, 134]. Makrophagen finden sich dann vor allem an den Wurzeln der Aussprossungen [109].

Die Regulation der Angiogenese im Aortenringmodell erfolgt über parakrine Signale zwischen den Zellen und kann durch Zugabe anderer Zellen oder Hinzufügen molekularer Regulatoren in das Medium beeinflusst werden [135]. Vor allem zu Beginn der Kultivierung ist die Konzentration von VEGF und FGF2 hoch. Diese werden von Zellen der Gefäßwand gebildet. 10 bis 14 Tage nach Explantation der Aorta sinkt die Konzentration dieser Wachstumsfaktoren, gleichzeitig lässt sich die Regression der neu gebildeten Gefäße beobachten [136, 137]. Eine Vielzahl weiterer Wachstumsfaktoren und pro-inflammatorischer Moleküle, welche die Angiogenese fördern, lässt sich im ARA nachweisen. Die exogene Zugabe von Wachstumsfaktoren, z.B. VEGF, kann die Angiogenese auch über den Zeitraum von 10-14 Tagen hinaus erhalten [137].

Die Endothelzellen der Intima sind in der Lage, gefäßartige Strukturen zu bilden [138, 139] und ohne eine intakte Intima ist Angiogenese nicht möglich. Eine intakte Adventitia ist jedoch ebenfalls von großer Bedeutung für die Bildung neuer Gefäße im ARA, das selektive Entfernen derselben mit Ethanol führte zum Ausbleiben der Angiogenese [140]. Dies könnte daran liegen, dass die *Vasa vasorum* als Quelle von Endothelzellen fehlen. Eine andere mögliche Erklärung hierfür ist das Vorhandensein von Stammzellen in der Adventitia, die zur Angiogenese beitragen. So ließ sich immunhistochemisch die Mobilisation von CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> und CD68<sup>+</sup> - Makrophagen aus der Adventitia nachweisen. Dies erfolgte bei Aktivierung des Aorten-Immunsystems vor Beginn der Gefäßaussprossung [141]. Wie bereits unter Punkt 1.4 beschrieben, konnte in diversen *in vitro*- und *in vivo*-Studien gezeigt werden, dass in der Adventitia ein Reservoir von Stamm- und Vorläuferzellen vorhanden ist, dass unter anderem die Kapazität besitzt, zu Makrophagen zu differenzieren. Untersuchungen an knochenmarktransplantierten Mäusen ergaben, dass die Adventitia-residenten Makrophagen unabhängig vom Knochenmark generiert werden können [114, 129, 131, 142, 143]. Die adventitiellen Makrophagen produzierten im Aortenringmodell VEGF. Wurde dieses durch Blockade entsprechender Rezeptoren ausgeschaltet, so kam es zu einer reduzierten Auswanderung CD31-positiver Endothelzellen aus der Aortenwand [131]. In der vaskulären Adventitia finden sich auch weitere Vorläuferzellen, die in die Gefäßaussprossung in ARA involviert sind, wie z.B. Vorläuferzellen für Endothelzellen und Perizyten. Die aus diesen

Vorläuferzellen generierten Perizyten und glatte Muskelzellen können in die Wand neuer Blutgefäße integriert werden. In bereits bestehenden Blutgefäßen können sie außerdem zu Atherosklerose und/oder zur Formation einer Neointima, die zur Gefäßverengung führt, beitragen [124, 144, 145]. In *ex vivo*-Studien konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen, welche aus Vorläuferzellen der Gefäßwand generiert wurden, in der Lage sind, kapilläre Strukturen zu bilden [114, 117, 118]. Dies unterstreicht die potentielle Bedeutung dieser Stammzellnische als Quelle angiogener Zellen. In der Wand potentieller Kapillaren sind Endothelzellen und Perizyten als Teil der *Vasa vasorum* ebenfalls vorhanden.

Ko-Kultivierung von Krebszellen und Aortenringen bzw. neu gebildeten Gefäßen zeigte, dass sich die Tumorzellen weiter ausbreiten und schneller wachsen als ohne Ko-Kultivierung [146, 147]. Die Stimulation der Angiogenese mithilfe von durch neoplastische Zellen konditioniertem Medium ist ebenfalls eine lange bekannte Beobachtung [132]. Im Jahr 2013 berichteten Seano et al. von einer dreidimensionalen Methode, um die Interaktion von Tumorzellen und Aortenringen zu untersuchen [148]. Hier wurden Ringe von humanen Nabelschnurarterien mit Sphäroiden aus Prostatakrebszellen in Basalmembranextrakt eingebettet. Humane Arterien, welche im Gegensatz zu Rattenaorten keine intrinsische angiogene Aktivität besitzen und auf externe Wachstumsfaktoren angewiesen sind, zeigten bei Ko-Kultivierung mit Tumorsphäroiden Aussprossungen. Die Sphäroide verstärkten zudem die durch zugesetzte Wachstumsfaktoren eingeleitete Angiogenese und es zeigten sich hierbei längere und stärker verzweigte gefäßähnliche Aussprossungen. Die Untersuchung der Interaktion von Tumorzellen und Aortenringen im ARA kann a) Hinweise darauf geben, wie neoplastische Zellen Einfluss auf die Gefäßwand-residenten Vorläuferzellen ausüben und b) helfen den Beitrag der lokalen Gefäßwandzellen zum Tumorstroma im Kontext einer dreischichtigen Gefäßwand auszuleuchten.

### **1.6 Multizelluläre Tumorsphäroide (MCTS)**

Die normale Zellkultur *in vitro* ist zweidimensional. Die einschichtig (monolayer) wachsenden Zellen haben ihre Hauptkontakte mit dem Boden der Kulturflasche und dem Medium. *In vivo* bilden Zellen allerdings am häufigsten Zell-Zell-Kontakte und Zell-Matrix-Kontakte aus [149]. Die Monolayer-Situation spiegelt also nicht die tatsächlichen Verhältnisse wider, eine Tatsache, die sich u.a. daran zeigt, dass Therapeutika, die sich

im Monolayer effektiv präsentierten, *in vivo* häufig nicht die gewünschten Ergebnisse zeigen [150]. Es ist daher nötig, ein System zu nutzen, das die Bedingungen in dreidimensionalen Umgebungen besser abbildet. Tumorsphäroide sind hier eine Möglichkeit, die die finanziellen und ethischen Nachteile von Tierversuchen vermeiden. Ein Vorteil von MCTS ist, dass sie bei ausreichender Größe einen Gradienten an O<sub>2</sub>, pH-Wert und Nährstoffen aufweisen, der der Situation *in vivo* nahekommt. Dort ist er durch kontinuierliches Wachstum und schlechte Vaskularisierung bedingt [151]. Im Kern finden sich häufig nekrotische Regionen, daran anschließend ruhende und in der äußeren Schicht schließlich proliferierende Zellen [152]. Der Mangel an O<sub>2</sub> und die geringere Penetration führt jedoch häufig zu Therapieresistenz. Deshalb eignen sich MCTS gut für die Untersuchung der Wirksamkeit neuer Medikamente. Ein weiterer Vorteil von MCTS ist, dass sie gleiche oder ähnliche biologische Eigenschaften wie solide *in vivo* gewachsene Tumoren bezüglich Zellmorphologie, Genexpression und Wachstumsraten besitzen [150, 153]. So wachsen 2D-Kulturen exponentiell, solide Tumore und Sphäroide zeigen ebenfalls erst eine exponentielle Wachstumsphase, dann jedoch ein verzögertes Wachstum [154, 155].

Es gibt verschiedene Methoden, MCTS zu generieren. Allen gemeinsam ist, dass Zelllinien in eine Umgebung gebracht werden, in der die Adhäsionskräfte zwischen den Zellen größer als zwischen Zellen und anderer Oberflächen ist. Bei der sog. „Spinner flask“-Methode werden die Zellen mit ihrem Medium in konstant rotierende Flaschen verbracht. Durch die ständige Bewegung können die Zellen nicht an der Flascheninnenfläche adhären und es bilden sich MCTS, die allerdings bezüglich Größe und Form heterogen sind. Bei der Methode des „hängenden Tropfens“ werden Tropfen aus Zellen und Medium an der Unterfläche eines Deckels angebracht. Durch die Schwerkraft bilden sich MCTS. Diese sind in ihrer Größe vergleichbar, aber es können durch die aufwendige Methodik wenig Sphäroide gebildet werden. Die „Liquid overlay“-Technik beschreibt eine Methode, bei der Zellen in Medium auf eine nicht-adhärenente Oberfläche wie Agarose verbracht werden. Wurde diese am Boden von 96-well-Platten angebracht, so bildet sich pro well ein Sphäroid, dessen Größe homogen ist. Eine weitere Möglichkeit stellt die Inkapsulation der Tumorzellen in Alginate dar. Dies ermöglicht es Forschern, auch Tumorzelllinien zu nutzen, die bei den zuvor beschriebenen Methoden keine MCTS bildeten [156, 157].

## 1.7 Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit

Wie oben ausführlich erläutert, bestehen solide Tumore aus neoplastischen Krebszellen, sowie einer Vielzahl an nicht neoplastischen Stromazellen und einer spezifischen ECM. Die Bestandteile der Tumormikroumgebung stehen im engen wechselseitigen Kontakt und das Tumorstroma unterstützt das Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung sowie Immunsuppression und Therapieresistenz. Die Angiogenese ist ein wichtiger Unterstützer der Tumorprogression und Blutgefäße sind Komponenten des Tumorstromas. In der Gefäßwand, insbesondere in der Tunica adventitia der Gefäßwand findet sich eine Vielzahl an Vorläuferzellen, die zu Zelltypen differenzieren können, die im Tumorstroma und der Angiogenese eine Bedeutung haben.

Eine Methode zur Untersuchung der Angiogenese ist das Aortenringmodell. Eine verstärkte angiogene Aktivität durch Tumorzell-konditioniertes Medium konnte bereits gezeigt werden. Erste Versuche einer Ko-Kultivierung von humanen Gefäßringen und Tumorsphäroiden wurden bereits durchgeführt.

Das Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit ist, mittels methodischer Modifikationen ein Modell zu etablieren, das erlaubt, den Einfluss von Tumorzellen auf die Angiogenese und die Mobilisation der Stammzellreservoirs aus der Gefäßwand in einem dreidimensionalen Raum zu untersuchen. Die Arbeitshypothese hierzu lautete, dass dieses Ziel durch die Generierung von MCTS und Herstellung der Geweberinge aus der Mauseorta mit anschließender Ko-Kultivierung von MCTS und Aortenringe erreicht werden kann. Mittels eines solchen *Aorten-Tumor-Konfrontationsassays* sollte es möglich sein, den Effekt der von Tumorzellen sezernierten Faktoren an der Mobilisierung und potenziellen Differenzierung der gefäßwandresidenten Stamm- und Vorläuferzellen zu studieren. Die MCTS gleichen in ihren biologischen Eigenschaften der Situation *in vivo* mehr als 2D-Zellkulturen und durch das Einsetzen von MCTS in der Nähe von Aortenringen soll ein Gradient an Wachstumsfaktoren hergestellt werden, welcher auch *in vivo* besteht bzw. im Falle einer Tumorentwicklung zu den dem Tumor naheliegenden Blutgefäße in einer parakrinen Art und Weise aufgebaut werden kann. Damit soll erreicht werden, dass die neue Methodik die *in vivo*-Situation besser nachbilden kann. Drei verschiedene murine Tumorzelllinien wurden zur Generation der MCTS verwendet, 4T1, MT6 und EMT6. Sie wurden zu den Geweberingen aus Mauseorten in eine gemeinsame Matrix gesetzt. Die optimale Mediumzusammensetzung, die geeignete Methode der

MCTS-Generierung, die beste Methode der Konfrontation und die optimale Versuchsdauer wurden evaluiert. Nach Etablierung der Methode wurde das Ausmaß der Aussprossung im Versuchsverlauf im Vergleich zu Kontrollen ohne Tumorzellen mittels Phasenkontrastmikroskops untersucht werden. Des Weiteren wurden nach Aortenring-MCTS-Konfrontationsassay Gewebeschnitte hergestellt, an denen die aussprossenden Zellen durch immunhistochemische Färbungen charakterisiert wurden. Untersucht wurden dabei die Schnitte auf das Vorhandensein bzw. die Expression der Zelloberflächenmarker, die für die gefäßwandbildenden Zellen charakteristisch sind. Verwendet wurden dazu Antikörper gegen den Marker für Perizyten (NG2), endotheliale Vorläuferzellen (CD34) und Endothelzellen (CD31). Als weiterer Vertreter des Tumorstromas wurde das Vorhandensein von Makrophagen durch Nutzung des Markers F4/80 untersucht. Durch Verwendung verschiedener Zelllinien bei Generierung der Sphäroide sollte zudem untersucht werden, ob verschiedene Tumore in der Lage sind, unterschiedliche Zellpopulationen aus dem Aortengewebe zu rekrutieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Inkubator	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Mikroskope	Phasenkontrastmikroskop: Leica DM IL LED Fluo, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar Konfokalmikroskop: Nikon Eclipse Ti-A1
Schlittenmikrotom	Leica SM 2000R, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Schüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Sterilbank	Prettl, Bempflingen
Waage	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach
Vortex	LMS Co., Ltd., Tokio, Japan
Zentrifugen	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich; Eppendorf AG, Hamburg
48-/96-well-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Falcons	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Filter	Pall Corporation, Newquay, Cornwall, UK
Glaspipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Insulinspritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Objektträger	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipetten	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Butterflynadel 21G	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Einmalskalpell	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Feinpinzette	Manufactures D'Outils Dumont SA, Montignez, Schweiz
Präparierschere	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Spritzen	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen

## 2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Fertiglösungen

Agarose	AppliChem GmbH, Darmstadt
Alginat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Aluminiumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Calciumchloriddihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
DAB	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DePeX	Serva GmbH, Heidelberg
D-Glucose	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kernechtrot	Merck KGaA, Darmstadt
L-Glutamin	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Na-Bicarbonat 7,5%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Na-Pyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
NaOH	AppliChem GmbH, Darmstadt
NGS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Nickelsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Paraffin	Histosec Pastillen, Merck KGaA, Darmstadt
PFA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kollagen	PureCol Type1 Bovine Collagen Solution, AdvancedBioMatrix, San Diego, USA
Trypsin EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
VEGF-A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

Ammoniumchlorid für DAB	9 g $\text{NH}_4\text{Cl}$ wurden mit 50 ml destilliertem $\text{H}_2\text{O}$ gemischt
Citratpuffer, pH 6,0	2,1g $\text{C}_2\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$ wurden mit destilliertem $\text{H}_2\text{O}$ auf 1000ml aufgefüllt und mit NaOH auf einen von pH 6,0 eingestellt
DAB	5 g DAB wurden in 222,22 ml Tris-NaCl Puffer (pH = 7,4) gelöst
DAB-Lösung	67,5 ml Phosphatpuffer wurden mit 1,35 ml $\text{NiSO}_4$ , 1,35 ml 10 % Glucose, 150 $\mu\text{l}$ $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1,5 ml DAB und 225 $\mu\text{l}$ Glukose-Oxidase gemischt
Glukose (10%) für DAB	10 g $\alpha/\beta$ D-Glukose-Gemisch wurden mit 100 ml destilliertem $\text{H}_2\text{O}$ gemischt
Kernechtrot	1000 ml destilliertes $\text{H}_2\text{O}$ wurden mit 50 g $[\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times 18 \text{H}_2\text{O}]$ und 1 g Kernechtrot gemischt
Nickelsulfat für DAB	1,3 g $\text{NiSO}_4$ wurden mit 100 ml destilliertem $\text{H}_2\text{O}$ gemischt
0,1M PBS pH 7,4	6,8g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1g KCl, 1g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 40,03g NaCl; Mischung wurde mit destilliertem $\text{H}_2\text{O}$ auf 5l aufgefüllt und mit HCl auf einen pH von 7,4 eingestellt
0,1M Phosphatpuffer für DAB	4,9g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ und 29,2g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ wurden mit destilliertem $\text{H}_2\text{O}$ auf 2000ml aufgefüllt und mit NaOH auf einen pH von 7,36 eingestellt

## 2.1.4 Medien und Kits

Standardmedium	500ml DMEM + 4,5g/l D-Glukose + L-Glutamin + Pyruvat (Life Technologies GmbH, Darmstadt) 50 ml fetales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert bei 56 °C für 30 Minuten (Merck KGaA, Darmstadt) 5 ml Penicillin/Streptomycin (P/S) (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Opti-MEM (1x) + GlutaMAX	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Minimal Essential Medium (MEM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Vectastain Elite ABC Standard Kit (PK_6100)-Peroxidase	Reagenz A (Avidin-Lösung) Reagenz B (biotinyliertes Enzym) Linaris GmbH, Dossenheim

## 2.1.5 Antikörper

Tabelle 1: Primärantikörper

Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Hersteller	Markierung
NG2	Kaninchen	1:50	Sigma	Marker für Perizyten
F4/80	Ratte	1:100	abcam	Oberflächenmarker für Makrophagen
CD34	Ratte	1:50	abcam	Oberflächenmarker für endotheliale Vorläuferzellen
CD31	Kaninchen	1:50	Santa Cruz	Oberflächenmarker für Endothelzellen

Tabelle 2: Sekundärantikörper

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller	Markierung
Goat-anti-rabbit-biotin	Kaninchen	1:250	Dianova	biotinylierter Antikörper
Goat-anti-rat-biotin	Ratte	1:250	Dianova	biotinylierter Antikörper

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Verwendete Zelllinien

Für die Experimente wurden verschiedene murine Tumorzelllinien genutzt.

Tabelle 3: Murine Tumorzelllinien

Tumorlinie	Tumor	Gewebe	Mausstamm
MT6	Sarkom	Bindegewebe	C57Bl6/J
4T1	Adenokarzinom	Brust	BALB/c
EMT6	Karzinom	Brust	BALB/c

#### 2.2.1.2 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mithilfe einer Neubauer-Zählkammer. Unter dem Mikroskop wurde bei zehnfacher Vergrößerung mindestens ein Großquadrat (entspricht 16 Kleinquadraten) gezählt, wobei unregelmäßig geformte Zellen sowie Zellfragmente ausgeschlossen wurden. Die Zellzahl pro ml wurde mit folgender Formel errechnet:

Anzahl der gezählten Zellen  $\times 10^4$

#### 2.2.1.3 Zellkulturführung

Die Zellen wurden unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchtigkeit) mit DMEM zuzüglich 10% FCS und 1% P/S (im Folgenden als Standardmedium bezeichnet) in 25 cm<sup>2</sup>- oder 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen kultiviert. Etwa zweimal pro Woche wurden sie im Verhältnis 1:10 gesplittet. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA abgelöst. Nach vollständiger Ablösung wurden die Zellen mit einer dem Splitverhältnis entsprechenden Menge an Medium versetzt und in neue Kulturflaschen verbracht.

#### 2.2.1.4 Herstellung von Tumorsphäroiden

Eine Lösung aus 1%-iger Agarose wurde in der Mikrowelle zum Kochen gebracht und anschließend sofort im flüssigen, heißen Zustand verwendet. 45µl Agarose wurde pro well auf eine 96-well-Platte aufgetragen und sollte anschließend 60 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen. Die nun feste Agarose bildete ab diesem Zeitpunkt eine nicht-adhärenente Bodenfläche und besaß eine konkave Form.

Während des Abkühlvorgangs wurden die Tumorzellen vorbereitet. Konfluente Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA abgelöst und 1:10 mit Standardmedium verdünnt. Nach der Zellzahlbestimmung wurde die Zellsuspension mit Standardmedium auf 1000 Zellen/100µl verdünnt. 100µl dieser Suspension wurden pro well auf die feste Agarose pipettiert, anschließend wurden noch weitere 100µl des Standardmediums pro well hinzugefügt. Die Zellen wurden im Brutschrank kultiviert und bereits nach einigen Stunden bildeten sich aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften der Agarose in der Mitte der wells Zell-Zell-Kontakte zwischen den Tumorzellen aus. Diese verstärkten sich im weiteren Verlauf der Kultivierung. Die Tumorzellen bildeten komplexe dreidimensionale Strukturen aus.

Bei den so entstandenen Tumorsphäroiden wurden alle zwei Tage vorsichtig jeweils 100µl des Mediums gewechselt. Nach sechs Tagen wurden die Sphäroide zu den Aortenringen gesetzt (siehe Punkt 2.2.2.3)

#### 2.2.1.5 Herstellung von Alginatbeads

Konfluente Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Nach Zugabe von Standardmedium und der Zellzahlbestimmung wurde das benötigte Volumen entnommen, um 3 oder  $4,5 \times 10^6$  Zellen zu erhalten. In 50ml-Falcons wurde dieses Volumen fünf Minuten lang bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, mit 5ml PBS gewaschen und ebenfalls abgesaugt. Nun wurde so viel DMEM ohne FCS hinzugefügt, dass eine Konzentration von  $3 \times 10^7$  Zellen pro Milliliter erreicht wurde. Die doppelte Menge an 1,5-prozentigem Alginat in NaCl-Lösung wurde zu der Zellsuspension gegeben und unter Vermeidung von Luftblasen vorsichtig durchmischt. Diese Zell-Alginat-Mischung wurde nun zehn Minuten lang entgast, um eventuell vorhandene, kleine Luftblasen zu entfernen. Während dieser Zeit wurden 50 ml 50millimolares  $\text{CaCl}_2$  im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Zellmischung wurde in eine Insulinspritze gefüllt, die  $\text{CaCl}_2$ -Lösung in ein Becherglas, das auf einem Rührer platziert wurde. In einem Abstand von circa 2cm wurde die Zellmischung nun langsam und tröpfchenweise auf die Oberfläche der  $\text{CaCl}_2$ -Lösung aufgebracht. Dabei knüpfte das Alginatgel mitsamt den darin enthaltenen Zellen Verbindungen mit den divalenten Calcium-Ionen der  $\text{CaCl}_2$ -Lösung und es formten sich Gelkugeln, die so genannten Alginatbeads. Die  $\text{CaCl}_2$ -Lösung wurde abgesaugt und die Alginatbeads anschließend mit 20 ml PBS gewaschen. Um die Stabilität der Beads weiter zu verbessern wurde 1ml Poly-L-Lysin für fünf Minuten hinzugefügt. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS wurde für fünf Minuten 1/10tel des vorhandenen Volumens an 1,5%igem Alginat hinzugefügt. Es folgte ein dritter Waschschrift mit 20ml PBS bevor 6 ml Standardmedium zu den Beads gegeben wurde. Diese Mischung wurde auf eine 6-well-Platte verteilt, wobei je 2ml Flüssigkeit pro well eingesetzt wurden.

Anschließend wurden die Beads über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und am darauffolgenden Tag wurden die Alginatbeads zu den Aortenringen gesetzt. (siehe Punkt 2.2.2.4)

## **2.2.2 Aorten-Tumor-Konfrontationsassay**

### 2.2.2.1 Herstellung von Aortenringen

Die verwendeten Mäuse gehörten dem C57Bl6/J-Stamm an und waren Wildtypen. Die Mäuse waren zwischen 8 und 15 Wochen alt. Nach der Tötung der Mäuse mittels Genickbruch wurde das Peritoneum durch Inzision der Hautschicht und anschließende Mobilisierung derselben nach kranial bzw. kaudal freigelegt. Anschließend wurde die Bauchhöhle eröffnet und das Diaphragma von abdominaler Seite aus abpräpariert. Rippen und Sternum wurden wegpräpariert und die A. iliaca communis dextra inzidiert. Die Bauchorgane wurden mit Ausnahme der Nieren entfernt, ebenso Lungen und Thymus. Mithilfe einer 21G-Butterflynadel wurde vorsichtig der linke Ventrikel punktiert und es wurden ca. 10ml PBS injiziert. Dadurch konnte die Aorta durchspült und von intraluminalem Blut befreit werden. Unter dem Mikroskop wurde anschließend mithilfe einer Feinpinzette und einer chirurgischen Schere das periaortale Fettgewebe entfernt, ohne die Wand der Aorta zu verletzen. Nach vollständiger Säuberung wurde das Gefäß herznah und auf Höhe der Nieren durchtrennt und in eine Petrischale verbracht. Unter dem Mikroskop wurde die Aorta in Ringe von <1mm Dicke geschnitten. Die Ringe wurden auf Eis in PBS bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.2.2.2 Herstellung der Kollagenmischung

Die verschiedenen Komponenten sind in der untenstehenden Liste aufgeführt.

	1ml
H <sub>2</sub> O	395µl
MEM	100µl
L-Glutamin	10µl
Na-Pyruvat	10µl
PureCol	400µl
Na-Bicarbonat	50µl
P/S	4µl
NaOH	4µl

Die Zutaten wurden in der angegebenen Reihenfolge und unter sterilen Bedingungen in einen Erlenmeyerkolben pipettiert. Auf Eis gelagert wurde die Mischung an eine Vakuumpumpe angeschlossen und für mindestens eine Stunde entgast.

### 2.2.2.3 Ring-Sphäroid-Konfrontationsassay

In eine 48-well-Platte wurden je well 150µl bzw. 200µl der Kollagenmischung pipettiert. Im Brutschrank polymerisierte das flüssige Kollagen bei 37°C und bildete nach ca. einer Stunde eine feste, gelartige Schicht. Die Tumorzellsphäroide wurden in je 20µl Standardmedium vereinzelt. Nach Zugabe von 40µl flüssiger Kollagenmischung pro Sphäroid wurden die Tumorzellen in 50µl Kollagen-Medium-Mischung aufgenommen und auf die 150 µl fassende, feste Kollagenschicht verbracht. Die Zugabe von Kollagen sollte dazu beitragen, die Aortenringe bei Pipettierung der zweiten Kollagenschicht besser in ihrer Position zu halten. Unter Zuhilfenahme des Mikroskops wurde je ein Aortenring mittels einer Feinpinzette in die Nähe des Tumorsphäroids platziert. Die Öffnung des Ringes sollte hierbei nach oben zeigen. Als Kontrollen dienten Ringe, die ohne Sphäroid in wells platziert wurden, die 200µl Kollagen enthielten. Die unterschiedliche Dicke der unteren Kollagenschicht sorgte dafür, dass mit oder ohne Zugabe von Sphäroiden und der damit verbundenen zusätzlichen Menge an Kollagen die Ringe von annähernd derselben Menge Kollagen umgeben waren.

Nachdem die Ringe 15 Minuten im Brutschrank belassen wurden und sich auf diese Weise stärker mit der unteren Kollagenschicht verbinden konnten, wurde vorsichtig die zweite Kollagenschicht - 200µl pro Ring - zugegeben. Nach Polymerisierung dieser Schicht im Inkubator wurden den Ring-Sphäroid-Kombinationen je 300µl Standardmedium zugeführt, während die als Kontrolle dienenden Ringe 300µl DMEM 10%FCS mit 1%P/S und 30ng/ml VEGF oder ebenfalls 300µl Standardmedium erhielten.

An Tag 4 wurde erstmals das Medium ausgetauscht, sowie im weiteren Verlauf alle zwei bis drei Tage bis zum Versuchsende.

Um die Vorgänge im Verlauf der Inkubationsperiode beobachten zu können, wurden an Tag 3 oder 4 die Platten mit den Ring-Sphäroid-Konfrontationsassays erstmals mithilfe eines Phasenkontrastmikroskops begutachtet. Dieser Vorgang wurde mindestens an den Tagen wiederholt, an denen Anteile der Versuchsreihe mit 4-prozentigem Formalin fixiert wurden.

### 2.2.2.4 Ring-Bead-Konfrontationsassay

In eine 48-well-Platte wurden je well 200µl der Kollagenmischung pipettiert. Im Brutschrank polymerisierte das flüssige Kollagen bei 37°C und bildete nach ca. einer

Stunde eine feste, gelartige Schicht. Die vereinzelt Beads wurden vorsichtig mit einem Spatel auf das Kollagen platziert, 40µl flüssige Kollagenmischung wurde hinzugefügt. Dies sollte dazu beitragen, die Aortenringe bei Pipettieren der zweiten Kollagenschicht besser in ihrer Position zu halten. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde mithilfe einer Feinpinzette je ein Aortenring in die Nähe eines Tumorbeads platziert.

Nachdem die Ringe 30 Minuten im Brutschrank belassen wurden und sich auf diese Weise stärker mit der unteren Kollagenschicht verbinden konnten, wurde vorsichtig die zweite Kollagenschicht - 200µl pro Ring – zugegeben. Nach Polymerisierung dieser Schicht im Inkubator wurden dem Ring-Bead-Konfrontationsassay je 300µl Standardmedium zugeführt, während die als Kontrolle dienenden Ringe 300µl DMEM 10%FCS mit 1%P/S und 30ng/ml VEGF oder ebenfalls 300µl Standardmedium erhielten.

An Tag 4 wurde erstmals das Medium ausgetauscht, sowie im weiteren Verlauf alle zwei bis drei Tage bis zum Versuchsende.

#### 2.2.2.5 Fixierung und Einbettung der Konfrontationsassays

Nach Absaugen des Mediums wurden die Ringe mit je 700µl Formalin (4%) für 24 Stunden fixiert. Das PFA wurde abgesaugt und die Konfrontationsassays vorsichtig mithilfe eines Spatels aus dem Well herausgehoben und in einer Einbettkassette in 70-prozentiges Ethanol verbracht. Das überschüssige PFA wurde 2-3x jeweils mind. 1h in 70-prozentigem Ethanol ausgewaschen. In den Einbettkassetten wurden die Proben sodann an das Einbettkarussell angehängt. Es folgte eine Entwässerung in einer ansteigenden Alkoholreihe: 70% EtOH I und II je 30min; 80% EtOH, 96% EtOH, 100% EtOH I, II, III je 1h. Als Intermedium wurde Xylol genutzt (Xylol I, II und III jeweils 1h). Nun fand die Paraffineinbettung statt, in Paraffin mit einem Schmelzpunkt von 56-58°C: Paraffin I und II jeweils 3h. An der Gießstation folgte die Herstellung von Paraffinblöcken, die anschließend mit einem Schlittenmikrotom in 10µm dicke Proben geschnitten und letztlich auf SuperFrost-Objektträger aufgezogen wurden.

#### **2.2.3 Diaminobenzidinfärbung**

Die Diaminobenzidin (DAB)-färbung gehört zur Gruppe der immunhistochemischen Färbungen. Deren Prinzip beruht auf der Darstellung bestimmter Gewebeeigenschaften mittels einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion. Der Antikörper bindet an das gesuchte Epitop und das Vorhandensein des Antikörpers wird anschließend mittels eines

Detektionssystems sichtbar gemacht. Bei der DAB-Färbung bindet der Primärantikörper an das für ihn passende, gesuchte Antigen. An den Primärantikörper bindet anschließend der aus einer anderen Spezies stammende Sekundärantikörper. Der Sekundärantikörper ist mit Biotin markiert (biotinyliert). Biotin ist Vitamin H und zeigt eine große Affinität zu Avidin. Dieses ist im ABC-Komplex gemeinsam mit Biotin und Peroxidase vorhanden. Der ABC-Komplex wird auf die zu untersuchenden Schnitte gegeben. So bindet die Peroxidase an den Sekundärantikörper. Die Enzyme katalysieren nun die Umsetzung des Chromogens DAB durch Wasserstoffperoxid zu einem stabilen Farbstoff. Dieser ist schlussendlich mikroskopisch detektierbar und belegt das Vorhandensein des Antigens. Die Zugabe von Nickelsalzen kann das braune Endprodukt zu einer blauschwarzen Färbung verändern. Dies dient der Kontrastverstärkung [158].

Zunächst wurden die Gewebeschnitte deparaffiniert, damit der Antikörper das Gewebe erreichen kann. Dazu wurden die Schnitte je 10 min in Xylol II und Xylol I belassen. In einer absteigenden Alkoholreihe erfolgte anschließend die Rehydrierung, dazu wurden die Proben je 5 min in den folgenden Lösungen belassen: 100% EtOH II, 100% EtOH I, 96% EtOH, 80% EtOH, 70% EtOH, dest. H<sub>2</sub>O. In einer 3%-igen wässrigen Lösung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erfolgte die Blockade der endogenen Peroxidase durch kompetitive Hemmung für 10 min auf einem Schüttler. Nach zwei 5-minütigen Waschschritten in destilliertem H<sub>2</sub>O wurde eine Antigendemaskierung durchgeführt. Dazu wurden die Gewebeschnitte in Citratpuffer (10 mM, pH 6,0) erhitzt. Nach Aufkochen für 10 Sekunden kühlten die Proben eine Minute lang ab. Dieser Schritt wurde insgesamt sieben Mal wiederholt. Anschließend kühlten die Gewebeschnitte dreißig Minuten in dem Citratpuffer ab, bevor der Puffer 5 min unter fließendem destilliertem H<sub>2</sub>O ersetzt wurde. Es erfolgten drei weitere Waschschriffe unter Schütteln in PBS. Nun folgte die Blockierung in 5% NGS in PBS für zwei Stunden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Dies diente dazu, eine Hintergrundfärbung durch Blockade unspezifischer Bindungen zu verhindern. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, der je nach verwendetem Antikörper 1:50 oder 1:100 mit 0,2% BSA, 1% NGS in PBS verdünnt auf die Schnitte gegeben wurde. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Parallel wurden immer Negativkontrollen mitgeführt, die ohne Primärantikörper inkubiert wurden, sondern lediglich mit 0,2% BSA, 1% NGS in PBS. Dies diente der Kontrolle der Antikörperspezifität.

Am darauffolgenden Tag wurde die Antikörperlösung vorsichtig mithilfe einer Glaspipette mit PBS abgespült. Anschließend folgten drei Waschschrte mit PBS für je 5 min. Dies erfolgte unter Schütteln. Der Sekundärantikörper, der gegen die Tierspezies des verwendeten Primärantikörpers ausgewählt worden war, wurde mit einer Verdünnung von 1:250 mit 1% NGS in PBS auf die Gewebeschnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Dreißig Minuten vor Ende der Inkubationszeit wurde der Avidin-Biotin (ABC)-Komplex gemischt, wobei A und B je 1:250 in PBS verdünnt wurden. Dieser bindet an den biotinylierten Sekundärantikörper. Alle weiteren Schritte erfolgten im Dunkeln. Die Gewebeschnitte wurden nochmals drei Mal für je 5 min in PBS auf einem Schüttler gewaschen. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem ABC-Komplex für 30 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Es folgten vier weitere Waschschrte unter Schütteln zu je 5 min: zwei Mal in PBS und zwei Mal in Phosphatpuffer (0,1 M; pH 7,4). Während der Waschschrte wurde der DAB-Entwicklungsansatz gemischt. Die Glukose-Oxidase wurde als letztes erst kurz vor Beendigung der Waschschrte hinzugegeben, da mit ihrer Zugabe die enzymatische Reaktion startet. Die DAB-Lösung wurde zu Proben in eine dunkle Küvette gegeben und unter mikroskopischer Kontrolle erfolgte die Färbereaktion. Nach ca. 15-20 Minuten (wenn eine ausreichende Signalintensität erreicht worden war) wurde die Entwicklung gestoppt, indem die Schnitte drei Mal je 5 min in PBS unter Schütteln gewaschen wurden. Nun konnte wieder bei Licht gearbeitet werden. Nach einem kurzen Eintauchen in destilliertes H<sub>2</sub>O erfolgte eine Kernfärbung mit Kernechtrot 0,1% für 90 Sekunden, um später eine bessere Beurteilung der Morphologie zu ermöglichen. Die Gewebeschnitte wurden nochmals kurz in destilliertes H<sub>2</sub>O eingetaucht bevor die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe erfolgte (70% EtOH, 80% EtOH, 96% EtOH je 1 min; 100% EtOH I, 100% EtOH II je 3 min; Xylol I, Xylol II je 5 min). Abschließend wurden die Schnitte mit DePeX eingedeckelt.

#### **2.2.4. Mikroskopie**

Um die Vorgänge im Verlauf der Inkubationsperiode des Ring-Bead-Konfrontationsassays beobachten und dokumentieren zu können, wurden an Tag 3 oder 4 die Platten mit den Ring-Bead-Konfrontationsassays erstmals mithilfe des Phasenkontrastmikroskops Leica DM IL LED Fluo begutachtet und fotografiert. Dieser Vorgang wurde mindestens am Inkubationstag 6 und 10 wiederholt. Das Ausmaß der

aussprossenden Zellen wurde in vier Kategorien von 0 bis 3 eingeteilt, wobei in Kategorie „0“ keine aussprossenden Zellen zu beobachten waren, in Kategorie „+“ einzelne ausgewanderte Zellen, in Kategorie „++“ mehrere, weiter vom Ring entfernte Zellen und in Kategorie „+++“ sehr viele Zellen weit vom Ring hinaus in die gesamte umgebende Kollagenmatrix ausgewandert waren. Bilder der DAB-gefärbten Proben wurden mit Hilfe des Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskops Keyence BZ-9000 aufgenommen.

### **2.2.5 Elektronische Bildverarbeitung**

Für die quantitative Auswertung der DAB-gefärbten Schnitte wurde das Bildverarbeitungsprogramm ImageJ genutzt. Zur Auswertung der DAB-Färbung wurden die ausgewanderten Zellen pro Schnitt gezählt. Anschließend erfolgte eine Einteilung der Gesamtzahl in die Kategorien stark positiv, schwach positiv und negativ anhand der Färbereaktion der Zellen.

### **2.2.6 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit *SAS 9.3*.

Kategoriale Variablen wurden mit absoluten und relativen Häufigkeiten deskriptiv dargestellt und mittels Balkendiagrammen visualisiert. Verteilungsunterschiede hinsichtlich dieser Kategorien zwischen den Gruppen wurden mit dem  $\chi^2$ -Test auf Signifikanz überprüft. Zur unterstützenden Interpretation etwaiger Lageunterschiede wurde zusätzlich der Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt.

Verteilungsunterschiede hinsichtlich der ausgezählten Häufigkeiten in den DAB-Färbungen zwischen den unterschiedlichen Bedingungen wurden mittels des Wilcoxon-Tests für unabhängige Stichproben auf Signifikanz überprüft.

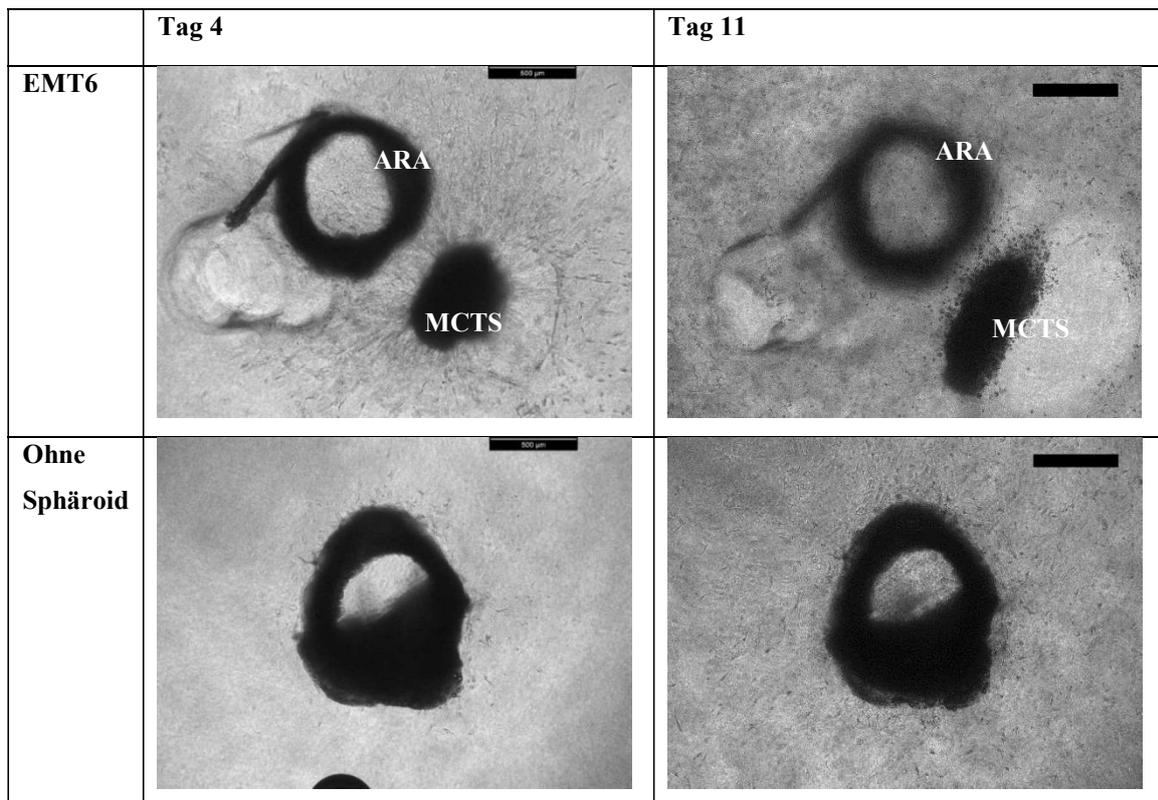
Als statistisch signifikant galten p-Werte  $< 0,05$  (hochsignifikant  $< 0,01$ ; höchstsignifikant  $< 0,001$ ).

Die graphische Darstellung erfolgte mittels *Excel 2013* und *Prism*.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Aortenring-Tumorsphäroid-Konfrontationsassay**

Zunächst wurden die in unserem Institut bereits etablierten Methoden der Generation von Tumorsphäroiden und der Kultivierung von murinen Aortenringen in Kollagengel kombiniert. Dazu wurden die Ringe gemeinsam mit zuvor gebildeten Sphäroiden zwischen zwei Schichten Kollagen eingebettet. Als Standardmedium diente DMEM mit 10% FCS und 1% P/S. Als Versuchsdauer wurden zunächst 11 Tage festgelegt, ein Zeitraum, bis zu dem sich die Regression der neu gebildeten Gefäße in vorherigen Experimenten noch nicht beobachten ließ. Während der Versuchsdauer stellte sich jedoch heraus, dass sich die Zell-Zell-Verbindungen der Tumorsphäroide bei Kontakt mit dem Kollagen - einer adhärenen Oberfläche – lösten und die Tumorzellen sich über die gesamte verfügbare Fläche ausbreiteten. Die MCTS wurden im Versuchsverlauf ausgehöhlt. Es kam es zu einer Mischung von Tumorzellen mit den aus der Aortenwand stammenden Zellen und dadurch ließ sich eine Aussprossung der Aortenringe nicht beurteilen, da überall auch ausgewanderte Tumorzellen zu finden waren. Bei Ringen, die ohne Sphäroid kultiviert worden waren, konnte dagegen eine zunehmende Aussprossung von Zellen während des Versuchszeitraums beobachtet werden.

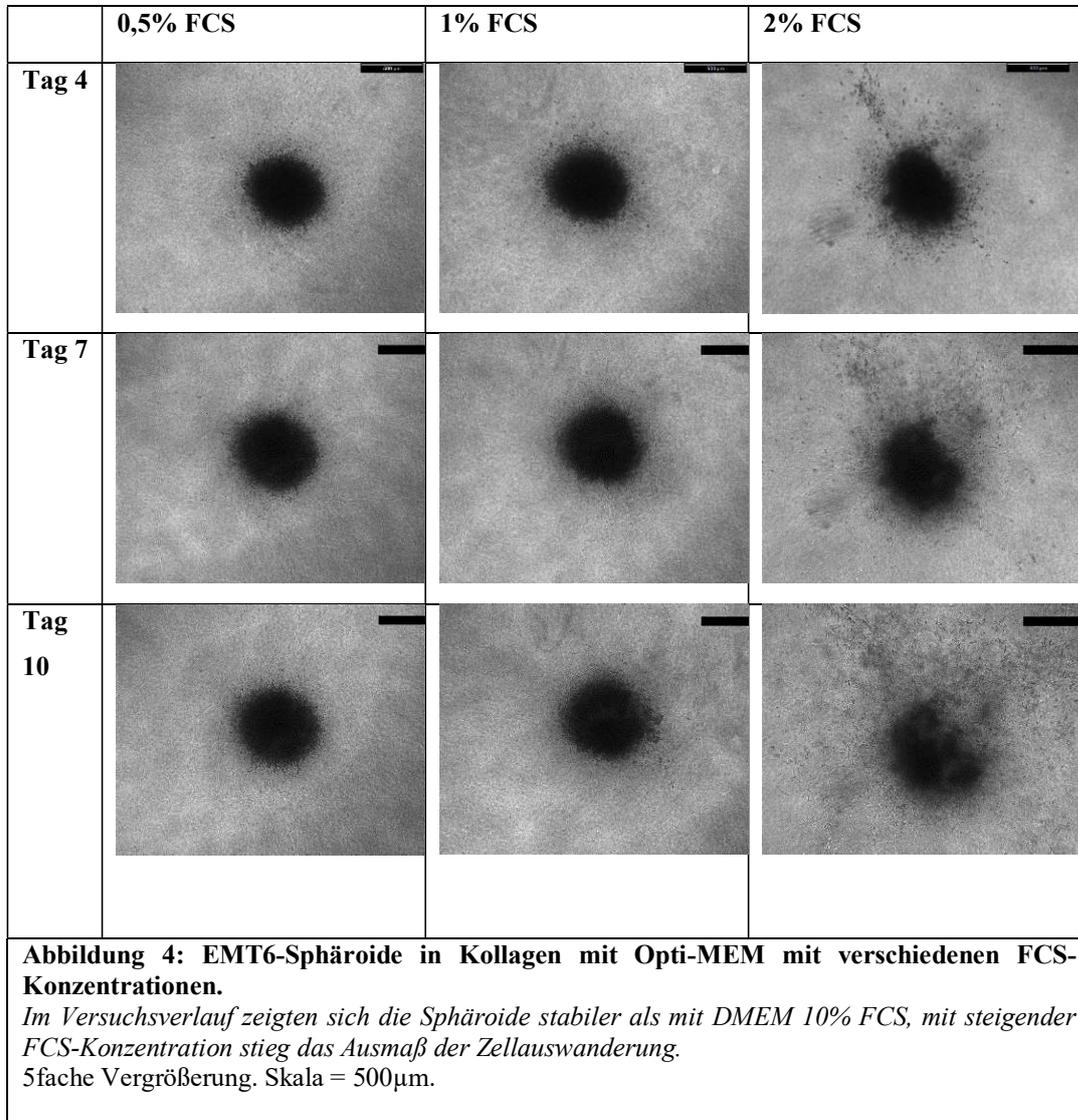


**Abbildung 3: Aortenring-Sphäroid-Konfrontationsassay.**

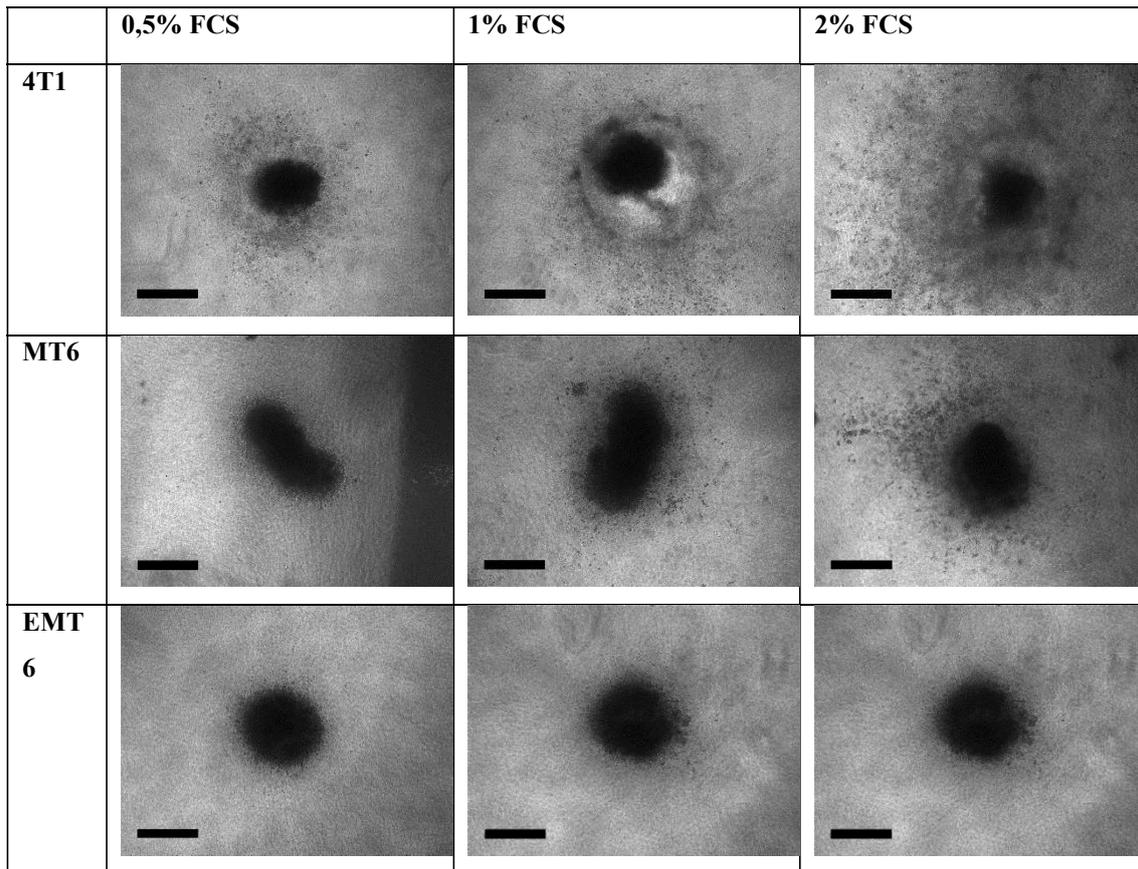
*Oben: Die Aortenringe wurden mit je einem EMT6-Sphäroid in Kollagen ko-kultiviert. Bereits am Kulturtag 4 ist eine deutliche Auswanderung der Tumorzellen zu sehen, die im weiteren Verlauf zunimmt und eine Beurteilung der Aussprossung aus dem Aortenring unmöglich macht. Unten: Die Situation ohne Tumorsphäroid, mit VEGF-Zusatz im Medium. Eine Zunahme der Zellauswanderung ist zu beobachten. 5fache Vergrößerung. Links Tag 4, rechts Tag 11. Skala = 500µm.*

Um das Auswandern der Tumorzellen aus den MCTS zu verhindern, wurde versucht das Standardmedium durch Opti-MEM mit geringeren Serumkonzentrationen zu ersetzen. Die verminderte Serumkonzentration, die in dem für geringe Serummengen optimierten Medium möglich ist, sollte die Migrationstendenz der Tumorzellen vermindern. Zunächst sollte daher untersucht werden, ob dies eine Auswanderung der Tumorzellen vermindert. Dazu wurde je ein Sphäroid allein ohne Ring in Kollagen eingebettet, als FCS-Konzentration wurden 0,5%, 1% und 2% gewählt. Dieser Versuch wurde mit Tumorsphäroiden aus den drei verschiedenen Tumorzelllinien, nämlich EMT6, MT6 und 4T1 durchgeführt. Dabei war zu beobachten, dass die MCTS bei allen Bedingungen im Vergleich zu der Kultivierung mit Standardmedium einen besseren Zusammenhalt aufwiesen. Zudem stellte sich heraus, dass die Auswanderung der Tumorzellen mit

steigender Serumkonzentration zunahm. Auch mit steigender Versuchsdauer nahm die Zahl der ausgewanderten Tumorzellen zu, das Ausmaß dieser Steigerung war ebenfalls von der Serumkonzentration abhängig.



Die MT6- und EMT6-Sphäroide zeigten dabei eine geringe Auswanderungstendenz, 4T1-Sphäroide wanderten im Vergleich dazu stärker aus. Bei allen drei Tumor-Zelllinien blieb die Auswanderung unter dem Niveau der Vorversuche mit DMEM 10% FCS, 1% P/S.



**Abbildung 5: Tumorsphäroide in Kollagen mit Opti-MEM mit verschiedenen FCS-Konzentrationen an Versuchstag 10.**

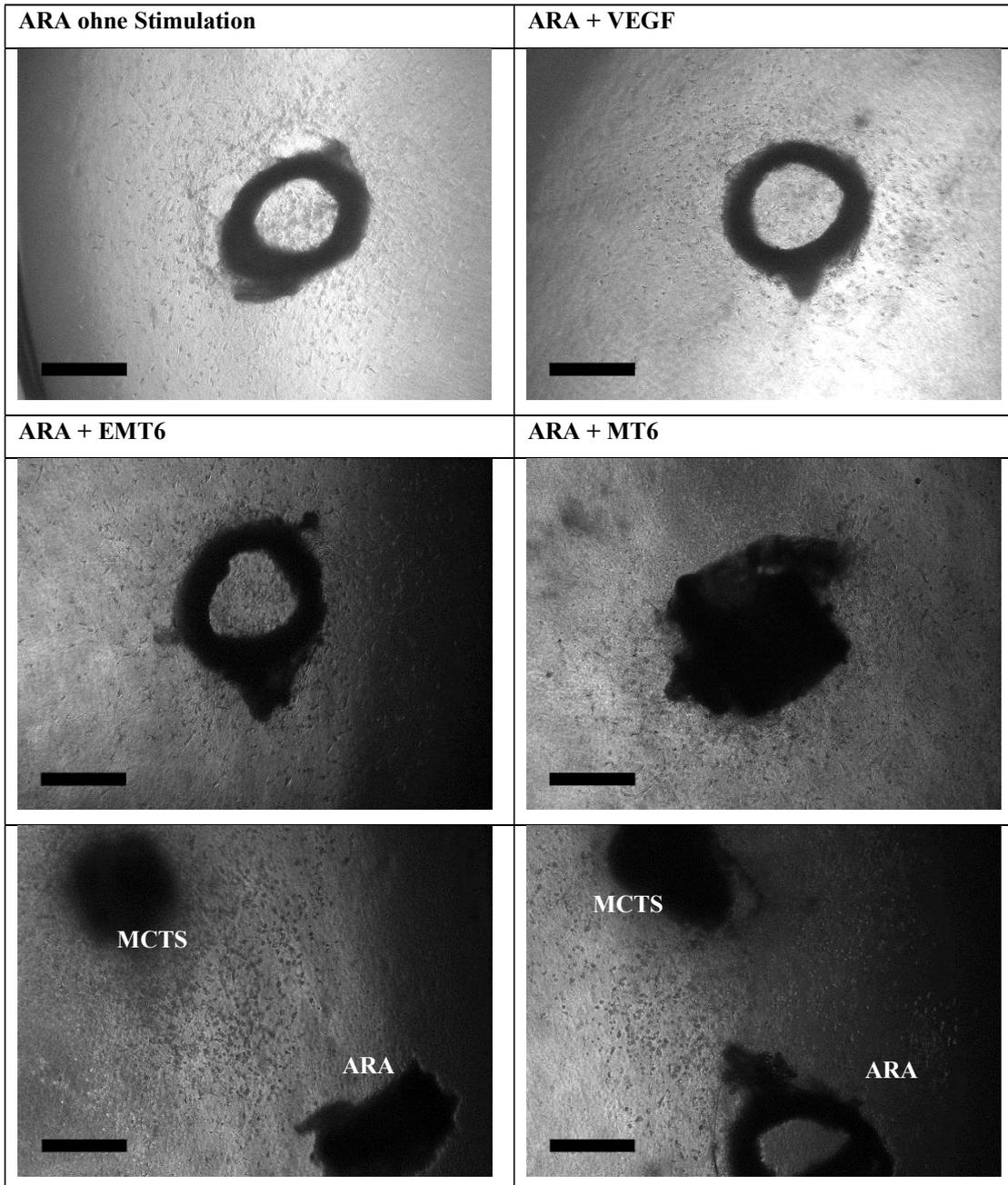
*Von links nach rechts ansteigende FCS-Konzentration, von oben nach unten die verschiedenen Zelllinien. Im Versuchsverlauf zeigten sich die Sphäroide stabiler als mit DMEM 10% FCS. Mit steigender FCS-Konzentration stieg das Ausmaß der Zellauswanderung bei allen Tumorzelllinien. Bei MT6- und EMT6-Sphäroiden ist ein geringerer Radius der auswandernden Zellen als bei 4T1-Sphäroiden zu beobachten.*

5fache Vergrößerung. Skala = 500µm.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde nun der Aorten-MCTS-Konfrontationsassay mit 4T1-, MT6- und EMT6-Sphäroiden sowie Aortenringen mit Opti-MEM 0,5% FCS als Medium durchgeführt, da unter dieser Bedingung die geringste Auswanderungsaktivität aus den Tumorsphäroiden beobachtet worden war. Bei Ko-Kultivierung zeigte sich im Versuchsverlauf keine suffiziente Auswanderung von Zellen aus dem Aortengewebe. Insbesondere die 4T1-Sphäroide zeigten zudem selbst bei der geringen Serumkonzentration von 0,5% eine starke Auswanderungstendenz, sodass die Verwendung von Sphäroiden aus dieser Zelllinie in einem Konfrontationsassay nicht geeignet erschien. Auch bei den Sphäroiden der beiden anderen Zelllinien stellte sich heraus, dass bei Ko-Kultivierung eine stärkere Auswanderung als bei den Vorversuchen

stattfand. Bei Ringen, die ohne Sphäroid eingebettet wurden, war dagegen bis zum Versuchsende keinerlei Auswanderung zu beobachten. Parallel mitlaufende Ringe, die mit Opti-MEM 2,5% FCS und einem VEGF-Zusatz kultiviert wurden, zeigten dagegen aus dem Aortengewebe auswandernde Zellen.

Daraufhin wurde der Konfrontationsassay mit Opti-MEM 2,5% FCS als Medium durchgeführt. Auf die 4T1-Zelllinie wurde hierbei verzichtet, da sie sich bereits im Vorexperiment als nicht geeignet erwiesen hatte. Verwendet wurden MCTS von MT6 und EMT6. Als Kontrollen dienten Ringassays ohne Sphäroide mit und ohne VEGF-Zusatz im Medium. Bei den Kontrollen zeigte sich eine gute Auswanderung aus dem Aortengewebe. Auch bei der Ko-Kultivierung konnte eine gute Auswanderung von Zellen aus der Gefäßwand beobachtet werden. Bei einem nicht zu vernachlässigenden Teil der Versuche ergab sich jedoch erneut das Problem, dass die Tumorsphäroide auf den nun erhöhten Serumanteil mit einer verstärkten Auswanderung von Zellen reagierten. Somit war eine zuverlässige Beurteilung der Auswanderung aus der Gefäßwand nicht möglich.



**Abbildung 6: Konfrontationsassay mit Opti-MEM 2,5% FCS an Versuchstag 9.**  
 Oben die Kontrollen ohne (links) und mit Stimulation durch VEGF (rechts). Eine gute Auswanderungsaktivität ist zu beobachten. In der Mitte Ringe mit Ko-Kultivierung mit Sphäroiden. Auch hier ist eine gute Aussprossung zu verzeichnen. Unten sind im Bild unten rechts jeweils die Ringe zu sehen; oben links jeweils die Tumorsphäroide. Es ergeben sich bei der Ko-Kultivierung erneut Probleme durch die Auswanderung der Tumorzellen aus dem sphäroidalen Verband. Dies verhindert die zuverlässige Beurteilung der Auswanderung aus den Aortenringen.  
 5fache Vergrößerung. Skala = 500µm.

Im Verlauf dieser Versuche ergab sich insgesamt ein nicht zufriedenstellendes Bild. Von den drei verschiedenen getesteten Bedingungen des Konfrontationsassays konnte keine den Ansprüchen an das Experiment genügen. Bei hohen Serumkonzentrationen verloren

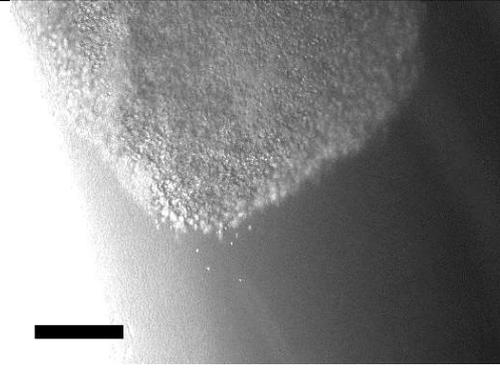
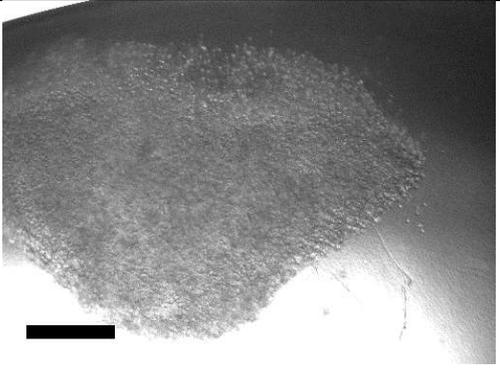
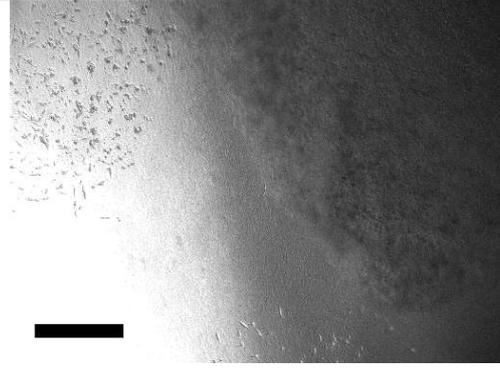
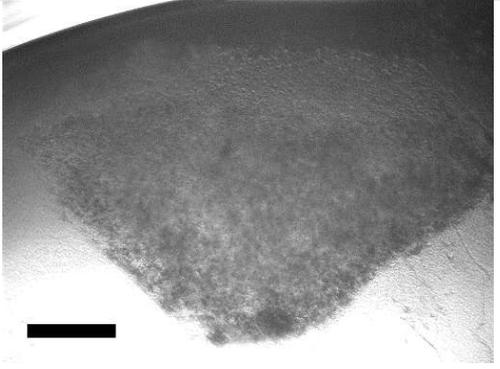
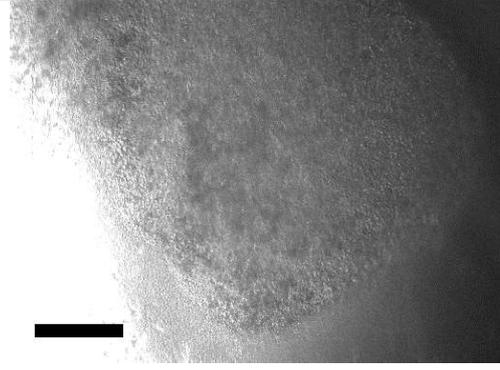
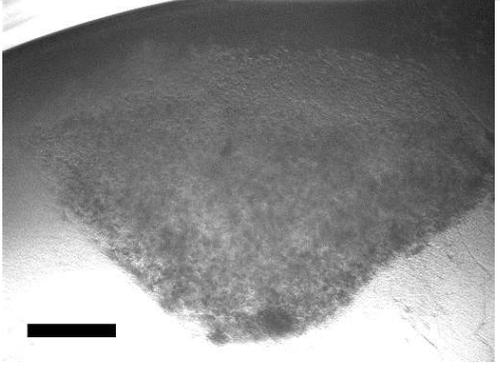
die Tumorsphäroide ihre Form und ließen eine Beurteilung der Ringaktivität nicht zu. Verringerte man die Serumkonzentration auf 0,5%, so ergab sich ein besserer Zusammenhalt der Sphäroide, jedoch zeigten die Ringe keinerlei oder eine nicht suffiziente Aussprossung von Zellen. Bei 2,5% FCS im Medium zeigte sich zwar eine Aussprossungs-Aktivität der Ringe, diese konnte jedoch wegen der ebenfalls stärkeren Auswanderung der Zellen aus den Tumorsphäroiden vielfach wiederum nicht beurteilt werden.

Um diese Hindernisse zu überwinden, wurde eine andere Methode der Generierung von MCTS ausgewählt. Bisher wurden die MCTS durch die „liquid-overlay“- Methode hergestellt, nun erfolgte die Enkapsulation in Alginat. Es sollte getestet werden, ob diese Tumorzell-Alginat-Beads einen stärkeren Zusammenhalt bei höheren Serumkonzentrationen aufweisen.

## **3.2 Etablierung des Aortenring-Bead-Konfrontationsassays**

### **3.2.1 Hohe Stabilität der Alginatbeads**

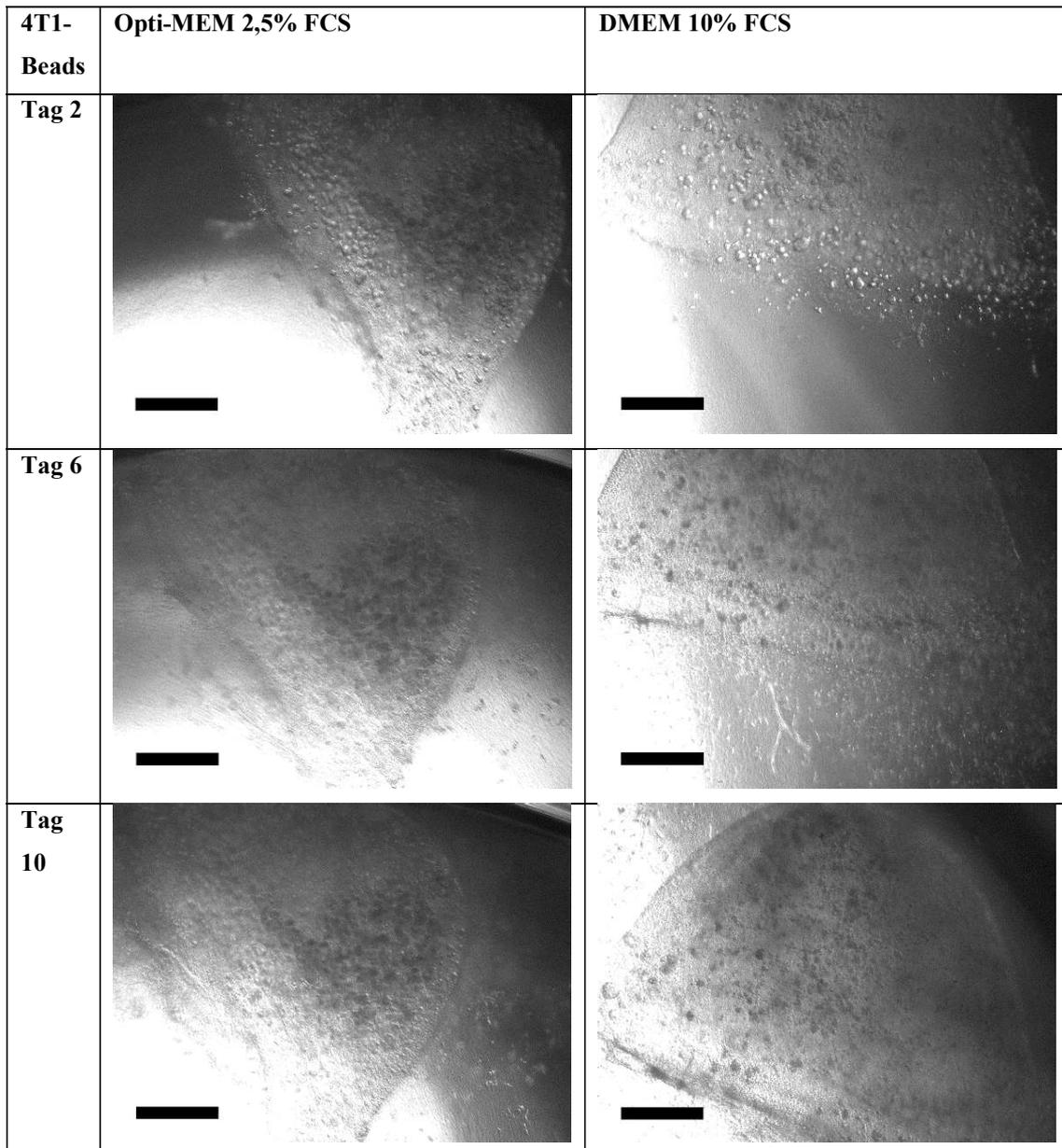
Bei der Herstellung von Alginatbeads wird eine Zell-Alginatmischung in eine  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gebracht, woraufhin das Alginat mit den divalenten Calciumionen eine Verbindung eingeht und sich Gelkugeln bilden, welche die (Tumor-)Zellen einschließen. Diese Alginatbeads wurden zunächst mit Zellen der Linien MT6 und 4T1 hergestellt. Sie wurden in Kollagen eingebettet und mit Opti-MEM 2,5% FCS 1% P/S oder DMEM 10% FCS 1% P/S kultiviert. Hierbei zeigten sich die Beads im Vergleich zu den mittels „liquid-overlay“- Technik gebildeten Sphäroiden als wesentlich stabiler. Sowohl bei Standardmedium als auch mit Opti-MEM war ein guter Zusammenhalt der Beads zu beobachten. Auch die in den Vorversuchen problematischen 4T1-Zellen blieben selbst nach 10 Tage in Kultur im Wesentlichen in ihrem Verband.

MT6- Beads	Opti-MEM 2,5% FCS	DMEM 10% FCS
Tag 2		
Tag 6		
Tag 10		

**Abbildung 7: Alginatbeads der Zelllinie MT6.**

*Sowohl bei Opti-MEM als auch bei DMEM ist über den Versuchsverlauf bis Tag 10 ein gutes Zusammenhalten der Beads zu beobachten.*

Links in Opti-MEM 2,5% FCS, rechts in DMEM 10% FCS. Oben Tag 2, in der Mitte Tag 6, unten Tag 10. 5fache Vergrößerung. Skala = 500µm.



**Abbildung 8: Alginatebeads der Zelllinie 4T1**

*Sowohl bei Opti-MEM als auch bei DMEM ist über den Versuchsverlauf bis Tag 10 ein gutes Zusammenhalten der Beads zu beobachten. Die 4T1-Beads, welche sich als Sphäroide rasch auflösten, bleiben in ihrer ursprünglichen Form.*

Links in Opti-MEM 2,5% FCS, rechts in DMEM 10% FCS. Oben Tag 2, in der Mitte Tag 6, unten Tag 10. 5fache Vergrößerung. Skala = 500µm.

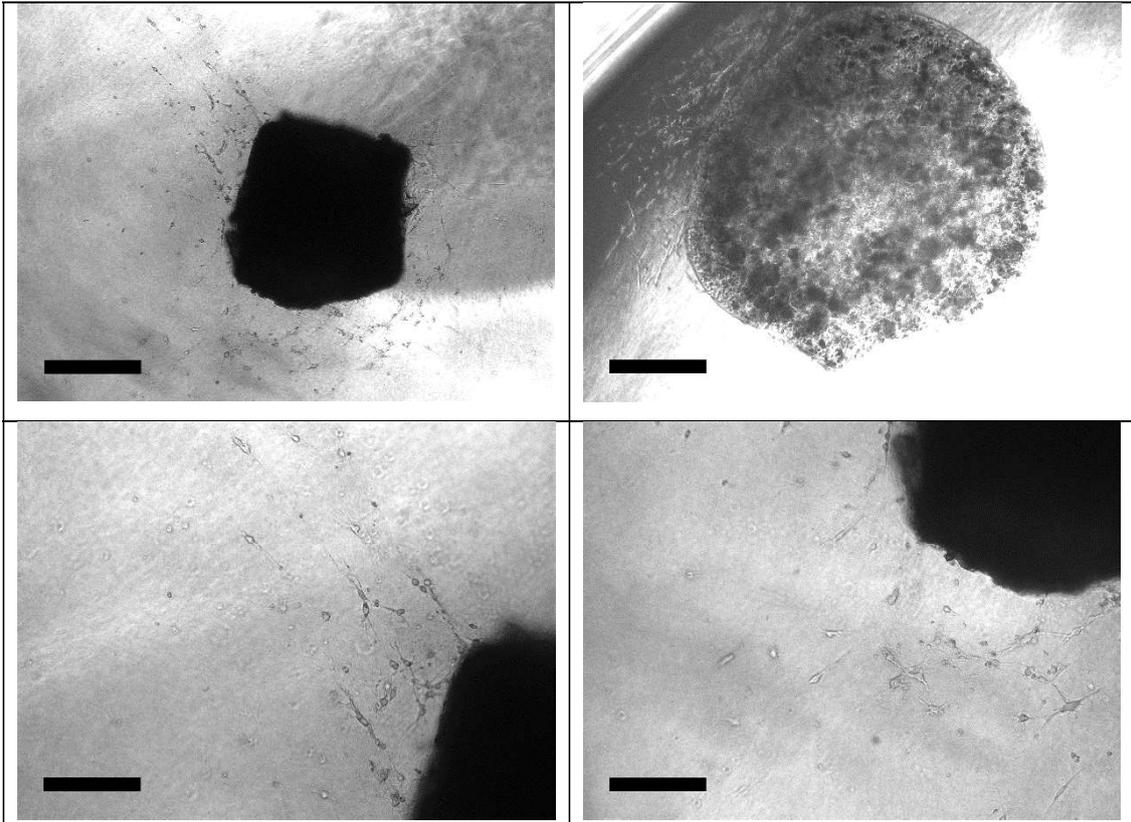
Die Alginatebeads blieben also auch in DMEM in ihrer Form, und dies bei einem Medium, das auch für die Aussprossung der Aortenringe gut geeignet ist. Basierend auf diesen Befunden war festzustellen, dass die Alginatebeads somit gut für den Konfrontationsassay geeignet sind und eine vielversprechende Alternative zu den zuvor genutzten Tumorsphäroiden darstellen. Bei diesem Versuch waren außerhalb der sehr stabilen

Alginatebeads allerdings Zellen zu beobachten, die im Versuchsverlauf auswanderten und sich über die ihnen gebotene Fläche weiträumig verteilten. Dies waren Zellen, die an der Außenseite der Gelkugeln anhefteten, aber nicht Teil der Alginatebeads waren. Um die Anzahl dieser Zellen zu vermindern, wurde in Vorbereitung der Konfrontationsassays anders als in dem oben dokumentierten Versuch verfahren. Hier waren die Beads generiert und am nächsten Tag (Tag 1) in Kollagen eingebettet worden. Vor den Konfrontationsassays erfolgte dagegen am Tag 1 nach der Generierung zunächst ein Mediumwechsel, bevor die Gelkugeln am Tag 2 gemeinsam mit den Aortenringen in Kollagen eingebettet wurden. Dies reduzierte die Anzahl der freien Zellen merklich, sodass diese in den späteren Versuchen kein relevantes Problem mehr darstellten.

### **3.2.2 Etablierung des Konfrontationsassays**

#### 3.2.2.1 „Proof of principle“ – der erste Aortenring-Bead-Konfrontationsassay

Basierend auf den Ergebnissen des Vorversuchs wurden nun 4T1-Alginatebeads gemeinsam mit Aortenringen in Kollagen eingebettet. Von besonderem Interesse war hier die Stabilität der Gelkugeln, da sich in den Vorversuchen mit den Tumorsphäroiden ergeben hatte, dass deren Auswanderungsaktivität bei Ko-Kultivierung mit Aortenringen zunahm. Nach 10 Tagen Versuchsdauer konnte festgestellt werden, dass die Beads während der Ko-Kultivierung stabil blieben und sich keine oder wenig Zellen außerhalb des Beads befanden und ausbreiteten. Die Aussprossung aus dem Aortengewebe ließ sich gut beobachten.



**Abbildung 9: ARA + 4T1-Beads an Versuchstag 10.**

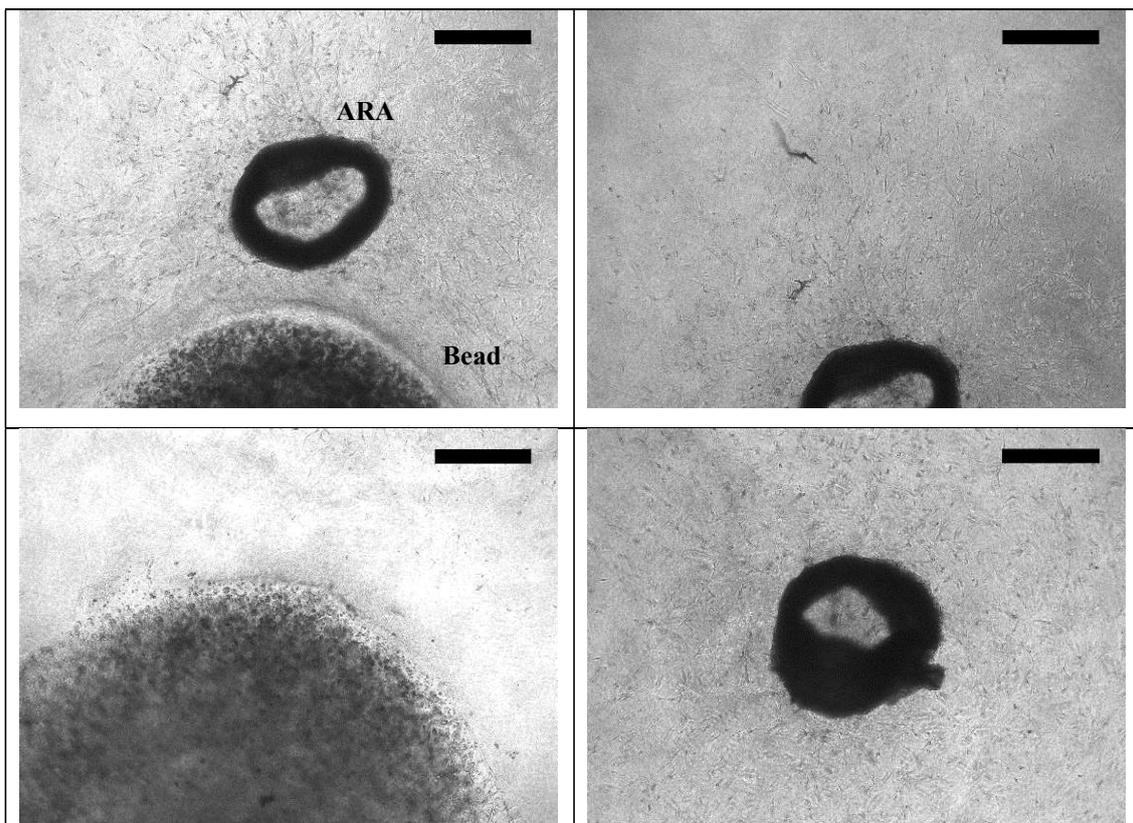
*Der Bead zeigt sich auch nach 10 Tagen Ko-Kultivierung stabil, es verließen nur wenige Zellen den Verband. Es zeigen sich zudem einzelne Zellen, die aus dem Aortengewebe ausgewandert sind.*  
 Oben: 5fache Vergrößerung, links der Ring, rechts der Tumorbead. Unten: 10fache Vergrößerung, Darstellung der aus dem Ring auswandernden Zellen. Skala oben = 500µm, Skala unten = 250 µm.

Somit war festzuhalten, dass sich die Tumorzellen-enthaltenden Alginat-Beads als bessere Alternative zu den Tumorsphäroiden erwiesen. Der Aortenring-Bead-Konfrontationsassay lieferte stabile Tumorbeads, die die Bewertung der Aussprossung aus dem Aortengewebe nicht behinderten und zudem konnte mit Verwendung des Standardmediums eine suffiziente Auswanderung von Zellen aus dem Ring beobachtet werden. Die Versuchsdauer wurde auf 10 Tage festgesetzt. Während dieser Dauer blieben die Tumorbeads stabil und die Aortenringe zeigten eine robuste Aussprossung von Zellen. Diese Art des Konfrontationsassays sollte nun auch auf andere Zelllinien (MT6 und EMT6) erweitert und in größerer Zahl durchgeführt werden.

### 3.2.2.2 Konfrontationsassay mit MT6 und EMT6-Beads

Auch bei der Konfrontation mit Beads der Zelllinien MT6 und EMT6 zeigten sich dieselben Ergebnisse wie bei der Ko-Kultivierung mit 4T1-Beads. Über den

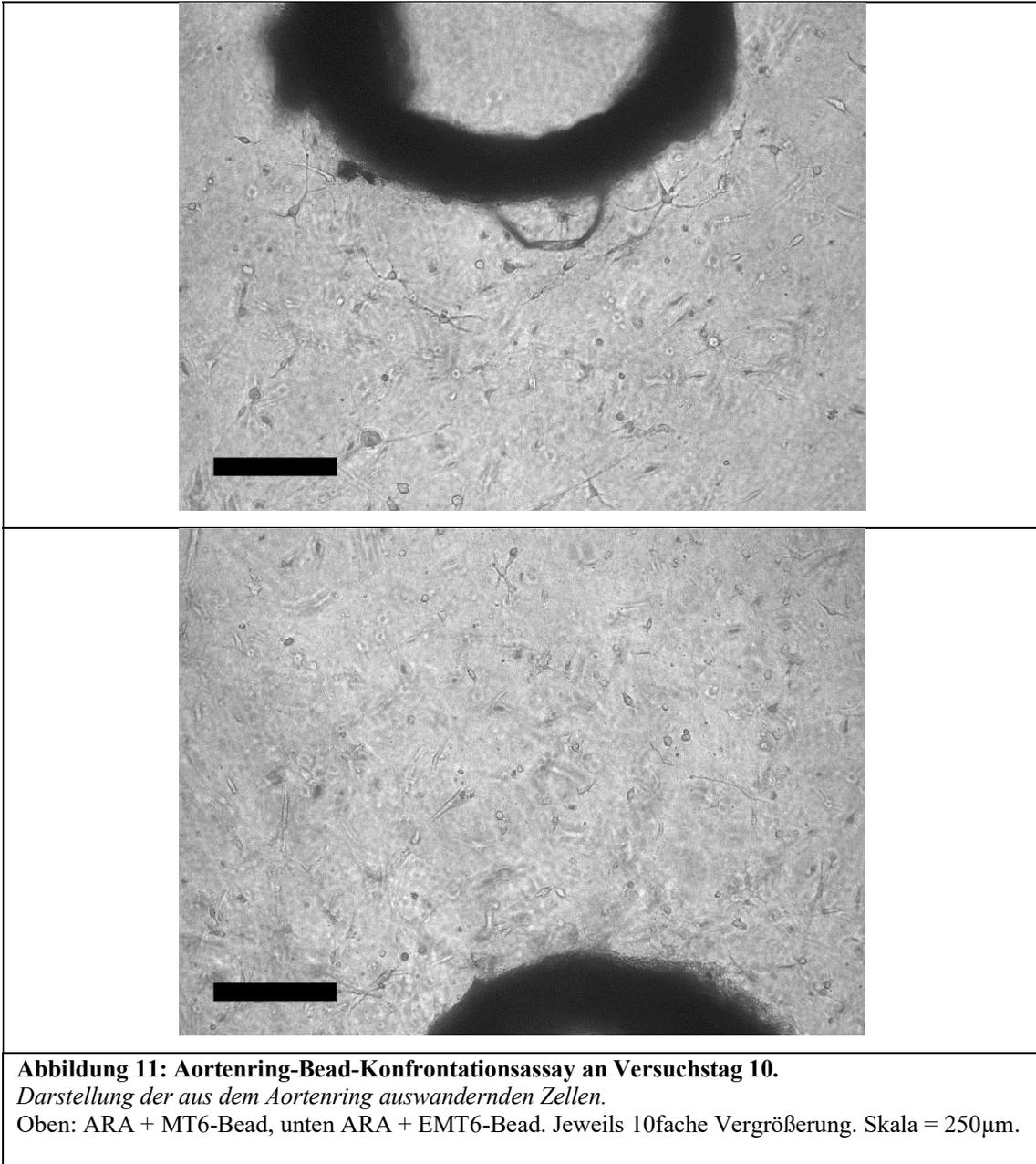
Versuchszeitraum von 10 Tagen blieben die Gelkugeln stabil und stellten kein Hindernis zur Begutachtung der Auswanderung aus der Gefäßwand dar. Zudem zeigte eine für die Auswertung ausreichende Aussprossungsaktivität. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich diese Art des Konfrontationsassays mit den von uns ausgewählten Zelllinien als geeignet erwies, um Aussagen über Menge und - mit weiteren Untersuchungen – Art der aus dem Aortenring unter Tumorzelleinfluss auswandernden Zellen zu treffen.



**Abbildung 10: Aortenring-Bead-Konfrontationsassay an Versuchstag 10.**

*Übereinstimmend mit den Ergebnissen bei Ko-Kultivierung mit 4T1-Beads zeigen sich bei Ko-Kultivierung mit Gelkugeln anderer Zelllinien stabile Beads und eine gute Auswanderung von Zellen aus der Gefäßwand.*

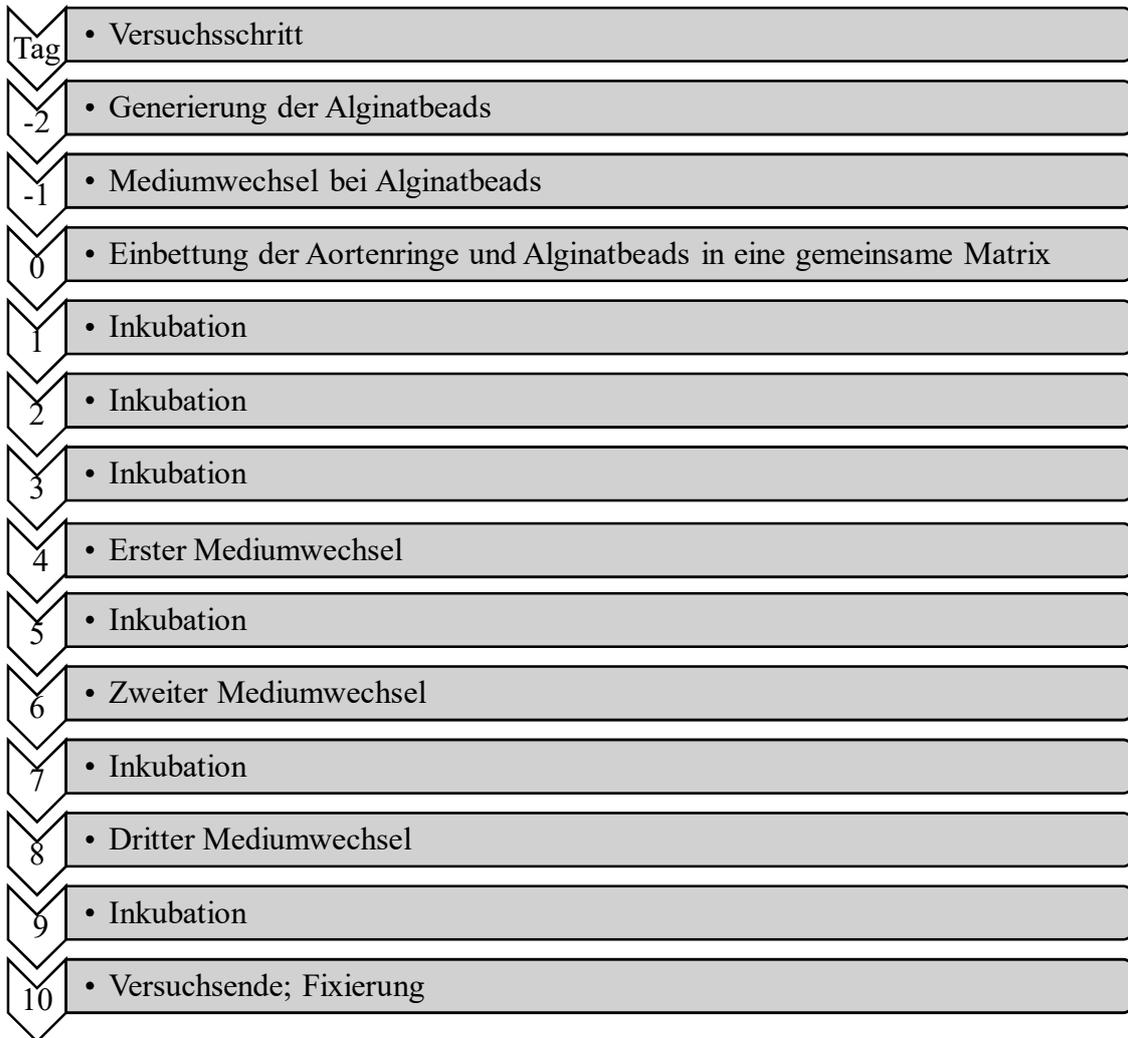
Oben: ARA + MT6-Bead, unten ARA + EMT6-Bead. Jeweils 5fache Vergrößerung, Skala = 500µm.



### 3.2.2.3 Zeitlicher Ablauf des Aortenring-Bead-Konfrontationsassays

Im Laufe der Versuche zur Etablierung eines Konfrontationsassays hat sich folgender zeitlicher Ablauf als am besten herausgestellt: Zunächst erfolgt die Generierung der Alginatebeads mit der jeweiligen Tumorzelllinie. Diese werden in Standardmedium über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird ein Mediumwechsel durchgeführt, damit Zellen, die sich nicht in der Gelkugel befinden, sondern locker dem Rand anhängen, minimiert werden. Dies soll ein exzessives Auswandern jener Zellen bei Ko-Kultivierung weitgehend vermeiden. Am darauffolgenden Tag erfolgt die gemeinsame Einbettung der

frisch präparierten Aortenringe und der Alginatbeads in Kollagengel mit Standardmedium. Am vierten Tag nach Einbettung erfolgte der erste Mediumwechsel. Dies wurde alle zwei bis drei Tage wiederholt, bis der Versuch am zehnten Tag nach Einbettung beendet wurde.



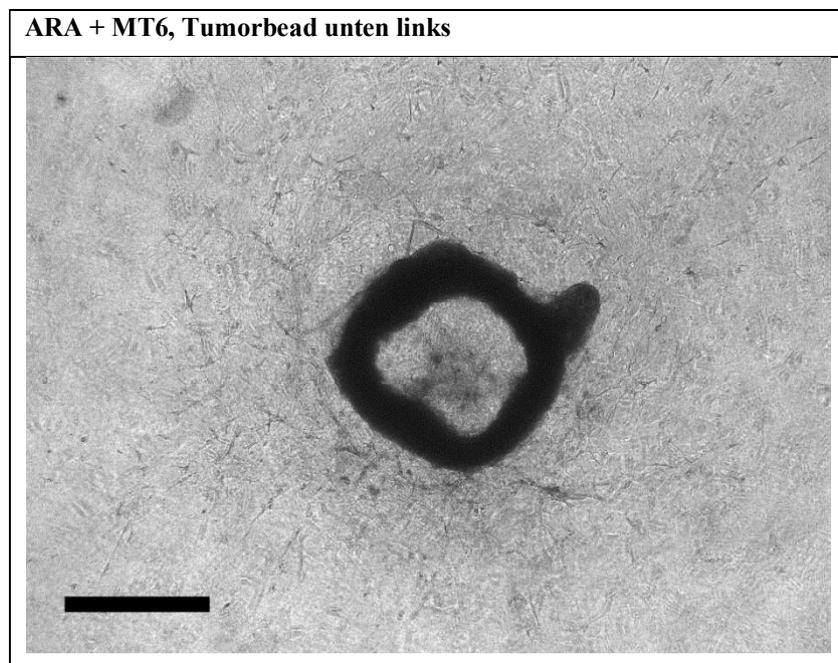
### 3.3 Auswanderungsaktivität von Zellen während des Aortenring-Bead-Konfrontationsassays

Die Migration der Zellen aus dem Aortengewebe wurde während des Aortenring-Bead-Konfrontationsassays mittels Phasenkontrastmikroskops an den Versuchstagen 3 oder 4, 6 und 10 untersucht und dokumentiert.

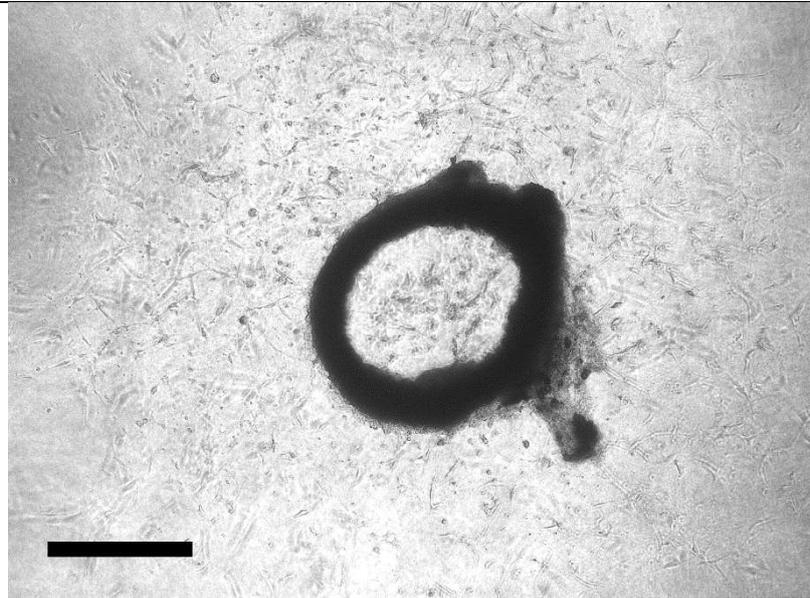
#### 3.3.1 Ungerichtete Auswanderung der Zellen

Es konnte festgestellt werden, dass eine vermehrte Auswanderung zu den Tumorbeads hin nicht regelhaft stattfand. Zwar zeigten einige Ringe eine stärkere Verteilung der

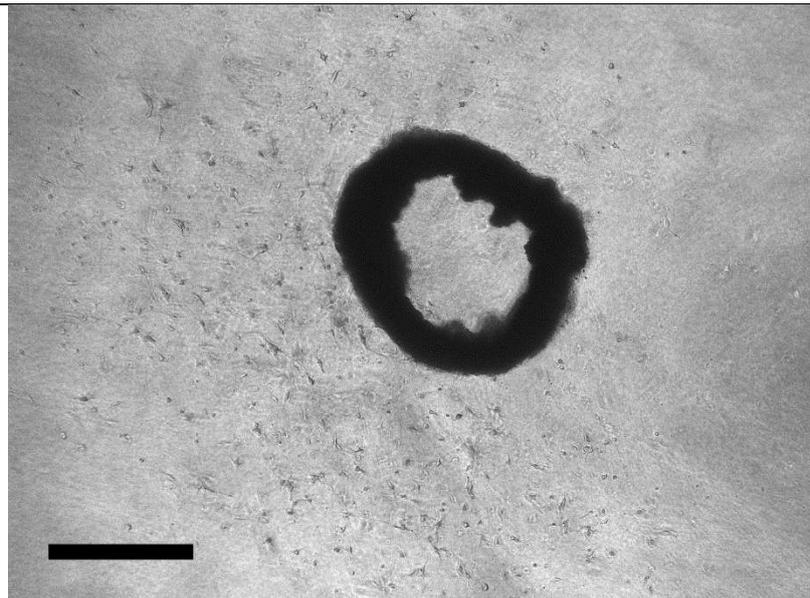
Zellen zu den Gelkugeln hin; ebenso ließ sich jedoch bei anderen Ringen eine höhere Zahl ausgewanderter Zellen in dem Tumorbead entgegengesetzter Richtung sowie eine gleichmäßige Verteilung der Zellen um den Aortenring beobachten. Eine klare Tendenz zur Richtung der Auswanderung ließ sich damit nicht feststellen. Unterschiede in der Auswanderungsrichtung bei Ko-Kultivierung zwischen den verschiedenen Tumorzelllinien ließen sich ebenfalls nicht beobachten. Bezüglich der Morphologie der ausgewanderten Zellen wurden einzelne Zellen beobachtet, die ohne eine Zellstrangformation das Aortengewebe verlassen hatten und nur in geringerem Umfang die erwarteten und in der Literatur beschriebenen gefäßartigen Aussprossungen bildeten.



**ARA + 4T1, Tumorbead unten links**



**ARA + EMT6, Tumorbead unten**



**Abbildung 12: Aortenring-Bead-Konfrontationsassay an Versuchstag 10. Auswanderungsmorphologie.**

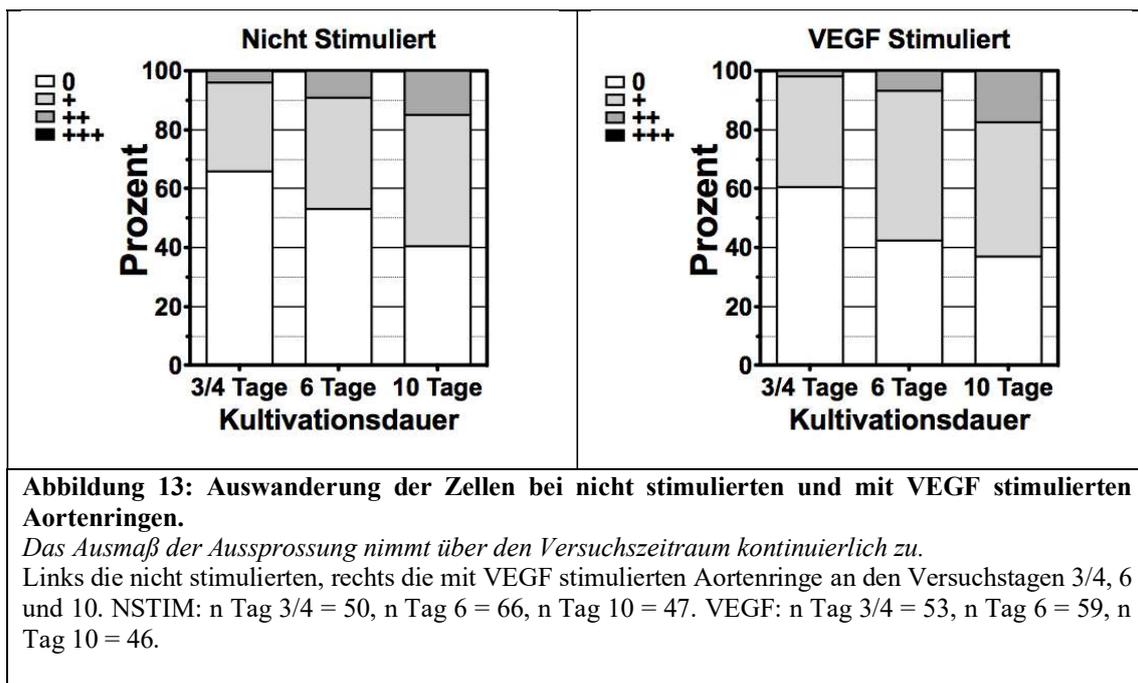
*Es zeigen sich verschiedene Schwerpunkte der Auswanderungsrichtung. Oben eine gleichmäßige Verteilung der Zellen, in der Mitte verstärkt dem Bead abgewandt, unten verstärkt dem Bead zugewandt. Insgesamt ließ sich keine Tendenz ableiten. Es sind zudem hauptsächlich einzelne Zellen zu beobachten, lediglich oben bilden sich wenige kapillarartige Strukturen aus.*

5fache Vergrößerung. Skala = 500µm.

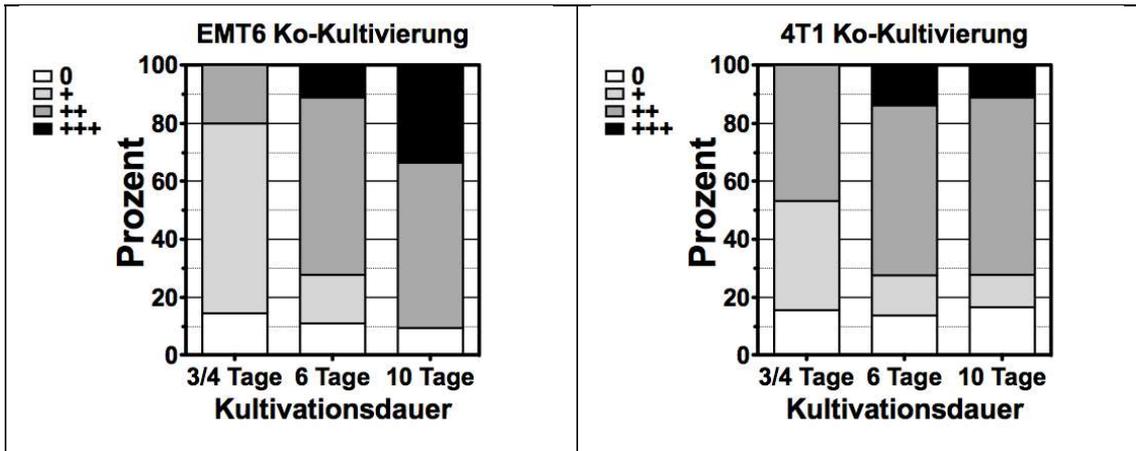
### 3.3.2 Zunehmende Migration während des Versuchszeitraumes

Das Ausmaß der ausgewanderten Zellen wurde ebenfalls untersucht und in vier Kategorien eingeteilt, wobei bei „0“ keine ausgewanderten Zellen zu beobachten waren und bei „+++“ sehr viele Zellen weit vom Ring hinaus in das umgebende Kollagen ausgewandert waren.

Als Indikator für das Ausmaß der Migration insgesamt wurden die Häufigkeiten der beobachteten Ringe in den oben definierten Kategorien über alle Versuche einer Bedingung hinweg aufsummiert. Bei den nicht stimulierten Ringen, die nur das Standardmedium ohne Zugabe von VEGF erhielten und bei denen keine Ko-Kultivierung mit Tumorbeads stattfand, zeigte sich ebenso wie bei den Ringen, die mit VEGF-Zusatz inkubiert wurden eine Zunahme der Aussprossung während des Versuchszeitraums. Die Kategorie „+++“ wurde jedoch nicht erreicht.



Auch bei dem Konfrontationsassay mit EMT6-Beads ergab sich eine stetige Zunahme der Aussprossung bis zum Kulturtag 10. Wurden die Ringe mit 4T1-Beads ko-kultiviert, so nahm die Auswanderung von Tag 3/4 zu Tag 6 zu. Bis Tag 10 wurde keine weitere stärkere Aussprossung beobachtet, die Verteilung blieb nahezu konstant.

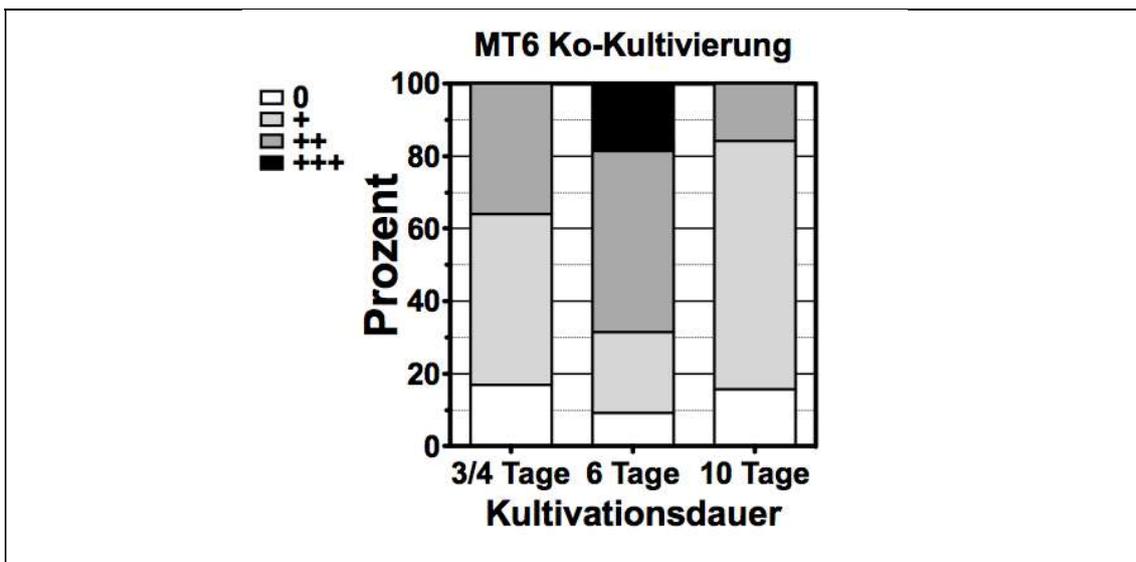


**Abbildung 14: Auswanderung der Zellen im Aortenring-Bead-Konfrontationsassay mit EMT6 und 4T1.**

Das Ausmaß der Aussprossung nimmt über den Versuchszeitraum bei EMT6-Ko-Kultivierung kontinuierlich zu. Bei 4T1-Ko-Kultivierung trifft dies nur bis Tag 6 zu, danach ist keine weitere Steigerung der Auswanderung zu beobachten.

Links Ko-Kultivierung mit EMT6, rechts mit 4T1. EMT6: n Tag 3/4 = 55, n Tag 6 = 42, n Tag 10 = 21. 4T1: n Tag 3/4 = 32, n Tag 6 = 29, n Tag 10 = 18.

Bei MT6-Ko-Kultivierung ergab sich ein anderes Bild. Auch unter dieser Bedingung kam es zu einer Steigerung der Auswanderung von Tag 3/4 zu Tag 6. Von diesem Zeitpunkt zu Tag 10 wurde jedoch eine Regression der Aussprossung beobachtet und es kam zu einem vermehrten Anteil von Ringen, die eine Aussprossung der Kategorie „+“ zeigte. Sogar verglichen mit dem ersten Beobachtungszeitpunkt an Tag 3/4 zeigte sich ein geringeres Maß an weit und in großer Zahl ausgewanderten Zellen.



**Abbildung 15: Auswanderung der Zellen im Aortenring-Bead-Konfrontationsassay mit MT6.**

Während von Tag 3/4 zu Tag 6 eine Zunahme der Auswanderung zu beobachten ist, sind an Tag 10 sogar im Vergleich zum ersten Beobachtungszeitpunkt weniger Zellen ausgewandert.

n Tag 3/4 = 53, n Tag 6 = 54, n Tag 10 = 19.

Bei allen Konfrontationsassays erreichte ein Anteil der Ringe die Kategorie „+++“. Diese Kategorie wurde bei nicht stimulierten und auch bei nur mit VEGF-Zusatz im Medium inkubierten Ringen nicht beobachtet. Unterschiede im Auswanderungsverhalten von Zellen zwischen den einzelnen Bedingungen sollten daraufhin genauer untersucht werden.

### **3.3.3 Verstärkte Auswanderung bei Ko-Kultivierung mit Tumorbeads**

Es wurde die Aussprossung der nicht stimulierten Ringe mit den Konfrontationsassays an den Beobachtungszeitpunkten Tag 3/4, Tag 6 und Tag 10 verglichen und mittels  $\chi^2$ -Test auf Signifikanz überprüft. Hierbei stellte sich heraus, dass die Konfrontationsassays an Tag 3/4 und 6 eine stärkere Aktivität als die nicht stimulierten Kontroll-Ringe aufwiesen. Dieser Unterschied zeigte sich bei allen drei Tumorzelllinien und war mit p-Werten von  $<0,0001$  statistisch höchstsignifikant. Auch am letzten Tag vor Fixierung des Assays zeigte sich eine stärkere Aussprossung bei ko-kultivierten Ringe mit Tumorbeads als bei solchen, die ohne Stimulation mit Wachstumsfaktoren oder Tumorzellen inkubiert worden waren. Dies war im Falle der Zelllinien EMT6 und 4T1 wiederum statistisch höchstsignifikant. Im Fall von MT6 ergab sich zwar ebenfalls das Bild einer stärkeren Auswanderung als bei den Kontroll-Ringen. Eindrucksvoll ist dies vor allem daran zu sehen, dass der Anteil an Aortengewebe, das keinerlei Aussprossung zeigte, bei den Kontroll-Ringen mehr als 2,5mal so groß war wie bei den mit MT6 ko-kultivierten Exemplaren. Jedoch ergab der Vergleich beider Bedingungen für den Tag 10 einen p-Wert von 0,1387 und somit keinen statistisch signifikanten Unterschied. Ein Trend zu stärkerer Aussprossung ließ sich jedoch trotzdem ablesen. So kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die Ko-Kultivierung der Aortenringe mit Tumorbeads verglichen mit nicht stimulierten Ringen zu einer verstärkten Auswanderung von Zellen aus dem Aortengewebe führt. Dies gilt für den gesamten Versuchszeitraum und ist mit einer Ausnahme auch ein statistisch signifikanter Unterschied.

Nach dem Vergleich der nicht-stimulierten Ringe mit Konfrontationsassays stellte sich die Frage, inwieweit auch zwischen den mit VEGF-Zusatz im Medium inkubierten Ringen und den Aorten mit Tumorbeads ein Unterschied in der Auswanderungsaktivität bestand. Nach statistischer Analyse der erhobenen Daten ergab sich, dass bei den Ringen

im Konfrontationsassay auch im Vergleich zu Ringen mit VEGF-Medium eine verstärkte Auswanderung stattfand. Es zeigten sich statistisch hochsignifikante p-Werte für alle Tumorzelllinien an Tag 3/4 und Tag 6, sowie für EMT6 auch an Tag 10. Bei 4T1 ergab sich ein hochsignifikanter p-Wert von 0,0002. Nur am Tag 10 und dem Vergleich von Ringen mit VEGF-Medium und Ringen mit MT6-Beads ergab sich mit einem p-Wert von 0,1910 keine statistische Signifikanz. Ein Trend ließ sich dennoch ablesen, vor allem wiederum im Hinblick auf den geringeren Anteil von Ringen, die keinerlei Auswanderung zeigten, wenn sie mit MT6-Beads konfrontiert wurden. So zeigte die Analyse, dass die Ko-Kultivierung mit Tumorbeads verglichen mit der Stimulation durch VEGF-Zusatz im Medium zu einer verstärkten Auswanderung von Zellen aus dem Aortengewebe führt. Dies gilt für den gesamten Versuchszeitraum und ist mit einer Ausnahme auch ein Unterschied, der statistische Signifikanz aufwies.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Tumorbeads zu einer stärkeren Aussprossungsaktivität der Aortenringe führen als die Kontrollen ohne Stimulation und ohne Ko-Kultur mit Tumorzellen oder der Zusatz von VEGF im Medium.

Anschließend sollte untersucht werden, ob ein Unterschied in der Aussprossungsaktivität abhängig davon bestand, aus welcher Zelllinie die Tumorbeads stammten, die mit den Aortenringen ko-kultiviert wurden.

### **3.3.4 Vergleich der Auswanderung zwischen den verschiedenen Tumorzelllinien**

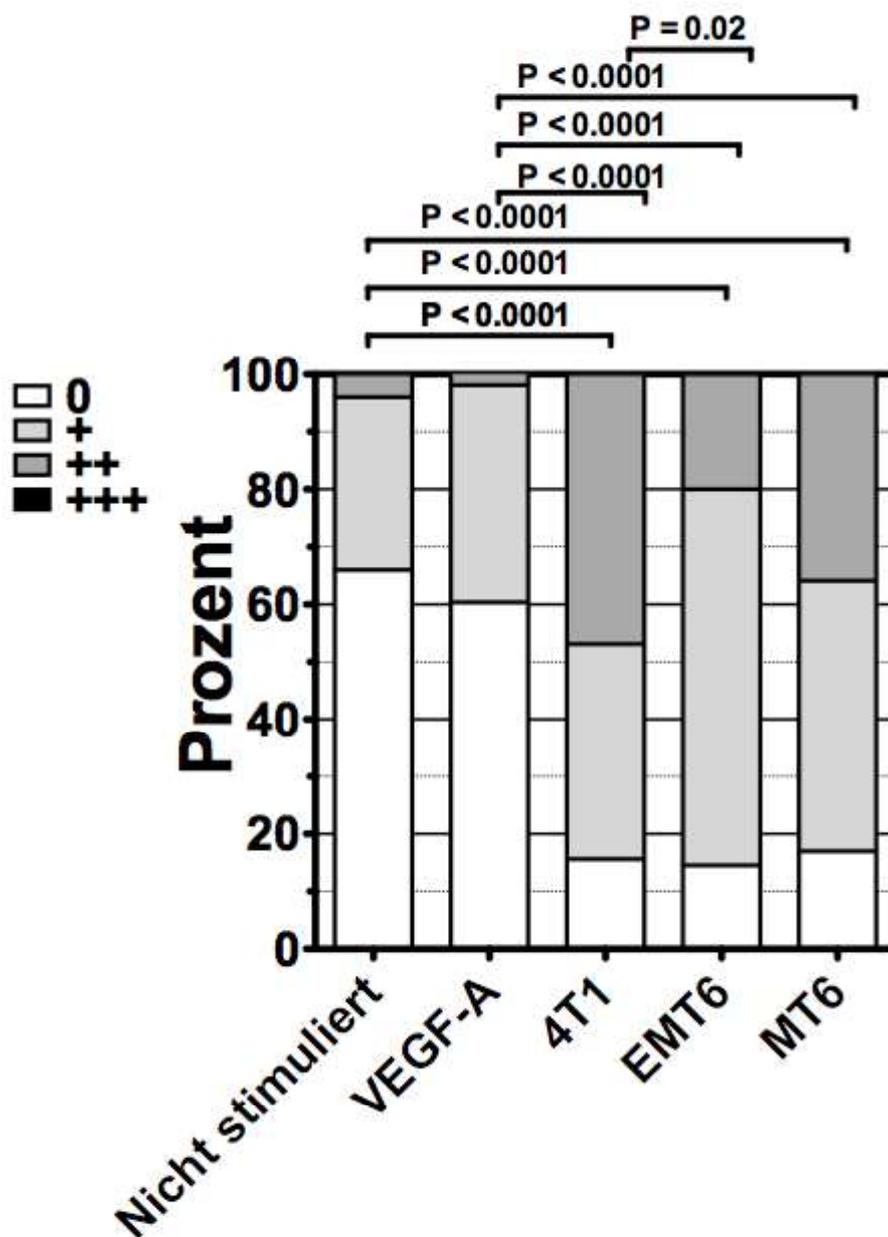
Die gewonnenen Daten aus den Konfrontationsassays wurden verglichen und wiederum mittels  $\chi^2$ -Test auf Signifikanz überprüft.

Am Kulturtag 3 oder 4 wurden zwischen den Ringen mit MT6 und 4T1 sowie zwischen den Ringen mit MT6 und EMT6 keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt. Im Vergleich von MT6- und EMT6-Ko-Kultivierung konnte aber festgestellt werden, dass der Anteil von Ringen der Kategorie „++“ bei MT6-Konfontation mit 35,8% 1,5mal so groß war wie bei EMT6-Ko-Kultivierung mit 20%. Ähnlich verhielt es sich bei dem Vergleich von EMT6 und 4T1. Hier zeigte sich der Anteil von Ringen der Kategorie „++“ bei 4T1-Konfontation mit 46,8% mehr als doppelt so hoch wie bei EMT6-Ko-Kultivierung. Der Unterschied in der Aussprossung bei EMT6 und 4T1 war nach zusätzlicher Überprüfung mit dem Wilcoxon-Test jedoch knapp nicht statistisch

signifikant (p-Wert = 0,0599). Ein Trend zu einer stärkeren Auswanderung bei 4T1 im Vergleich zu EMT6 war jedoch gegeben. Der Anteil an Ringen, die keinerlei Auswanderung zeigten, war mit 15,6% (4T1), 16,9% (MT6) bzw. 14,5% (EMT6) nahezu gleich groß.

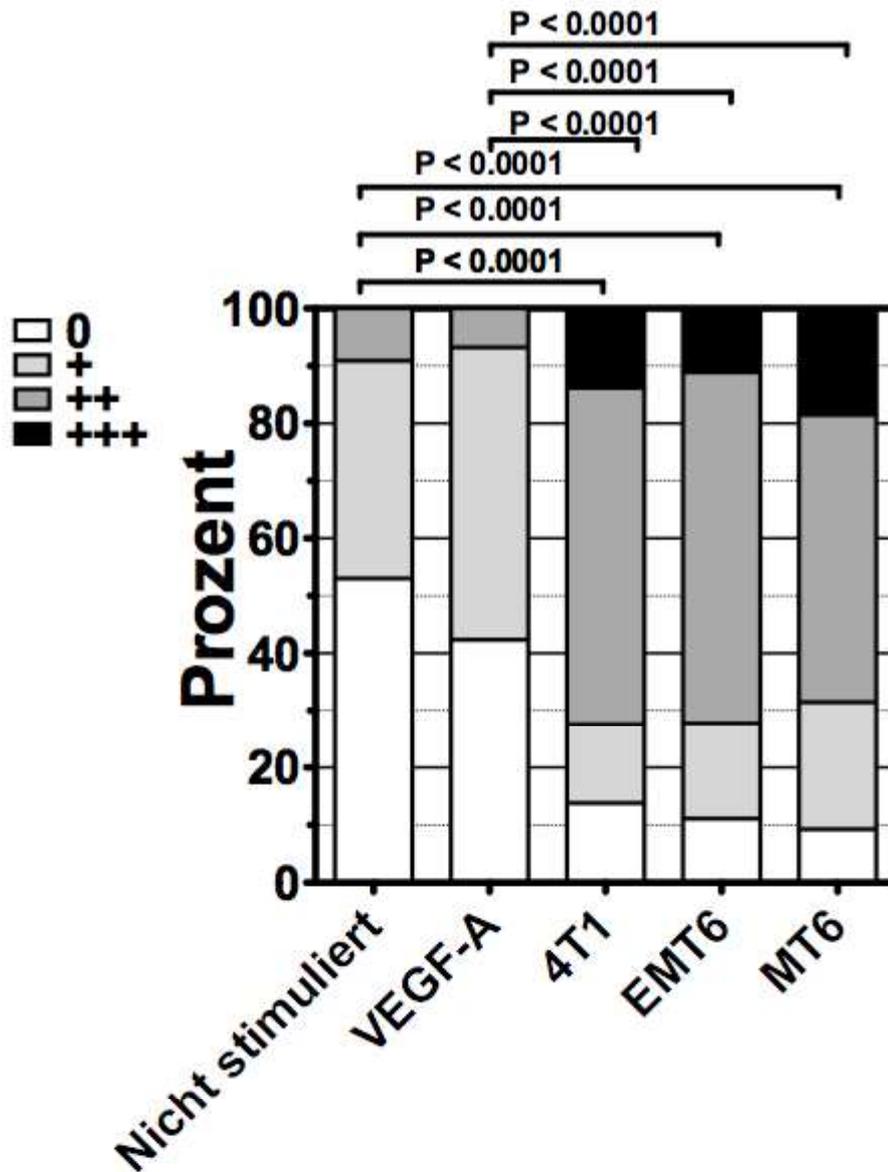
An Tag 6 lässt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Konfrontation mit verschiedenen Tumorzelllinien feststellen, die Verteilung der Ringe auf die vier Kategorien ist ähnlich und somit die Auswanderungsaktivität gleich hoch.

Am Kulturtag 10 findet sich bei EMT6-Ko-Kultivierung ein dreifach höherer Anteil an Ringen in der Kategorie „+++“ als bei 4T1-Ko-Kultivierung mit Aortenringen. Jedoch ist der Unterschied der Aussprossungsverteilung dieser beiden Bedingungen in der Gesamtheit nicht statistisch signifikant. Anders ist es bei Vergleich dieser beiden Tumorzelllinien mit MT6. Hier zeigt sich jeweils ein statistisch signifikanter Unterschied. Der Anteil an Ringen, die keine Auswanderung zeigen, ist noch vergleichbar groß. Es sind jedoch bei MT6-Konfrontation keinerlei Ringe vorhanden, die der Kategorie „+++“ angehören und auch der Anteil an Ringen der Kategorie „++“ ist mit 15,8% wesentlich geringerer als bei EMT6 mit 57,1% und 4T1 mit 61,1%. Den Großteil machen Ringe der Kategorie „+“ aus (68,4% gegen 0% bzw. 11,1%). Somit zeigt sich am Kulturtag 10 eine auch statistisch signifikant geringere Auswanderung bei Aortenringen, die mit MT6-Beads ko-kultiviert wurden als bei mit 4T1- oder EMT6-Beads konfrontierten Aortenringen.



**Abbildung 16: Vergleich der Auswanderung der Zellen bei Aortenringen ohne Stimulation, mit VEGF-A-Stimulation sowie bei Konfrontation der Aortenringe mit EMT6, MT6 und 4T1 an Versuchstag 3/4.**

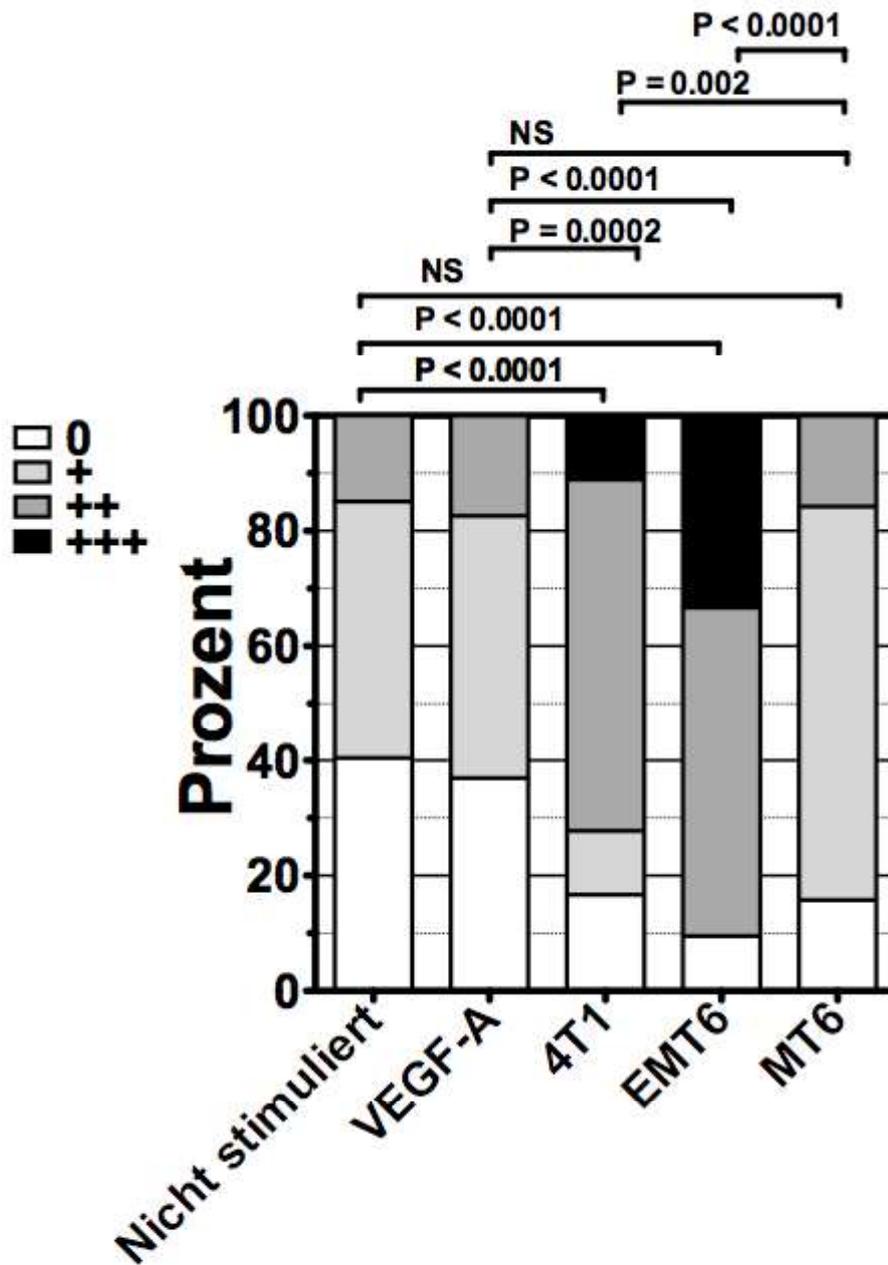
Die Konfrontationsassays zeigen eine stärkere Auswanderungsaktivität als die Kontrollringe, die mit VEGF-A stimuliert wurden oder keine Stimulation erhielten. Alle Unterschiede sind höchstsignifikant. Während zwischen MT6 und 4T1 sowie MT6 und EMT6 kein statistisch signifikanter Unterschied besteht, gibt es diesen zwischen EMT6 und 4T1. Bei EMT6-Ko-Kultivierung ist der Anteil der Ringe der Kategorie „++“ am geringer als bei 4T1- und MT6-Ko-Kultivierung. Der Anteil an Ringen der Kategorie „0“ ist bei den Aortenringen mit Tumorzellkonfrontation nahezu konstant.  
 Nicht Stimuliert: n = 50, VEGF-A: n = 53, EMT6: n = 55, MT6: n = 53, 4T1: n = 32.



**Abbildung 17: Vergleich der Auswanderung der Zellen bei Aortenringen ohne Stimulation, mit VEGF-A-Stimulation sowie bei Konfrontation der Aortenringe mit EMT6, MT6 und 4T1 an Versuchstag 6.**

*Die Konfrontationsassays zeigen eine stärkere Auswanderungsaktivität als die Kontrollringe, die mit VEGF-A stimuliert wurden oder keine Stimulation erhielten. Alle Unterschiede sind höchstsignifikant. Die Verteilung auf die vier Aussprossungskategorien ist bei den Aortenringen mit Tumorzellkonfrontation ähnlich, es lässt sich hier kein statistisch signifikanter Unterschied bez. der Aussprossungsaktivität feststellen.*

Nicht stimuliert: n = 66, VEGF-A: n = 59, EMT6: n = 42, MT6: n = 54, 4T1: n = 29.



**Abbildung 18: Vergleich der Auswanderung der Zellen bei Aortenringen ohne Stimulation, mit VEGF-A-Stimulation sowie bei Konfrontation der Aortenringe mit EMT6, MT6 und 4T1 an Versuchstag 10.**

Die Konfrontationsassays zeigen eine stärkere Auswanderungsaktivität als die Kontrollringe, die mit VEGF-A stimuliert wurden oder keine Stimulation erhielten. Bis auf den Vergleich Nicht-stimuliert/MT6 und VEGF-A/MT6 an Tag 10 sind alle Unterschiede hoch- bis höchstsignifikant.

Im Vergleich zu den beiden anderen Zelllinien 4T1 und EMT6 wurde bei MT6 eine signifikant niedrigere Aussprossungsaktivität beobachtet. Bei EMT6 ist der Anteil an Ringen der Kategorie „+++“ dreimal so hoch wie bei 4T1. Statistische Signifikanz ist hier jedoch nicht gegeben.

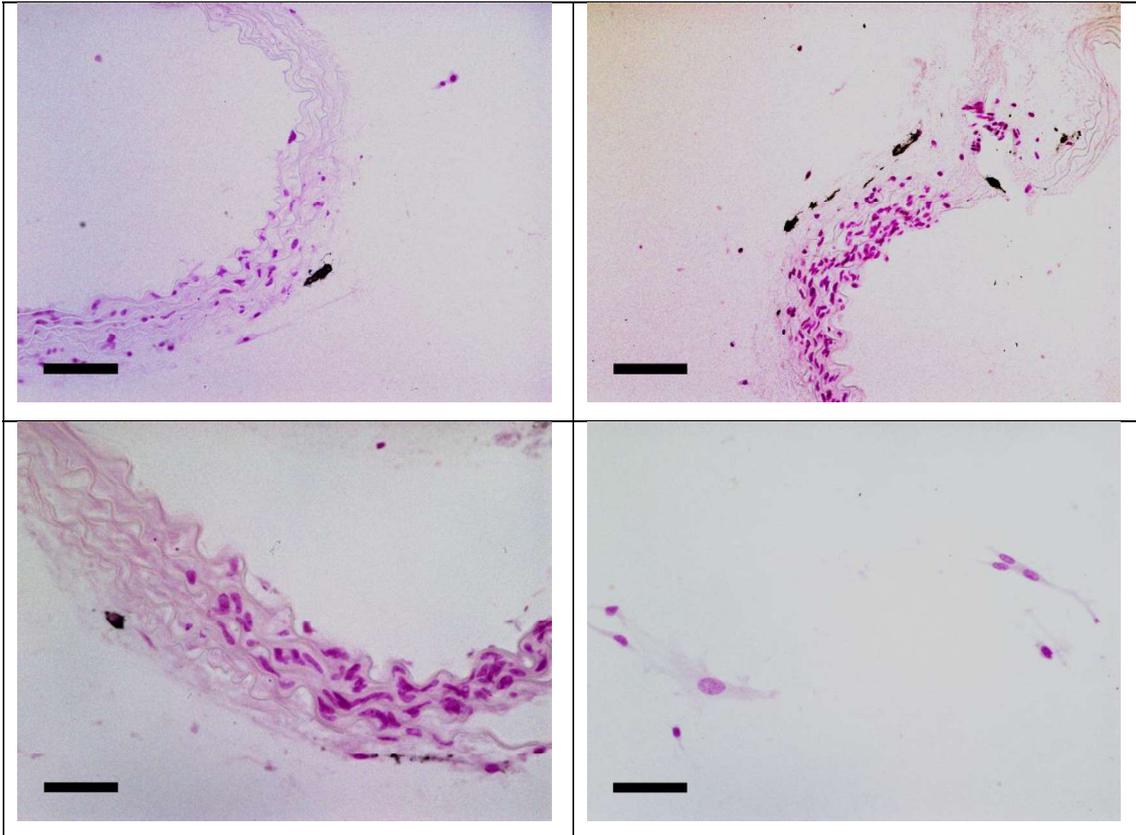
Nicht Stimuliert: n = 47, VEGF-A: n = 46, EMT6: n = 21, MT6: n = 19, 4T1: n = 18.

### **3.4 Charakterisierung der ausgewanderten Zellen mittels DAB-Färbungen**

An formalinfixierten Schnitten der Aortenring-Bead-Konfrontationsassays wurden DAB-Färbungen mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt. Die Antikörper sollten vaskuläre Zellen sowie als weiteren Vertreter des Tumorstromas Makrophagen anfärben. Es wurden ausschließlich Schnitte von Tag 10 des Versuchszeitraums untersucht.

#### **3.4.1 Fehlen von F4/80 - positiven ausgewanderten Zellen**

F4/80 ist ein Oberflächenmarker für murine Makrophagen. Das Vorhandensein dieser Zellen wurde bereits sowohl im Tumorstroma als auch im Aortenringmodell nachgewiesen. Wurden Schnitte mit diesem Antikörper gefärbt, so ergab sich ein einheitliches Bild bei allen Bedingungen, also der Konfrontation mit 4T1-, MT6- und EMT6-Beads, sowie Ringen mit VEGF-Zusatz im Medium und Ringen ohne Stimulation. In der Adventitia der Aortenringe zeigten sich einzelne angefärbte und somit positive Zellen. Die ausgewanderten Zellen waren jedoch allesamt negativ für F4/80.



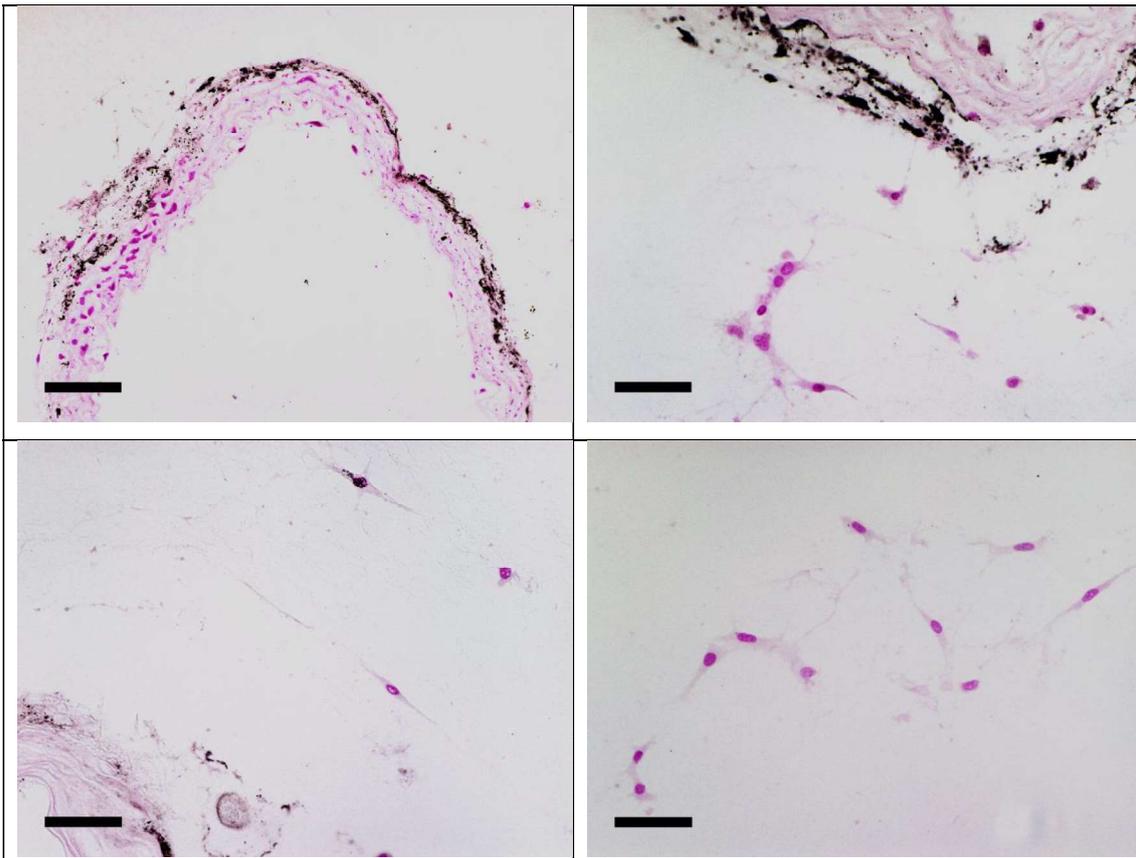
**Abbildung 19: F4/80-Färbung DAB an Versuchstag 10.**

*Zu erkennen sind einzelne F4/80-positive Zellen in der Adventitia der Aortenringe sowie negative ausgewanderte Zellen. Die Bilder stellen repräsentative Beispiele dar.*

Oben links Ring ohne Stimulation in 20facher Vergrößerung, oben rechts Ring mit EMT6-Ko-Kultivierung in 20facher Vergrößerung, unten links Ring mit MT6-Ko-Kultivierung in 40facher Vergrößerung, unten rechts ausgewanderte Zellen bei EMT6-Konfrontation in 40facher Vergrößerung. Skala bei 20facher Vergrößerung = 100µm. Skala bei 40facher Vergrößerung = 50µm.

### 3.4.2 Auswanderung einzelner CD34 - positiver Zellen

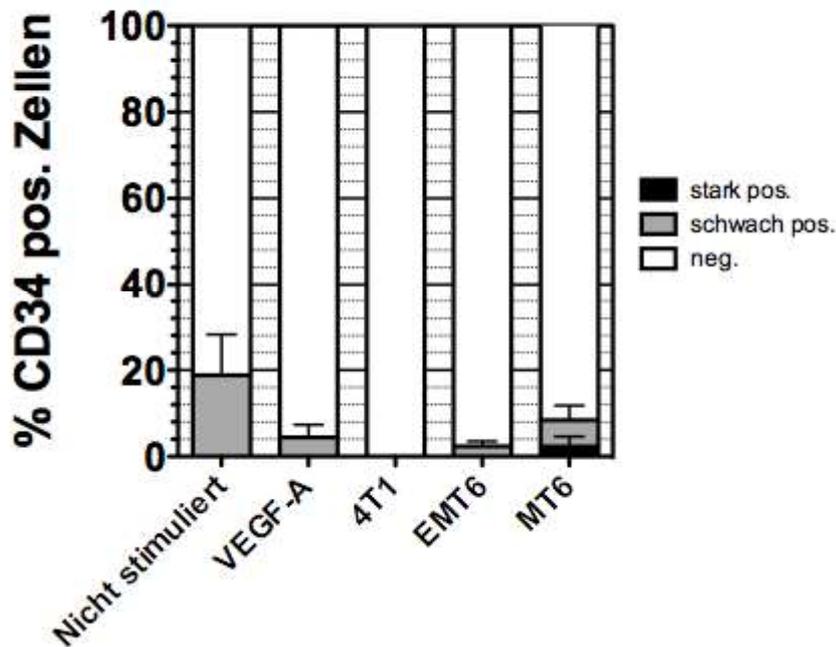
CD34 ist ein Oberflächenmarker für endotheliale und hämatopoetische Vorläuferzellen. Mit dem Nachweis dieses Markers sollte untersucht werden, ob diese Zelltypen, die zur Angiogenese beitragen, von den Tumorbeads zur Auswanderung aus dem Aortengewebe gebracht wurden. Es konnte festgestellt werden, dass einige Zellen der Adventitia positiv gefärbt waren. Bei den in die Kollagenmatrix ausgewanderten Zellen gab es nur vereinzelt CD34-positive Zellen, im Falle von 4T1-Konfrontation sogar keine. Aufgrund der geringen Fallzahlen war eine statistische Überprüfung der Ergebnisse nicht sinnvoll.



**Abbildung 20: CD34-Färbung DAB an Versuchstag 10.**

*Zellen in der Adventitia zeigen sich positiv für CD34, die überwiegende Mehrheit der ausgewanderten Zellen ist negativ. Unten links eine ausgewanderte Zelle, welche positiv für CD34 ist.*

*Oben links Ring ohne Stimulation in 20facher Vergrößerung, oben rechts Ring mit EMT6-Ko-Kultivierung, unten links Ring mit MT6-Ko-Kultivierung, unten rechts ausgewanderte Zellen bei MT6-Konfrontation, jeweils in 40facher Vergrößerung. Skala bei 20facher Vergrößerung = 100µm. Skala bei 40facher Vergrößerung = 50µm.*



**Abbildung 21: Verteilung der CD34-stark positiven –schwach positiven und -negativen Zellen bei den fünf verschiedenen Versuchsbedingungen an Versuchstag 10.**

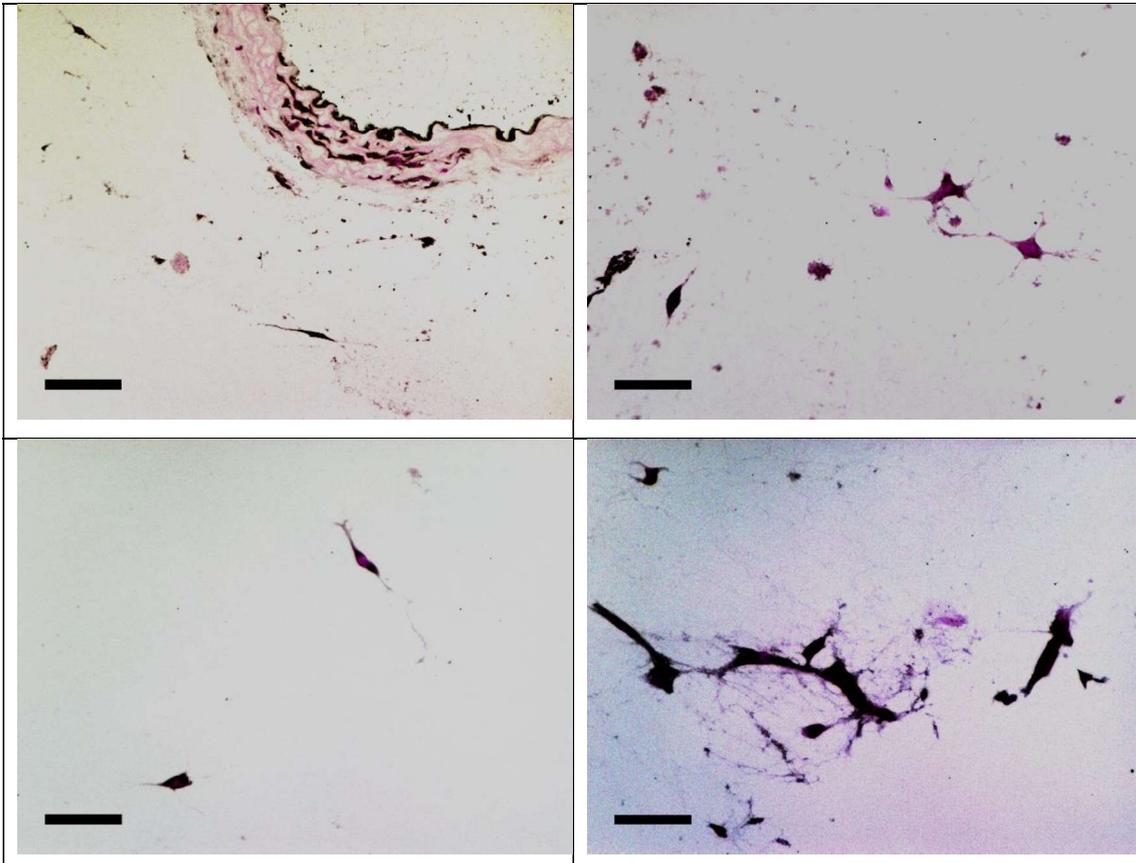
*Nur einzelne Zellen sind positiv, bei 4T1-Konfrontation wurden keine CD34-positiven Zellen gefunden. Die Verhältnisse zwischen den verschiedenen Bedingungen lassen keine Verteilungsunterschiede erkennen, die statistische Signifikanz aufweisen könnten.*

*n pro Bedingung = 3. Fehlerbalken  $\pm$  SEM.*

### 3.4.3 Höherer Anteil an CD31 – positiven Zellen bei Ko-Kultivierung mit Tumorbeads

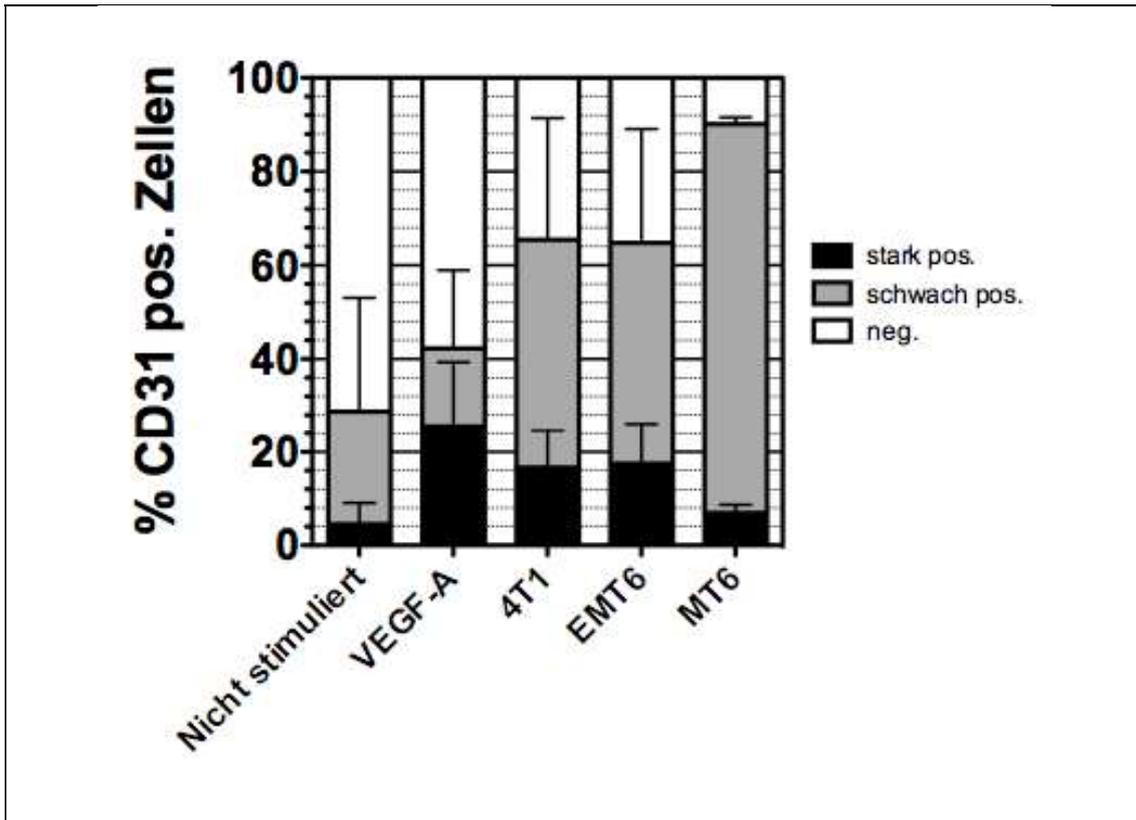
CD31 ist ein Oberflächenmarker für einige Blutzellen, aber insbesondere auch für reife Endothelzellen. Diese Zellen spielen naturgemäß im Prozess der Angiogenese eine entscheidende Rolle und wurden bereits im Aortenringmodell als ein Vertreter der auswandernden Zellen nachgewiesen. Die durchgeführten Färbungen mit CD31 ergaben erwartungsgemäß eine klare Färbung in der der Intima der Aortenringe. Ebenso war ein Teil ausgewanderter Zellen positiv. Bei den Aortenring-Tumorbead-Konfrontationsassays waren bei allen Tumorzelllinien mindestens 64,8% der Zellen positiv. Bei Ringen mit VEGF-Zusatz im Medium galt dies für 42,3% der Zellen, bei nicht stimulierten Ringen nur für 28,8%. Bei der statistischen Analyse der CD31-Färbung ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Verteilung der positiven Zellen zwischen den Ringen, die mit Tumorbeads kultiviert wurden und den

Kontrollen ohne Tumorzellen. Jedoch erlaubt der p-Wert von 0,0664 die Aussage, dass hier ein klarer Trend vorliegt. Dieser zeigt in die Richtung, dass die Ko-Kultivierung mit Tumorbeads die Auswanderung von CD31-positiven Zellen aus dem Aortengewebe fördert.



**Abbildung 22: CD31-Färbung DAB an Versuchstag 10.**

*Die Intima zeigt sich positiv eingefärbt. Die ausgewanderten Zellen sind bei Tumorbead-Konfrontation in der Mehrheit positiv. Auch bei VEGF-Zusatz und den nicht stimulierten Ringen finden sich viele positive Zellen. Oben links Ring mit EMT6-Konfrontation in 20facher Vergrößerung. Oben rechts ausgewanderte Zellen bei VEGF-Zusatz, unten links bei EMT6-Ko-Kultivierung, unten rechts bei 4T1-Konfrontation, jeweils in 40facher Vergrößerung. Skala bei 20facher Vergrößerung = 100µm. Skala bei 40facher Vergrößerung = 50µm.*

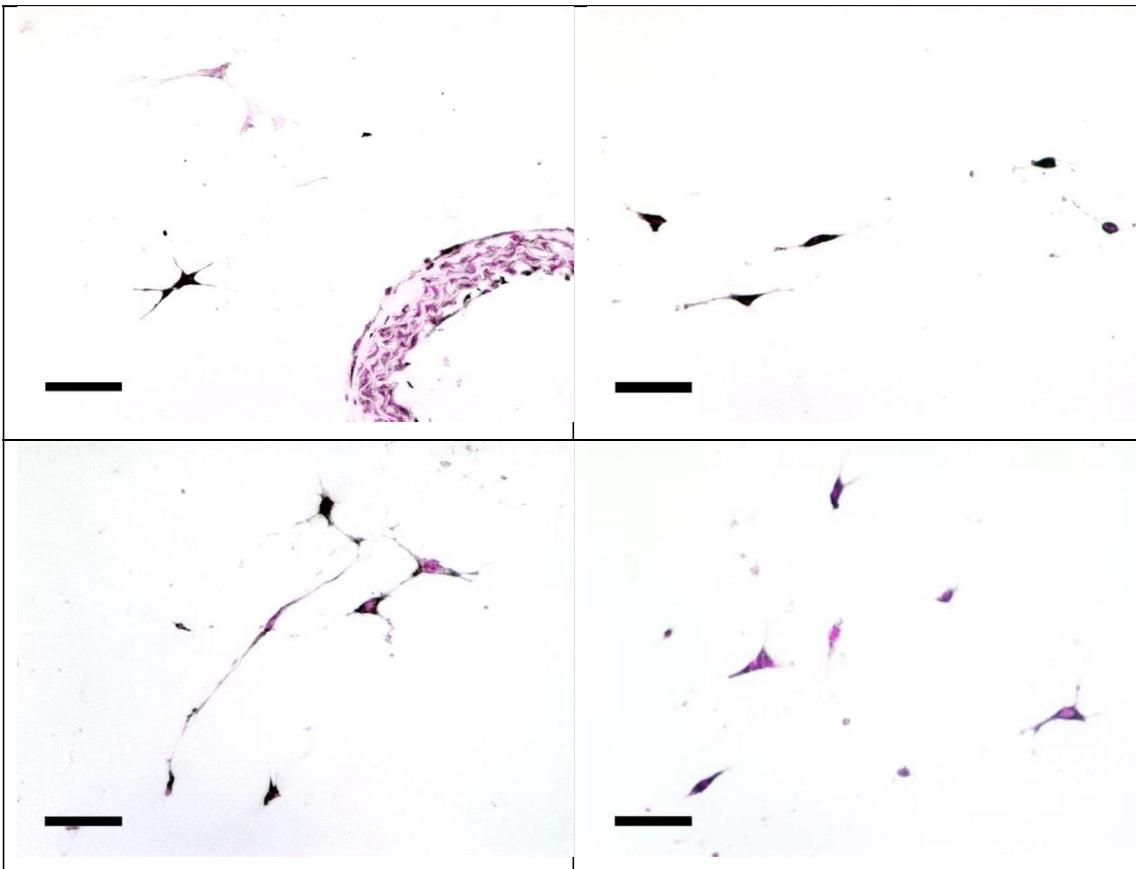


**Abbildung 23: Verteilung der CD31-positiven und -negativen Zellen an Versuchstag 10.**  
*Es findet sich ein höherer Anteil an positiven Zellen bei Aortenring-Bead-Konfrontationsassays als bei den Kontrollen ohne Tumorzellkonfrontation.*  
 Verteilung der CD31-stark positiven –schwach positiven und -negativen Zellen bei den fünf verschiedenen Versuchsbedingungen. n pro Bedingung = 3. Fehlerbalken ± SEM.

### 3.4.4 Mehrheit der ausgewanderten Zellen ist NG2 – positiv

NG2 ist eines der häufig für den Nachweis der Perizyten verwendete Marker. Diese unterstützen während des Prozesses der Gefäßneubildung sowohl durch Angiogenese als auch durch Vaskulogenese die Reifung der Gefäße durch Integration in die Gefäßwand. Perizyten wurden auch bereits im Aortenringmodell zum Auswandern aus dem Aortengewebe aktiviert. Die durchgeführten Färbungen mit NG2 ergaben, dass einige Zellen der Aortenwand, sowohl in der Adventitia als auch der Intima, positiv für NG2 waren. Die Mehrheit der ausgewanderten Zellen bei allen fünf Bedingungen war positiv. Der geringste Anteil NG2-positiver Zellen war bei Ko-Kultivierung mit 4T1-Beads zu finden; er betrug jedoch immer noch 61,1%. Somit waren immer mindestens sechzig Prozent der ausgewanderten Zellen positiv für NG2. Dabei ist anzumerken, dass ein großer Anteil der Zellen stark NG2-positiv war. Beim Vergleich der Aortenringe ohne Tumorbead mit denjenigen, die einer Konfrontation mit Tumorzellen unterlagen ergab

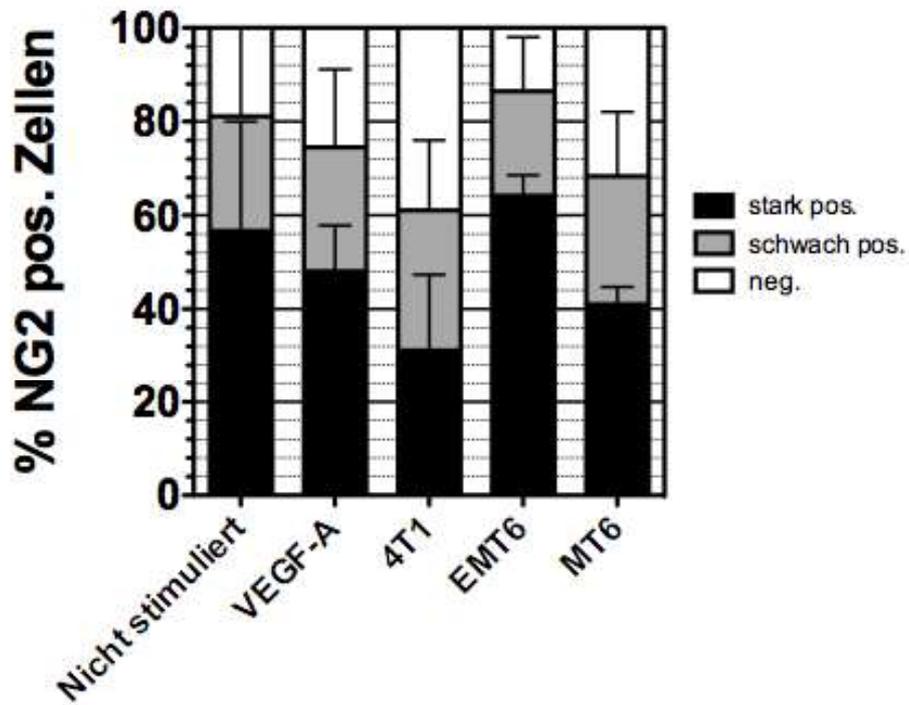
sich bezüglich der Verteilung von NG2-negativen und -positiven Zellen kein statistisch signifikanter Unterschied. Ebenso verhielt es sich mit der Verteilung stark positiver Zellen. Es konnte festgestellt werden, dass der Anteil NG2-negativer Zellen bei nicht stimulierten Ringen und EMT6-Konfrontation mit unter 20 Prozent am geringsten ausfiel, und bei VEGF-Zusatz im Medium, MT6-Ko-Kultivierung und 4T1-Ko-Kultivierung über ein Viertel ausmachte (25,5%, 31,6% und 38,9%). Auf statistische Analysen der Unterschiede zwischen den einzelnen Bedingungen wurde aufgrund der geringen Fallzahl jedoch verzichtet.



**Abbildung 24: NG2-Färbung DAB an Versuchstag 10.**

*Einige Zellen in der Adventitia und der Intima sind NG2-positiv. Mindestens zwei Drittel der ausgewanderten Zellen ist bei allen Bedingungen positiv.*

Oben links Ring mit VEGF-Zusatz in 20facher Vergrößerung, oben rechts ausgewanderte Zellen bei Ring ohne Stimulation, unten links bei MT6-Ko-Kultivierung, unten rechts bei EMT6-Konfrontation, jeweils in 40facher Vergrößerung. Skala bei 20facher Vergrößerung = 100µm. Skala bei 40facher Vergrößerung = 50µm.



**Abbildung 25: Verteilung der NG2-positiven und -negativen Zellen an Versuchstag 10.**

*Bei allen Bedingungen ist die Mehrheit der ausgewanderten Zellen NG2-positiv, mit einem großen Anteil an stark positiven Zellen.*

Verteilung der NG2-stark positiven –schwach positiven und -negativen Zellen bei den fünf verschiedenen Versuchsbedingungen. N pro Bedingung = 3. Fehlerbalken  $\pm$  SEM.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Etablierung eines Aortenring-Tumor-Konfrontationsassays durchgeführt. Es wurden drei murine Tumorzelllinien (4T1, MT6, EMT6) und murine Aortenringe verwendet. Nach erfolgreichem Herausarbeiten der geeigneten Versuchsbedingungen einschließlich des Mediums, der Generierung von MCTS und der Versuchsdauer wurde die Aussprossungsaktivität während des Versuchszeitraumes untersucht. Aus dem mit Formalin (4%) fixierten ARA-Gewebe wurden Schnitte hergestellt, die anschließend in der Immunhistochemie verwendet wurden, um die ausgewanderten Zellen näher charakterisieren zu können.

Die Kombination des Aortenringassays mit Tumorsphäroiden erforderte eine Anpassung der Methode zur Generierung der MCTS. In unsere Arbeitsgruppe war die Generierung von Tumorsphäroiden mittels der „Liquid overlay“-Technik zuvor etabliert [159]. Die so generierten MCTS erwiesen sich jedoch als ungeeignet für die im Rahmen der Dissertationsarbeiten geplanten Experimente, nämlich die konfrontative Einbettung mit Aortenringen in Kollagen. Durch den Kontakt mit der adhärenen Oberfläche des Kollagens lösten die Tumorzellen ihre Zell-Zell-Kontakte innerhalb des sphäroidalen Verbandes auf und wanderten in die umliegende Matrix aus. Das Tumorsphäroid war nicht mehr stabil und die Auswanderung aus dem Aortengewebe konnte aufgrund der ubiquitär ausgewanderten Tumorzellen nicht mehr beurteilt werden. Diese Ergebnisse stimmen nicht mit den zuvor von Seano et al. durchgeführten Experimenten und deren Ergebnissen [148] überein. Hier wurden Ringe von humanen Nabelschnurarterien mit Sphäroiden aus Prostatakrebs-Zellen (LnCap) in Basalmembranextrakt eingebettet. Diese MCTS blieben laut Autoren stabil und zeigten keinerlei Auswanderung der Zellen aus dem Zellverband über den gesamten Versuchszeitraum, der 35 Tage andauerte. Eine Erklärung für diesen Unterschied könnten die unterschiedlichen Zelllinien sein. Auch in unseren Experimenten gab es Unterschiede in der Sphäroidstabilität zwischen den verwendeten Tumorzelllinien. So zeigten vor allem Sphäroide der Zelllinie 4T1 eine exzessive Auswanderungsaktivität selbst bei geringer Serumkonzentration, während die EMT6- und MT6-Sphäroide einen besseren Zusammenhalt aufwiesen. Möglicherweise zeichnet sich die LnCaP-Linie durch besondere Stabilität der MCTS aus. Auch die verwendete Matrix war eine andere, nämlich Basalmembranextrakt statt Kollagen.

Jedoch ist auch dieses Material adhärent und bietet den Tumorzellen die Möglichkeit, den sphäroidalen Verband zu verlassen. Dennoch könnte die Basalmembrankollagen im Vergleich zu dem hier verwendeten Kollagen Typ I einen geringeren migrationsaktivierenden Effekt auf die Tumorzellen ausgeübt haben. Bei den Arbeiten dieser Arbeitsgruppe wurde sowohl ein Medium mit 10% FCS verwendet, als auch eines mit verringertem Serumanteil.

Durch Reduktion des Serumanteils und Umstellung des Mediums wurde nun bei den Experimenten im Rahmen der vorliegenden Arbeit versucht, einen besseren Zusammenhalt der MCTS in Kollagengel zu erreichen. Dies gelang schließlich auch. Die MCTS zeigten eine gute Stabilität, vor allem bei einem niedrigen Serumanteil von 0,5%. Jedoch erwies sich wiederum die Kombination beider Methoden als problembehaftet. Die Aortenringe zeigten bei einer FCS-Konzentration von 0,5% keinerlei oder nur unzureichende Aussprossungsaktivität, während die MCTS bei der höheren Serumkonzentration von 2,5% wiederum die Bewertung der Aussprossung aus dem Aortengewebe durch einen nicht akzeptablen Anteil an Auswanderung verhinderten. Somit konnten die MCTS aus der „Liquid overlay“-Technik nicht mit dem Aortenringassay kombiniert werden, da sie ihre Zell-Zell-Kontakte lösen, wenn sie mit einer FCS-Konzentration von mindestens 2,5% kultiviert werden, die für die Auswanderung der Zellen aus dem Aortenring erforderlich ist. Die Beobachtungen von Seano et al. konnten somit bei unseren Zelllinien nicht reproduziert werden.

Um eine Aussprossungsaktivität der Aortenringe und gleichzeitig stabile MCTS zu erlangen, wurden die MCTS nun als Alginatebeads generiert. Die Alginatebeads waren bis zu Kulturtag 10 - dem letzten untersuchten Versuchstag - stabil. Auswandernde Zellen aus dem Alginatebead wurden nicht beobachtet, jedoch gab es Tumorzellen, die außen an den Beads anhefteten, ohne innerhalb der Verbindung von Alginategel und Calcium-Ionen festgesetzt zu sein. Diese wanderten in die umliegende Matrix aus. Dieses Problem konnte jedoch behoben werden, indem vor Einbettung der Alginatebeads zu den Aortenringen ein Mediumwechsel erfolgte, der die Anzahl außen anhaftender, nicht eingebetteter Zellen minimierte. Bei Ko-Kultivierung mit Aortenringen zeigten sich die Alginatebeads weiterhin stabil, die Ringe wiesen eine suffiziente Auswanderungsaktivität bis zu Kulturtag 10 auf. Die Stabilität der Alginatebeads der drei verwendeten Tumorzelllinien wies keinen Unterschied auf.

Die MCTS stellen dabei ein Modell dar, das einem Tumor in früher Entstehungsphase bzw. einer Mikrometastase ähnelt, die noch avaskulär sind [160, 161]. Die Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen, die bei klassischen einschichtigen Kulturen fehlen, sind bei Alginatbeads nicht so ausgeprägt wie bei durch die „Liquid overlay“-Technik generierten MCTS. Dies liegt daran, dass die Zellen in der hydrophilen Matrix des Alginats zunächst vereinzelt oder in kleinen Aggregaten zu liegen kommen. Während der Inkubation kommt es jedoch durch Proliferation der Tumorzellen zu einer erhöhten Zelldichte innerhalb der Alginatbeads sowie zur Bildung von größeren Zellaggregaten. Durch das Alginat können Metabolite und Sauerstoff die Zellen erreichen und Wachstumsfaktoren der eingekapselten Zellen können das Bead verlassen [162, 163]. Somit wird die Situation innerhalb des Tumors *in vivo* besser nachgebildet als in zweidimensionalen Kulturen. Zudem ist es durch die Stabilität der Alginatbeads möglich, einen definierten Abstand zwischen Aortenringen und Tumorzellen einzuhalten, der den Aufbau eines Gradienten an Wachstumsfaktoren und Zytokinen ermöglicht. Dieser besteht auch *in vivo*. Die Aortenringe zeigen während des Versuchszeitraums eine Aussprossung von Zellen aus ihrer Wand. Das Ausmaß der Auswanderung und die Charakterisierung der Zellen nach Versuchsende mittels verschiedener Färbungen ist möglich. Auf diese Weise kann der Einfluss von Tumorzellen, die sich in einem frühen Stadium der Tumorgenese befinden und noch keinen voll vaskularisierten Tumor bilden auf die Zellen der Aortenwand untersucht werden. Somit erfüllt der Aortenring-Bead-Konfrontationsassay die Anforderungen, die vor der Entwicklung an diese Methode gestellt wurden.

Das Auswanderungsverhalten der Zellen aus dem Aortenring wurde mittels Phasenkontrastmikroskops untersucht und dokumentiert. Zunächst war festzustellen, dass die Zellen nicht vermehrt in Richtung der Tumorbeads wanderten. Dies war ursprünglich erwartet worden, da durch den dreidimensionalen Charakter des Versuchsaufbaus der Aufbau eines Gradienten an Zytokinen angenommen wurde. Denn anders als bei Experimenten, die konditioniertes Medium anwendeten [132, 164, 165], erfolgt die Produktion von Wachstumsfaktoren nur an einer definierten Stelle im Assay, nämlich dem Ort des Alginatbeads. Es war jedoch Aussprossung in alle Richtungen zu erkennen. Es gab Fälle, in denen tatsächlich die Mehrheit der mobilisierten Zellen in Richtung der Tumorzellen wanderten, genauso ließ sich jedoch auch die gegenteilige Richtung

beobachten. Zudem war in vielen Fällen keine bevorzugte Richtung der Auswanderung auszumachen, die Zellen verteilten sich gleichmäßig um den Aortenring. Diese Ergebnisse wurden auch von Seano et al. beobachtet, die bei Ko-Kultivierung von Sphäroiden aus Prostatakarzinomzellen mit menschlichen Arterienringen teilweise eine gerichtete Auswanderung zum Tumor sahen, jedoch auch Aussprossung in Gegenrichtung zum MCTS [148]. Somit ließ sich die Hypothese, dass durch die MCTS ein Gradient an Wachstumsfaktoren und Zytokinen aufgebaut wird, der zu einer verstärkten Auswanderung der Zellen hin zu den Tumorbeads führt, nicht bestätigen. Die ausgeschütteten Wachstumsfaktoren scheinen sich hingegen gleichmäßig zu verteilen und die Aussprossung aus dem gesamten Gefäßgewebe zu stimulieren.

Die Morphologie der ausgewanderten Zellen zeigt sich ebenfalls anders als erwartet. Beschriebene Aussprossungen im ARA zeigen eine kapillarartige Struktur von Endothelzellen, welche an der abluminalen Seite von Perizyten begleitet werden, sowie Makrophagen und Fibroblasten [132-134]. Auch in Vorarbeiten, auf deren Protokolle der Aufbau der hier durchgeführten Experimente basierte, wurden röhrenförmige Aussprossungen mit Integration von  $\alpha$ -SMA positiven Zellen beobachtet [125]. Auch im bisher einzigen Ring-Sphäroid-Konfrontationsassay konnten kapillarartige Strukturen beobachtet werden [148]. In dem Aortenring-Bead-Konfrontationsassay dagegen konnten nur in Ausnahmefällen röhrenartige Formen beobachtet werden, bei der überwältigenden Mehrheit waren lediglich einzelne Zellen in der umgebenden Matrix zu erkennen. Genauso verhielt es sich bei den Kontrollen, also Aortenringen ohne Stimulation oder mit VEGF-Zusatz im Medium. Somit ließ sich auch die veränderte Morphologie der auswandernden Zellen oder Zellstränge nicht mit der Ko-Kultivierung mit Tumorzellen erklären. Ein Faktor, der die angiogene Aktivität der ARAs beeinflusst, ist das Alter der verwendeten Mäuse. Doch hier sind sich die Autoren nicht immer einig, welches Alter am besten für die ARAs geeignet ist. Während Baker et al. C57BL/6 Mäuse im Alter von 8-12 Wochen empfehlen [166], erzielten De Rossi et al. bessere Ergebnisse mit Mäusen, die jünger als 8 Wochen waren [167]. Die von uns verwendeten Mäuse waren zwischen 8 und 15 Wochen alt. Somit könnten sie das Alter überschritten haben, in dem die typische kapillarartige Aussprossung stattfindet und stattdessen ein anderes Auswanderungsverhalten zeigen. In den mittlerweile veröffentlichten Konsensusrichtlinien werden Versuchstiere im Alter von 1-2 Monaten empfohlen [168].

Trotz der veränderten Morphologie der ausgewanderten Zellen war das Ausmaß der Auswanderung gut zu beobachten und wurde in vier verschiedene Kategorien eingeteilt. Während des Versuchszeitraums von 10 Tagen wurde die Aussprossung an Tag 3/4, Tag 6 und Tag 10 quantifiziert. Bei Ringen, die ohne Tumorbead oder Stimulation durch Wachstumsfaktoren kultiviert wurden, nahm die Aussprossung kontinuierlich während des Versuchszeitraumes zu. Ebenso verhielt es sich bei Ringen mit VEGF-Zusatz im Medium und EMT6-Ko-Kultivierung. Die Beobachtungen bei den Ringen ohne Tumorzellkonfrontation sind kongruent mit den bisherigen in der Literatur beschriebenen Ergebnissen von Untersuchungen an Maus- bzw. Rattenaorten. Demnach sinkt die Konzentration endogener Wachstumsfaktoren erst 10 bis 14 Tage nach Explantation der Aorta ab und es kommt zur Regression der vorhandenen Aussprossungen, zuvor sind gute Aussprossungen zu beobachten. VEGF-Zusatz im Medium sorgt sogar für eine verlängerte angiogene Aktivität der Aortenringe, sodass bis Kulturtag 10 auf mit zumindest einem gleichbleibenden Ausmaß an migrierten Zellen zu rechnen war [136, 137, 169]. Dies hat sich in den durchgeführten Experimenten bestätigt. Die Konfrontation mit Tumorzellen der Linie EMT6 führte zu der gleichen Entwicklung. Die Steigerung der Auswanderung erfolgte jedoch auf einem höheren Niveau als bei den Ringen ohne Tumorkonfrontation, der ARA zeigte eine erhöhte Auswanderungsaktivität mit vielen Ringen, die die Quantifizierungskategorie „+++“ erreichten.

Bei 4T1-Ko-Kultivierung nahm die Auswanderung von Tag 3/4 zu Tag 6 zu, von Tag 6 bis Tag 10 war jedoch keine weitere Steigerung mehr zu beobachten. Wurden die Ringe mit Beads der Zelllinie MT6 konfrontiert, so zeigte sich von Tag 3/4 zu Tag 6 ebenfalls eine verstärkte Auswanderungsaktivität, an Tag 10 ging sie jedoch zurück und befand sie sich unterhalb des Niveaus von Tag 3/4. Möglicherweise verläuft die zeitliche Dynamik der ARAs unter diesen beiden Bedingungen anders. Eine denkbare Erklärung ist, dass die 4T1- und MT6-Tumorzellen schnell eine hohe Konzentration an Wachstumsfaktoren aufbauen, die zur Mobilisation der Zellen der Gefäßwand führt. Hinweise dafür liefert der Vergleich der Aussprossungsaktivität der Ringe mit den verschiedenen Tumorzelllinien untereinander von Tag 3/4. Während der Anteil nicht aussprossender Ringe annähernd gleich hoch ist, so zeigen mit MT6- und 4T1-ko-kultivierte Aorten einen höheren Anteil an Ringen, die der Quantifizierungskategorie „++“ zuzuordnen sind, als EMT6-ko-kultivierte Aorten. Dieser Unterschied ist im Falle von EMT6 – 4T1 auch

statistisch signifikant. An Tag 6 ist die Verteilung auf die vier Kategorien bei allen Tumorzelllinien ähnlich, die EMT6-Zellen müssen also in der Zwischenzeit eine ausreichend hohe Konzentration an Wachstumsfaktoren gebildet haben, um das Anfangsdefizit auszugleichen, mithin nun eine höhere Konzentration als 4T1 und MT6 zu diesem Zeitpunkt aufgebaut haben. An Tag 10 nun stagniert die Entwicklung der Ringe unter 4T1-Einfluss, möglicherweise bilden die Tumorzellen nun im Gegensatz zu EMT6-Zellen keine ausreichende Zahl an Zytokinen mehr, um das Wachstum weiter voranzutreiben. Im Vergleich zu MT6-Ko-Kultivierung an Tag 10 besteht jedoch eine statistisch hochsignifikant stärkere Auswanderungsaktivität. Auch mit EMT6-ko-kultivierte Ringe zeigen im Vergleich zur MT6-Konfrontation eine stärkere Aussprossung. Dieser Unterschied ist statistisch höchstsignifikant. Bei MT6-Konfrontation ließe sich der Rückgang an ausgewanderten Zellen mit einer stark gesunkenen Konzentration von Wachstumsfaktoren erklären. Diese müsste dann sogar unterhalb der Konzentration liegen, die von Tag 6 bis Tag 10 bei den ARAs ohne jegliche Stimulation herrscht. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Tatsache, dass im ARA mit MT6-Beads eine größere Anzahl vitaler Zellen vorhanden ist als im ARA ohne Stimulation. Diese Zellen verbrauchen Nährstoffe im Medium und möglicherweise reichte die Menge an Medium im Falle der MT6-Ko-Kultivierung nicht aus, um alle Zellen (sowohl in der Aortenwand als auch im Alginatbead) über den vollen Versuchszeitraum zu versorgen. Möglicherweise benötigen Zellen der MT6-Linie auch mehr Medium als Zellen der anderen beiden untersuchten Zelllinien. Um diese Theorien zu bestätigen, sind weitere Experimente nötig, die die Konzentration an Wachstumsfaktoren und die metabolische Aktivität der Zellen im Verlauf der Aortenring-Bead-Konfrontationsassays untersuchen.

Vergleicht man nun die Aussprossungsaktivität der Aortenringe mit Tumorzellkonfrontation mit derjenigen von Aortengewebe ohne Stimulation, so ließ sich feststellen, dass an allen drei Beobachtungszeitpunkten eine verstärkte Aktivität der Konfrontationsassays gegeben war. An Tag 3/4 und Tag 6 war dieser Unterschied statistisch höchstsignifikant, an Tag 10 für EMT6- und 4T1-Beads ebenfalls. Nur für die MT6-Beads an Tag 10 ergab sich zwar ebenfalls eine stärkere Auswanderung als bei Ringen ohne Stimulation, jedoch war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant. Insgesamt lassen diese Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass Aortenringe unter

Tumorzelleinfluss verstärkte Auswanderungsaktivität von Zellen zeigen. Diese Beobachtung machten auch Seano et al., die bei Ko-Kultivierung mit Tumorzellen eine verstärkte angiogene Aktivität ihrer Gefäßfragmente mit längeren und stärker verzweigten Aussprossungen beschrieben [148]. Dieselben Ergebnisse zeigten sich auch bei Aortenringen, die mit von Tumorzellen oder Tumorstromazellen konditioniertem Medium versetzt worden waren [132, 170-172]. Die Tumorzellen sind also in der Lage, die Migration von Zellen aus der Aortenwand zu verstärken. Dies erfolgt durch die von Tumorzellen gebildeten löslichen Wachstumsfaktoren, da auch nur das konditionierte Medium diesen Effekt hat. Die ko-kultivierten Tumorzellen zeigten einen stärkeren Effekt auf die Auswanderungsaktivität als die Zugabe eines löslichen Zytokins im Medium alleine. Verglichen mit Aortenringen mit VEGF-Zusatz zeigten die Aortenring-Bead-Konfrontationsassays an allen Beobachtungszeitpunkten eine vermehrte Aussprossung mit statistisch hoch- bis höchstsignifikanten Unterschieden. Einzige Ausnahme bildete hier wiederum der Vergleich mit MT6-Beads an Tag 10. Eine stärkere Aussprossung im Vergleich zu VEGF-Zusatz alleine war auch hier festzustellen, statistische Signifikanz wurde jedoch im Gegensatz zu den Verhältnissen an Tag 3/4 und 6 nicht erreicht. Dennoch lässt sich bei Betrachtung aller Ergebnisse sagen, dass die komplexe Mischung an Zytokinen, die von den Tumorzellen gebildet werden einen stärkeren Einfluss auf die Zellen der Aorta ausübt als VEGF alleine. In der Folge verlassen die gefäßwandresidenten Zellen vermehrt die Aorta und wandern in die umgebende Matrix aus. Eine Untersuchung der genauen Zusammensetzung dieser Wachstumsfaktoren wurde nicht durchgeführt. Dies ist eine Fragestellung, die mit weiteren Experimenten untersucht werden könnte. Ein weiterer interessanter Aspekt bei der Tumorzellstimulation ist, ob die Ko-Kultivierung innerhalb einer gemeinsamen Matrix mit Aortenringen zu einer stärkeren Auswanderung führt als die Versorgung der Gefäßfragmente mit konditioniertem Medium derselben Tumorzelllinie. Dies würde den Aspekt beleuchten, ob neben löslichen Zytokinen auch die direkte Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktion der Tumorzellen untereinander oder zwischen Tumor- und Gefäßwandzellen einen Einfluss auf die Migration und angiogene Aktivität der gefäßwandresidenten Zellen ausübt. Auch hierzu könnten weitere Untersuchungen Aufschluss geben.

Anschließend an die Inkubation der Aortenring-Bead-Konfrontationsassays erfolgte die Charakterisierung der ausgewanderten Zellen an formalinfixierten Schnitten von ARAs, die an Tag 10 konserviert wurden.

Zunächst wurde mit Färbung auf F4/80 nach Makrophagen im ARA gesucht. Dabei zeigten sich einzelne Zellen innerhalb der Gefäßwand und dort vor allem in der Adventitia positiv. Dies entspricht den Erkenntnissen in der Literatur, wonach in der Adventitia Vorläuferzellen beschrieben wurden, die z.B. bei Stimulation mit M-CSF zu Makrophagen differenzierten [114, 129, 130]. Während der Dauer des Aortenring-Bead-Konfrontationsassays waren diese Zellen der Mischung aus Wachstumsfaktoren ausgesetzt, welche von den Tumorzellen produziert wurden und konnten so differenzieren. Es wurden jedoch keinerlei ausgewanderte Zellen beobachtet, die F4/80-positiv waren, und zwar unabhängig von den verschiedenen Bedingungen. Makrophagen gehören jedoch zu den aus der Aorta aussprossenden Zellen, in anderen Analysen unserer Arbeitsgruppe ist ebenfalls eine Auswanderung von Makrophagen zu beobachten. Auch Makrophagen, die positiv für F4/80, also den von uns genutzten Marker waren, wanderten aus Aortenringen aus [130]. Somit ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass der von uns gewählte Antikörper nicht geeignet ist, um Makrophagen zu detektieren, die aus der Gefäßwand migriert sind. Möglicherweise finden sich zu einem früheren Zeitpunkt als an Tag 10 ausgewanderte F4/80-positive Zellen in der Matrix, die bis zu Tag 10 wieder differenzieren. Dies könnte mit weiteren Färbungen an Schnitten der ARAs von Tag 3/4 und Tag 6 untersucht werden. Das Fehlen von ausgewanderten Makrophagen unter den hier etablierten Versuchsbedingungen könnte aber auch eine Erklärung für das geringe Auftreten von kapillarartigen Aussprossungen aus den Aortenringen sein. Denn Makrophagen bilden einige wichtige Zytokine, welche die Tumervaskularisierung bzw. allgemein die Angiogenese fördern, wie z.B. VEGF, FGF2 und TNF $\alpha$  [66, 173, 174]. Diese Wachstumsfaktoren spielen ebenfalls bei der Angiogenese durch Aussprossungen im ARA eine wichtige Rolle und bei Ablation von Makrophagen wird eine stark verringerte Angiogenese beobachtet [175, 176]. So reichten in den vorliegenden Versuchen die aus den Gefäßwand-residenten Vorläufern generierten oder bereits vorhandenen Makrophagen möglicherweise nicht aus, um die ausgewanderten Zellen zu einer kapillarartigen Morphogenese anzuregen. Jedoch bildeten nicht nur die nicht stimulierten Ringe wenige kapillarartigen Aussprossungen, sondern auch die Aortenringe

mit Tumorzellkonfrontation und VEGF-Zusatz im Medium. Hier sollten eigentlich pro-angiogene Zytokine in ausreichendem Maß vorhanden sein. Zur Klärung dieser Problematik wurden in unserer Arbeitsgruppe im Anschluss an die hier vorgestellten Experimente ARAs mit Verwendung von unterschiedlichen Kollagentypen durchgeführt. Es zeigte sich dabei, dass das Auswanderungsergebnis bei sonst gleichen Untersuchungsbedingungen von dem verwendeten Kollagen stark beeinflusst wurde. Das in dieser Arbeit verwendete Rinderkollagen der Firma Advanced BioMatrix erzielte dabei die schlechtesten Ergebnisse hinsichtlich der Morphogenese kapillarähnlicher Aussprossungen. Das Rattenschwanzkollagen von Merck (Millipore) lieferte dagegen ARAs, die ein sehr gutes Migrationsverhalten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der bisherigen Literatur zeigten. Somit spielt die Qualität der verwendeten Matrix offensichtlich eine entscheidende Rolle bei der Güte der Aussprossungsergebnisse im Aortenringassay. Dies sollte im Design zukünftiger Experimente berücksichtigt werden.

Der nächste verwendete Antikörper richtete sich gegen CD34, einen Oberflächenmarker für endotheliale Vorläuferzellen. Es waren bei allen fünf Bedingungen nur jeweils einzelne Zellen positiv gefärbt. Dies lässt vermuten, dass die entsprechenden ausgewanderten Zellen an Tag 10 bereits mehrheitlich zu Endothelzellen differenziert sind und den Marker für CD34 im Verlauf der Kultur verloren bzw. herunterreguliert haben, sodass er in den Immunfärbungen nicht mehr nachweisbar war. Wurden die Schnitte nämlich für den Endothelzellmarker CD31 gefärbt, so zeigten sich bei den Aortenring-Bead-Konfrontationsassays mehr als 60% der ausgewanderten Zellen positiv für CD31. Bei allein mit VEGF-Zusatz im Medium stimulierten ARAs waren nur 42,3% positiv, bei nicht stimulierten Ringen nur 28,8%. Somit war der prozentuale Anteil geringer als im Aortenring-Bead-konfrontationsassay. Die Intima der Gefäßwand war ebenfalls angefärbt. Dies war zu erwarten, da die Intima aus Endothelzellen besteht und bestätigt die richtige Auswahl dieses Markers und die erfolgreiche Verwendung der Immunfärbung, um Endothelzellen zu detektieren. Die Vielzahl der ausgewanderten Endothelzellen zeigt, dass das Standardmedium dazu fähig ist, diesen Zelltyp aus der Aorta zu mobilisieren. Beim Vergleich der Ringe mit Tumorzellkonfrontation mit denjenigen, die nicht stimuliert worden waren, ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied ( $p$ -Wert = 0,0664). Dennoch ergibt sich ein klarer Trend in die Richtung, dass die Ko-Kultivierung mit Tumorzellen zu einer vermehrten Auswanderung von

Endothelzellen bzw. einer verstärkten Differenzierung der ausgewanderten Zellen zu Endothelzellen führt. Angesichts der geringen Fallzahlen von 3 (Ringe ohne Stimulation) bzw. 9 (Ringe mit Tumorzellkonfrontation) ist ein so geringer p-Wert jedoch durchaus beachtlich. Bei Durchführung weiterer Färbungen mit dem CD31-Antikörper und somit Erhöhung der Fallzahlen könnte sich möglicherweise auch eine statistische Signifikanz ergeben. Die Tendenz von Tumorzellen, die Migration von gefäßwandresidenten Endothelzellen (bzw. endothelialen Vorläuferzellen) zu fördern, entspricht den bekannten Eigenschaften von Tumorzellen. Sie fördern u.a. durch Produktion entsprechender Wachstumsfaktoren die Angiogenese [97, 108]. Dies dient dem Tumorwachstum und – Progression, da neu gebildete Gefäße der Versorgung der Neoplasie mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie der Migration von Tumorzellen und damit Metastasierung von Tumoren dienen. Voraussetzung zur Bildung neuer Gefäße ist das Vorhandensein von Endothelzellen, die neue Kapillaren bilden können. Durch Rekrutierung von CD31-positiven Zellen aus den bereits vorhandenen Endothelzellen bzw. aus den endothelialen Vorläuferzellen der Aortenwand gelingt es den Tumorbeads, diese wichtige Bedingung für die Angiogenese zu erfüllen.

Ebenfalls unabdingbar zur Reifung der neugebildeten Gefäße sind Perizyten, die an der abluminalen Seite der Kapillarwand, also von außen die endotheliale Wandsicht der Kapillaren ummanteln und somit zur ihrer Stabilisierung beitragen [91]. Das Vorhandensein von Perizyten im ARA wurde mit einem Antikörper gegen den entsprechenden Marker NG2 geprüft. Es ergab sich, dass jeweils mindestens sechzig Prozent der ausgewanderten Zellen für diesen Marker positiv gefärbt waren. Vergleich man die Ringe mit Tumorzellkonfrontation mit denjenigen, die nicht stimuliert worden waren, so ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Ein großer Teil der Zellen war stark positiv für NG2. Auf statistische Untersuchungen der Unterschiede zwischen den einzelnen Bedingungen wurde aufgrund der geringen Fallzahl von jeweils 3 verzichtet. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass der Anteil NG2-negativer Zellen bei nicht stimulierten Ringen und EMT6-Konfrontation geringer war (unter 20%) als bei VEGF-Zusatz im Medium und MT6- und 4T1-Ko-Kultivierung ( $\geq 25,5\%$ ). Weitere Analysen sind nötig, um herauszufinden, ob diese Unterschiede bei höheren Fallzahlen statistische Signifikanz erzielen.

Die Ergebnisse der DAB-Färbung mit CD31 und NG2 zeigen, dass die Zellen zur Bildung neuer Blutgefäße im Aortenring-Bead-Konfrontationsassay in der Matrix vorhanden sind und durch den Einfluss der Tumorbeads zur Migration aus der Gefäßwand bewegt werden können. Die Tumorzellen fördern im Vergleich zu ARAs ohne Konfrontation die Auswanderung von Zellen mit einem CD31-positiven Phänotyp. Sie erhöhen damit die Verfügbarkeit von Zellen, die potenziell in der Lage sind, neue Blutgefäße zur Versorgung des Tumors zu formen. CD34-positive Zellen waren nur vereinzelt zu beobachten; dies weist darauf hin, dass an Tag 10 bereits die Mehrheit der endothelialen Vorläuferzellen zu reifen Endothelzellen differenziert ist. Durch weitere Färbungen an früher fixierten Schnitten kann diese Hypothese überprüft werden. Es ist in den durchgeführten ARAs zu einer relativ gering ausgeprägten kapillarförmigen Aussprossung gekommen. Dies kann zum einen durch den in dieser Arbeit verwendeten Kollagentyp bedingt sein, der in weiterführenden Experimenten unserer Arbeitsgruppe im Vergleich zu anderen Kollagentypen das geringste Migrationsverhalten und Kapillarformation bedingte. Zum anderen könnte aber auch das Fehlen bzw. die geringe Zahl von ausgewanderten F4/80-positiven Zellen zum Teil erklären, wieso es zu dieser relativ gering ausgeprägten kapillarförmigen Aussprossung gekommen kam. Eventuell sind an früheren Zeitpunkten der ARAs, die mit unserer Methode generiert worden sind, mehr F4/80-positive Zellen ausgewandert. Dies kann Gegenstand weiterer Experimente sein.

In dieser Arbeit wurden erstmals murine Aortenringe mit Tumorsphäroiden aus Mauszelllinien in eine gemeinsame Matrix verbracht und die Auswirkungen dieser Konfrontation auf die Zellen der Gefäßwand untersucht. Aufbauend auf dem erarbeiteten Protokoll wurde in unserer Arbeitsgruppe der Aortenringassay und die Ko-Kultivierung mit Tumorzellen weiterentwickelt. So konnte durch Wechsel des Mediums (Opti-MEM mit 2,5% FCS und 30ng/ml VEGF statt DMEM 10% FCS) sowie das Arbeiten in kleineren Einheiten (96-well-Platten statt 48-well-Platten) und damit Erreichen einer höheren Konzentration von Wachstumsfaktoren eine kapilläre Aussprossung aus den Aortenringen erzielt werden. Auch durch das Verwenden eines anderen Kollagentyps konnten stärker ausgeprägte kapilläre Aussprossungen beobachtet werden. Das Alter der Mäuse betrug dabei 7-12 Wochen und war somit geringer als bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten. Dies könnte zu einem veränderten

Aussprossungsverhalten geführt haben. Zudem wurde beobachtet, dass ohne Zugabe von VEGF nur einzelne Zellen die Gefäßwand verließen. Das Aussprossungsverhalten ähnelte dann dem in dieser Arbeit beobachteten, wo allerdings auch mit VEGF-Zusatz nur einzelne Zellen migrierten.

Basierend auf der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden in der Arbeitsgruppe weitere Modifizierungen im ARA mit und ohne Tumorkonfrontation etabliert, um die Handhabbarkeit der Methode weiter zu vereinfachen und die Herstellung zu beschleunigen und schließlich die Aussprossungsaktivität mit Kapillarformation zu optimieren, wie oben diskutiert wurden. Hierbei wurden die Aortenringe in flüssiges Rattenschwanzkollagen eingebettet und nicht zwischen zwei Schichten Kollagenmatrix (nicht publizierte Befunde von Berin Upcin, Dissertationsarbeit, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Würzburg). Dies resultierte in einer deutlich verbesserten Aussprossung und Morphogenese kapillarähnlicher Strukturen. Auch die Ko-Kultivierung von Aortenringen und Tumorzellen wurde fortgeführt. Dabei wurden aufgrund der im Vergleich zu Alginatbeads verstärkten Zell-Zell-Kontakte und der leichteren Herstellung wieder Tumorsphäroide verwendet, die mit „liquid-overlay“-Technik hergestellt wurden. Zur Unterscheidung von Tumor- und Gefäßwandzellen wurden GFP-markierte Mäuse als Donor der Aortenringe verwendet. So war die nach wie vor stattfindende Auswanderung der Tumorsphäroide kein Hindernis mehr für die Auswertung der Migration. Bei diesen Konfrontationsassays zeigte sich weiterhin eine kapilläre Aussprossung der Aortenringe.

Somit wurden in dieser Arbeit die Grundlagen für die Ko-Kultivierung von Aortenringen und Tumorzellen im dreidimensionalen Raum gelegt. Daran anschließend und darauf aufbauend wurden diese in unserer Arbeitsgruppe weiterentwickelt. Die Auswirkungen der Ko-Kultivierung können direkt und während des gesamten Versuchszeitraums beobachtet werden und es können leicht verschiedene Tumorzelllinien miteinander verglichen werden, die in der Lage sind, MCTS zu bilden. Durch Nutzung verschiedener Mausstämme mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund oder von Reporter-Mausmodellen bietet der Aortenring-Tumor-Konfrontationsassay zusätzliche Variationsmöglichkeiten. Dieses Modell zeigt sich vielversprechend, um weitere Erkenntnisse über den Einfluss von Tumorzellen auf gefäßwandresidente Stamm- und Vorläuferzellen sowie auch auf die reifen Gefäßwandzellen zu erhalten und umgekehrt

auch den Beitrag dieser Zellen zur Tumorbiologie studieren zu können. Die aus dem Konfrontationsassay gewonnenen Erkenntnisse über die Zusammensetzung der ausgewanderten Zellen sollten mit immunhistologischen Befunden verglichen werden, die aus *in vivo* gewachsenen Tumoren derselben Tumorzelllinien stammen. Dies kann dazu dienen, zu untersuchen, inwieweit das *in vitro* Modell die Gegebenheiten im Tierversuch widerspiegelt.

## 5. Zusammenfassung

Tumore bestehen nicht nur aus entarteten malignen Zellen. Vielmehr finden sich in der Tumormikroumgebung eine Vielzahl an nicht tumorigenen Zellen, die Tumorwachstum, -proliferation, -metastasierung und -angiogenese unterstützen. Diese Zellen werden als Tumorstromazellen bezeichnet. Sie können den Tumor auch vor therapeutischen Maßnahmen schützen. Ein besseres Verständnis der Stromazellen, insbesondere auch die Herkunft dieser Zellen ist daher von hoher Relevanz, auch für die Entwicklung neuer Therapieansätze. In einem voll vaskularisierten Tumor können die Zellen leicht über die Blutzirkulation zu der Neoplasie gelangen. In früheren, nicht vaskularisierten Stadien kommt als lokale Quelle das Stammzellreservoir der Adventitia größerer Blutgefäße in Betracht. In dieser Arbeit wurde eine Methode etabliert, die im dreidimensionalen Raum die Untersuchung des Einflusses von Tumorzellen auf die vaskuläre Adventitia am Model der Mauseorta ermöglicht. Dazu erfolgte die Einbettung von Alginatebeads aus Tumorzellen der Linien 4T1, MT6 oder EMT6 in eine gemeinsame Kollagenmatrix mit murinen Aortenringen. Während eines zehntägigem Versuchszeitraums wurde die Aussprossung von Zellen aus den Aortenringen beobachtet, quantifiziert und in Kategorien eingeteilt. Es wurde festgestellt, dass die Auswanderung während des Versuchszeitraums zunimmt und dass die Konfrontation mit der Zytokinmischung der Tumorzellen zu einer stärkeren Aussprossung führt, als die Stimulation mit VEGF oder keine Stimulation. Eine gerichtete Auswanderung der Zellen in Richtung der Tumorbeads konnte nicht nachgewiesen bzw. bestätigt werden. Kapilläre Aussprossungen waren nur in geringem Ausmaß zu beobachten. Bei Weiterentwicklung der Methode in unserer Arbeitsgruppe konnte dieses für den Aortenringassay typische Migrationsverhalten jedoch erzielt werden; auch bei Ko-Kultivierung mit Tumorsphäroiden kam es dann zu kapillären Aussprossungen. Bei Charakterisierung der ausgewanderten Zellen mittels immunhistochemischer Färbungen waren keine F4/80-positiven und nur einzelne CD34-positiven Zellen zu finden. Dies galt für alle Bedingungen. Die Mehrheit der ausgewanderten Zellen war bei allen Bedingungen CD31-positiv. Bei Ko-Kultivierung mit Tumorbeads war ein größerer Anteil der Zellen positiv als bei nicht stimulierten Ringen. Endotheliale Vorläuferzellen mit der Differenzierung in CD31-positive Endothelzellen und/oder reife CD31-positive Endothelzellen werden also vermehrt von

Tumorzellen aus der Aortenwand rekrutiert. Perizyten, die mit dem Marker NG2 gefärbt wurden, stellten eine Mehrheit der migrierten Zellen. Hier fand sich jedoch kein Unterschied zwischen Aortenringen mit und denjenigen ohne Tumorzellstimulation. Somit werden vor allem Zellen, die zur für das Tumorwachstum essentiell wichtigen Angiogenese benötigt werden, nämlich Endothelzellen und Perizyten, im Verlauf des ARAs rekrutiert. Die in dieser Arbeit etablierte Methode des Aortenring-Bead-Konfrontationsassays ermöglicht es, in Echtzeit den Einfluss von Tumorzellen auf die Gefäßwand im dreidimensionalen Raum zu beobachten. Durch Fixierung des Assays zu unterschiedlichen Zeitpunkten können Zelltyp und Dynamik der Aussprossungen im Versuchsverlauf charakterisiert werden. Der Aortenring-Bead-Konfrontationsassay bietet eine Vielzahl an Variationsmöglichkeiten bezüglich Tumorzelllinien, genetischem Hintergrund der Gefäßfragmente, Medien und Zusätzen. Diese Methode stellt daher eine vielversprechende Möglichkeit dar, die Lücke zwischen zweidimensionalen *in vitro*-Experimenten und kostenintensiven *in vivo*-Versuchen zu schließen.

## Literaturverzeichnis

1. <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle-2016.html>.
2. <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online/logon?sequenz=tabelleErgebnis&selectionname=23631-0001&sachmerkmal=ICD10Y&sachschluessel=ICD10-C00-C97,ICD10-C00-C14,ICD10-C15-C26,ICD10-C16,ICD10-C18,ICD10-C20,ICD10-C25,ICD10-C30-C39,ICD10-C33-C34,ICD10C43-C44,ICD10-C50,ICD10-C51-C58,ICD10-C53,ICD10-C60-C63,ICD10-C61,ICD10-C64-C68,ICD10-C67,ICD10-C81-C96,ICD10-C91-C95>.
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
4. Lemmon, M.A. and J. Schlessinger, *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2010. **141**(7): p. 1117-34.
5. Witsch, E., M. Sela, and Y. Yarden, *Roles for growth factors in cancer progression*. Physiology (Bethesda), 2010. **25**(2): p. 85-101.
6. Nishikawa, K., et al., *Development of anti-HB-EGF immunoliposomes for the treatment of breast cancer*. J Control Release, 2012. **160**(2): p. 274-80.
7. Guo, P., et al., *Overexpression of vascular endothelial growth factor by MCF-7 breast cancer cells promotes estrogen-independent tumor growth in vivo*. Cancer Res, 2003. **63**(15): p. 4684-91.
8. Tuomela, J., et al., *Fast growth associated with aberrant vasculature and hypoxia in fibroblast growth factor 8b (FGF8b) over-expressing PC-3 prostate tumour xenografts*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 596.
9. Cheng, N., et al., *Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion*. Mol Cancer Res, 2008. **6**(10): p. 1521-33.
10. Bhowmick, N.A., E.G. Neilson, and H.L. Moses, *Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 332-7.
11. Bruzzese, F., et al., *Local and systemic protumorigenic effects of cancer-associated fibroblast-derived GDF15*. Cancer Res, 2014. **74**(13): p. 3408-17.
12. Mueller, K.L., et al., *Fibroblast-secreted hepatocyte growth factor mediates epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor resistance in triple-negative breast cancers through paracrine activation of Met*. Breast Cancer Res, 2012. **14**(4): p. R104.
13. Pietras, K., et al., *Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting*. PLoS Med, 2008. **5**(1): p. e19.
14. Burkhart, D.L. and J. Sage, *Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(9): p. 671-82.
15. Ooms, A.H., et al., *Significance of TP53 Mutation in Wilms Tumors with Diffuse Anaplasia: A Report from the Children's Oncology Group*. Clin Cancer Res, 2016.
16. Parikh, N., et al., *Effects of TP53 mutational status on gene expression patterns across 10 human cancer types*. J Pathol, 2014. **232**(5): p. 522-33.

17. Xiong, S., et al., *Activin B promotes endometrial cancer cell migration by down-regulating E-cadherin via SMAD-independent MEK-ERK1/2-SNAIL signaling*. Oncotarget, 2016.
18. Hay, E.D., *An overview of epithelio-mesenchymal transformation*. Acta Anat (Basel), 1995. **154**(1): p. 8-20.
19. Kirchner, T. and T. Brabletz, *Patterning and nuclear beta-catenin expression in the colonic adenoma-carcinoma sequence. Analogies with embryonic gastrulation*. Am J Pathol, 2000. **157**(4): p. 1113-21.
20. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
21. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
22. Nishisho, I., et al., *Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients*. Science, 1991. **253**(5020): p. 665-9.
23. Becker, H.D., et al., *Chirurgische Onkologie*. 1. Auflage ed. 2002: Georg Thieme Verlag Stuttgart.
24. Seeber, S. and H.-J. Schütte, *Therapiekonzepte Onkologie*. 5. Auflage ed. 2007: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
25. Choi, Y.J., et al., *Intra-individual genomic heterogeneity of high-grade serous carcinoma of ovary and clinical utility of ascitic cancer cells for mutation profiling*. J Pathol, 2016.
26. Torres, C.M., et al., *The linker histone H1.0 generates epigenetic and functional intratumor heterogeneity*. Science, 2016. **353**(6307).
27. Gao, Q., et al., *Cell Culture System for Analysis of Genetic Heterogeneity Within Hepatocellular Carcinomas and Response to Pharmacologic Agents*. Gastroenterology, 2016.
28. Sharma, S.V., et al., *A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations*. Cell, 2010. **141**(1): p. 69-80.
29. Hurwitz, H., et al., *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2004. **350**(23): p. 2335-42.
30. Chauhan, V.P., et al., *Delivery of molecular and nanoscale medicine to tumors: transport barriers and strategies*. Annu Rev Chem Biomol Eng, 2011. **2**: p. 281-98.
31. Ireland, L., et al., *Chemoresistance in pancreatic cancer is driven by stroma-derived insulin-like growth factors*. Cancer Res, 2016.
32. Lee, J.S., et al., *STAT3-mediated IGF-2 secretion in the tumour microenvironment elicits innate resistance to anti-IGF-1R antibody*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 8499.
33. Ying, L., et al., *Cancer Associated Fibroblast-Derived Hepatocyte Growth Factor Inhibits the Paclitaxel-Induced Apoptosis of Lung Cancer A549 Cells by Up-Regulating the PI3K/Akt and GRP78 Signaling on a Microfluidic Platform*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0129593.
34. Balkwill, F.R., M. Capasso, and T. Hagemann, *The tumor microenvironment at a glance*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 23): p. 5591-6.
35. Prajapati, P. and D.W. Lambert, *Cancer-associated fibroblasts - Not-so-innocent bystanders in metastasis to bone?* J Bone Oncol, 2016. **5**(3): p. 128-131.
36. Brown, E., et al., *Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumors in vivo using second-harmonic generation*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 796-800.

37. Yamada, K.M. and K. Olden, *Fibronectins--adhesive glycoproteins of cell surface and blood*. Nature, 1978. **275**(5677): p. 179-84.
38. Adany, R., et al., *Altered expression of chondroitin sulfate proteoglycan in the stroma of human colon carcinoma. Hypomethylation of PG-40 gene correlates with increased PG-40 content and mRNA levels*. J Biol Chem, 1990. **265**(19): p. 11389-96.
39. Levental, K.R., et al., *Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling*. Cell, 2009. **139**(5): p. 891-906.
40. Hanker, A.B., et al., *Extracellular Matrix/Integrin Signaling Promotes Resistance to Combined Inhibition of HER2 and PI3K in HER2(+) Breast Cancer*. Cancer Res, 2017. **77**(12): p. 3280-3292.
41. Li, B. and J.H. Wang, *Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement*. J Tissue Viability, 2011. **20**(4): p. 108-20.
42. Orimo, A., et al., *Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion*. Cell, 2005. **121**(3): p. 335-48.
43. Xue, X., et al., *Galectin-1 secreted by activated stellate cells in pancreatic ductal adenocarcinoma stroma promotes proliferation and invasion of pancreatic cancer cells: an in vitro study on the microenvironment of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Pancreas, 2011. **40**(6): p. 832-9.
44. Jung, E.J., et al., *Galectin-1 expression in cancer-associated stromal cells correlates tumor invasiveness and tumor progression in breast cancer*. Int J Cancer, 2007. **120**(11): p. 2331-8.
45. He, X.J., et al., *Expression of galectin-1 in carcinoma-associated fibroblasts promotes gastric cancer cell invasion through upregulation of integrin beta1*. Cancer Sci, 2014. **105**(11): p. 1402-10.
46. Erez, N., et al., *Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner*. Cancer Cell, 2010. **17**(2): p. 135-47.
47. Mirkeshavarz, M., et al., *Interleukin-6 secreted by oral cancer-associated fibroblast accelerated VEGF expression in tumor and stroma cells*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2017. **63**(10): p. 131-136.
48. Wei, R., et al., *Human CAFs promote lymphangiogenesis in ovarian cancer via the Hh-VEGF-C signaling axis*. Oncotarget, 2017. **8**(40): p. 67315-67328.
49. Fukui, H., et al., *IL-22 produced by cancer-associated fibroblasts promotes gastric cancer cell invasion via STAT3 and ERK signaling*. Br J Cancer, 2014. **111**(4): p. 763-71.
50. Dowling, C.M., C. Herranz Ors, and P.A. Kiely, *Using real-time impedance-based assays to monitor the effects of fibroblast-derived media on the adhesion, proliferation, migration and invasion of colon cancer cells*. Biosci Rep, 2014. **34**(4).
51. Kalluri, R. and M. Zeisberg, *Fibroblasts in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(5): p. 392-401.
52. Vona-Davis, L. and D.P. Rose, *Angiogenesis, adipokines and breast cancer*. Cytokine Growth Factor Rev, 2009. **20**(3): p. 193-201.
53. Dirat, B., et al., *Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion*. Cancer Res, 2011. **71**(7): p. 2455-65.

54. Lee, Y., W.H. Jung, and J.S. Koo, *Adipocytes can induce epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells*. *Breast Cancer Res Treat*, 2015. **153**(2): p. 323-35.
55. Tang, D., et al., *PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity*. *Immunol Rev*, 2012. **249**(1): p. 158-75.
56. Jang, E., et al., *Secreted protein lipocalin-2 promotes microglial M1 polarization*. *Faseb j*, 2013. **27**(3): p. 1176-90.
57. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. *Trends Immunol*, 2002. **23**(11): p. 549-55.
58. Zhou, J., et al., *IL-1beta from M2 macrophages promotes migration and invasion of ESCC cells enhancing epithelial-mesenchymal transition and activating NF-kappaB signaling pathway*. *J Cell Biochem*, 2018.
59. Yeung, O.W., et al., *Alternatively activated (M2) macrophages promote tumour growth and invasiveness in hepatocellular carcinoma*. *J Hepatol*, 2015. **62**(3): p. 607-16.
60. Hegab, A.E., et al., *Tumor associated macrophages support the growth of FGF9-induced lung adenocarcinoma by multiple mechanisms*. *Lung Cancer*, 2018. **119**: p. 25-35.
61. Madsen, D.H., et al., *Tumor-Associated Macrophages Derived from Circulating Inflammatory Monocytes Degrade Collagen through Cellular Uptake*. *Cell Rep*, 2017. **21**(13): p. 3662-3671.
62. Yao, Z., et al., *Imatinib prevents lung cancer metastasis by inhibiting M2-like polarization of macrophages*. *Pharmacol Res*, 2018. **133**: p. 121-131.
63. Dhupkar, P., et al., *Anti-PD-1 therapy redirects macrophages from an M2 to an M1 phenotype inducing regression of OS lung metastases*. *Cancer Med*, 2018.
64. Binnemars-Postma, K., et al., *Targeting the Stat6 pathway in tumor-associated macrophages reduces tumor growth and metastatic niche formation in breast cancer*. *Faseb j*, 2018. **32**(2): p. 969-978.
65. Leek, R.D., et al., *Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma*. *Cancer Res*, 1996. **56**(20): p. 4625-9.
66. Lewis, C.E., et al., *Cytokine regulation of angiogenesis in breast cancer: the role of tumor-associated macrophages*. *J Leukoc Biol*, 1995. **57**(5): p. 747-51.
67. Mu, X., et al., *Tumor-derived lactate induces M2 macrophage polarization via the activation of the ERK/STAT3 signaling pathway in breast cancer*. *Cell Cycle*, 2018. **17**(4): p. 428-438.
68. Hiratsuka, S., et al., *Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(16): p. 9349-54.
69. Fridman, W.H., et al., *The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome*. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(4): p. 298-306.
70. He, W., et al., *CD155/TIGIT Signaling Regulates CD8(+) T-cell Metabolism and Promotes Tumor Progression in Human Gastric Cancer*. *Cancer Res*, 2017. **77**(22): p. 6375-6388.
71. Giraldo, N.A., et al., *The immune contexture of primary and metastatic human tumours*. *Curr Opin Immunol*, 2014. **27**: p. 8-15.
72. Takeuchi, Y. and H. Nishikawa, *Roles of regulatory T cells in cancer immunity*. *Int Immunol*, 2016. **28**(8): p. 401-9.

73. Zhu, S., et al., *CD21(lo/med)CD27(+) proinflammatory B cells are enriched in breast cancer patients and promote antitumor T cell responses*. *Exp Cell Res*, 2017. **361**(1): p. 149-154.
74. Ghadially, H., et al., *Differential regulation of CCL22 gene expression in murine dendritic cells and B cells*. *J Immunol*, 2005. **174**(9): p. 5620-9.
75. Hahne, M., et al., *Activated B cells express functional Fas ligand*. *Eur J Immunol*, 1996. **26**(3): p. 721-4.
76. Tedder, T.F., *B10 cells: a functionally defined regulatory B cell subset*. *J Immunol*, 2015. **194**(4): p. 1395-401.
77. Schwartz, M., Y. Zhang, and J.D. Rosenblatt, *B cell regulation of the anti-tumor response and role in carcinogenesis*. *J Immunother Cancer*, 2016. **4**: p. 40.
78. Dudley, A.C., *Tumor endothelial cells*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. **2**(3): p. a006536.
79. Baluk, P., H. Hashizume, and D.M. McDonald, *Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer*. *Curr Opin Genet Dev*, 2005. **15**(1): p. 102-11.
80. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis*. *Nature*, 2011. **473**(7347): p. 298-307.
81. Jain, R.K., *Determinants of tumor blood flow: a review*. *Cancer Res*, 1988. **48**(10): p. 2641-58.
82. Au, J.L., et al., *Delivery of cancer therapeutics to extracellular and intracellular targets: Determinants, barriers, challenges and opportunities*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016. **97**: p. 280-301.
83. Tejchman, A., et al., *Tumor hypoxia modulates podoplanin/CCL21 interactions in CCR7+ NK cell recruitment and CCR7+ tumor cell mobilization*. *Oncotarget*, 2017. **8**(19): p. 31876-31887.
84. Hansen, W., et al., *Neuropilin 1 deficiency on CD4+Foxp3+ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth*. *J Exp Med*, 2012. **209**(11): p. 2001-16.
85. Sullivan, R. and C.H. Graham, *Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype*. *Cancer Metastasis Rev*, 2007. **26**(2): p. 319-31.
86. Moeller, B.J., R.A. Richardson, and M.W. Dewhirst, *Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment*. *Cancer Metastasis Rev*, 2007. **26**(2): p. 241-8.
87. Jain, R.K., *Molecular regulation of vessel maturation*. *Nat Med*, 2003. **9**(6): p. 685-93.
88. Adams, R.H. and K. Alitalo, *Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(6): p. 464-78.
89. Zecchin, A., G. Borgers, and P. Carmeliet, *Endothelial cells and cancer cells: metabolic partners in crime?* *Curr Opin Hematol*, 2015. **22**(3): p. 234-42.
90. Herbert, S.P. and D.Y. Stainier, *Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011. **12**(9): p. 551-64.
91. Gaengel, K., et al., *Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(5): p. 630-8.
92. Saito, S., et al., *Emerging roles of hypoxia-inducible factors and reactive oxygen species in cancer and pluripotent stem cells*. *Kaohsiung J Med Sci*, 2015. **31**(6): p. 279-86.
93. Gerhardt, H., et al., *VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia*. *J Cell Biol*, 2003. **161**(6): p. 1163-77.

94. Dewerchin, M. and P. Carmeliet, *PlGF: a multitasking cytokine with disease-restricted activity*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(8).
95. Dewerchin, M. and P. Carmeliet, *Placental growth factor in cancer*. Expert Opin Ther Targets, 2014. **18**(11): p. 1339-54.
96. Kim, K.J., C.S. Cho, and W.U. Kim, *Role of placenta growth factor in cancer and inflammation*. Exp Mol Med, 2012. **44**(1): p. 10-9.
97. Cao, R., et al., *Collaborative interplay between FGF-2 and VEGF-C promotes lymphangiogenesis and metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(39): p. 15894-9.
98. Cascone, T. and J.V. Heymach, *Targeting the angiopoietin/Tie2 pathway: cutting tumor vessels with a double-edged sword?* J Clin Oncol, 2012. **30**(4): p. 441-4.
99. Graveel, C.R., D. Tolbert, and G.F. Vande Woude, *MET: a critical player in tumorigenesis and therapeutic target*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(7).
100. Heldin, C.H., *Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment*. Cell Commun Signal, 2013. **11**: p. 97.
101. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
102. Folkman, J., et al., *Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia*. Nature, 1989. **339**(6219): p. 58-61.
103. Toffoli, S., et al., *Intermittent hypoxia is an angiogenic inducer for endothelial cells: role of HIF-1*. Angiogenesis, 2009. **12**(1): p. 47-67.
104. North, S., M. Moenner, and A. Bikfalvi, *Recent developments in the regulation of the angiogenic switch by cellular stress factors in tumors*. Cancer Lett, 2005. **218**(1): p. 1-14.
105. Ikeda, E., et al., *Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(34): p. 19761-6.
106. Coulet, F., et al., *Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter*. J Biol Chem, 2003. **278**(47): p. 46230-40.
107. Green, C.J., et al., *Placenta growth factor gene expression is induced by hypoxia in fibroblasts: a central role for metal transcription factor-1*. Cancer Res, 2001. **61**(6): p. 2696-703.
108. Buchanan, C.F., et al., *Cross-talk between endothelial and breast cancer cells regulates reciprocal expression of angiogenic factors in vitro*. J Cell Biochem, 2012. **113**(4): p. 1142-51.
109. Gelati, M., et al., *The angiogenic response of the aorta to injury and inflammatory cytokines requires macrophages*. J Immunol, 2008. **181**(8): p. 5711-9.
110. Nolan, D.J., et al., *Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization*. Genes Dev, 2007. **21**(12): p. 1546-58.
111. Ricci-Vitiani, L., et al., *Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells*. Nature, 2010. **468**(7325): p. 824-8.
112. Wang, R., et al., *Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium*. Nature, 2010. **468**(7325): p. 829-33.
113. Cheng, L., et al., *Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth*. Cell, 2013. **153**(1): p. 139-52.

114. Zengin, E., et al., *Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis*. Development, 2006. **133**(8): p. 1543-51.
115. Worsdorfer, P., et al., *The vascular adventitia: An endogenous, omnipresent source of stem cells in the body*. Pharmacol Ther, 2016.
116. Wong, S.P., et al., *Pericytes, mesenchymal stem cells and their contributions to tissue repair*. Pharmacol Ther, 2015. **151**: p. 107-20.
117. Ingram, D.A., et al., *Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2783-6.
118. Grenier, G., et al., *Resident endothelial precursors in muscle, adipose, and dermis contribute to postnatal vasculogenesis*. Stem Cells, 2007. **25**(12): p. 3101-10.
119. Naito, H., et al., *Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels*. Embo j, 2012. **31**(4): p. 842-55.
120. Covas, D.T., et al., *Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein*. Exp Cell Res, 2005. **309**(2): p. 340-4.
121. Lin, C.S., et al., *Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture*. Histol Histopathol, 2010. **25**(6): p. 807-15.
122. Tang, Z., et al., *Differentiation of multipotent vascular stem cells contributes to vascular diseases*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 875.
123. Pasquinelli, G., et al., *Thoracic aortas from multiorgan donors are suitable for obtaining resident angiogenic mesenchymal stromal cells*. Stem Cells, 2007. **25**(7): p. 1627-34.
124. Campagnolo, P., et al., *Human adult vena saphena contains perivascular progenitor cells endowed with clonogenic and proangiogenic potential*. Circulation, 2010. **121**(15): p. 1735-45.
125. Klein, D., et al., *Vascular wall-resident CD44+ multipotent stem cells give rise to pericytes and smooth muscle cells and contribute to new vessel maturation*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20540.
126. Corselli, M., et al., *The tunica adventitia of human arteries and veins as a source of mesenchymal stem cells*. Stem Cells Dev, 2012. **21**(8): p. 1299-308.
127. Passman, J.N., et al., *A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sc $\alpha$ 1+ smooth muscle progenitor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(27): p. 9349-54.
128. Krautler, N.J., et al., *Follicular dendritic cells emerge from ubiquitous perivascular precursors*. Cell, 2012. **150**(1): p. 194-206.
129. Psaltis, P.J., et al., *Characterization of a resident population of adventitial macrophage progenitor cells in postnatal vasculature*. Circ Res, 2014. **115**(3): p. 364-75.
130. Zorzi, P., et al., *Technical Advance: The rat aorta contains resident mononuclear phagocytes with proliferative capacity and proangiogenic properties*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(5): p. 1051-9.
131. Mekala, S.R., et al., *Generation of Cardiomyocytes From Vascular Adventitia-Resident Stem Cells*. Circ Res, 2018. **123**(6): p. 686-699.
132. Nicosia, R.F. and A. Ottinetti, *Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro*. Lab Invest, 1990. **63**(1): p. 115-22.

133. Nicosia, R.F., et al., *Paracrine regulation of angiogenesis by different cell types in the aorta ring model*. Int J Dev Biol, 2011. **55**(4-5): p. 447-53.
134. Nicosia, R.F. and S. Villaschi, *Rat aortic smooth muscle cells become pericytes during angiogenesis in vitro*. Lab Invest, 1995. **73**(5): p. 658-66.
135. Nicosia, R.F., *The aortic ring model of angiogenesis: a quarter century of search and discovery*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(10): p. 4113-36.
136. Villaschi, S. and R.F. Nicosia, *Angiogenic role of endogenous basic fibroblast growth factor released by rat aorta after injury*. Am J Pathol, 1993. **143**(1): p. 181-90.
137. Nicosia, R.F., et al., *Endogenous regulation of angiogenesis in the rat aorta model. Role of vascular endothelial growth factor*. Am J Pathol, 1997. **151**(5): p. 1379-86.
138. Mori, M., et al., *Capillary growth from reversed rat aortic segments cultured in collagen gel*. Acta Pathol Jpn, 1988. **38**(12): p. 1503-12.
139. Nicosia, R.F., E. Bonanno, and S. Villaschi, *Large-vessel endothelium switches to a microvascular phenotype during angiogenesis in collagen gel culture of rat aorta*. Atherosclerosis, 1992. **95**(2-3): p. 191-9.
140. Diglio, C.A., et al., *Angiogenesis in rat aorta ring explant cultures*. Lab Invest, 1989. **60**(4): p. 523-31.
141. Aplin, A.C., et al., *Angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor induce expression of inflammatory cytokines before angiogenesis*. Physiol Genomics, 2006. **27**(1): p. 20-8.
142. Ergun, S., D. Tilki, and D. Klein, *Vascular wall as a reservoir for different types of stem and progenitor cells*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(4): p. 981-95.
143. Psaltis, P.J., et al., *Identification of a monocyte-predisposed hierarchy of hematopoietic progenitor cells in the adventitia of postnatal murine aorta*. Circulation, 2012. **125**(4): p. 592-603.
144. Hu, Y., et al., *Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice*. J Clin Invest, 2004. **113**(9): p. 1258-65.
145. Wong, M.M., et al., *Sirolimus stimulates vascular stem/progenitor cell migration and differentiation into smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinase/beta-catenin signaling pathway*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(10): p. 2397-406.
146. Nicosia, R.F., R. Tchao, and J. Leighton, *Interactions between newly formed endothelial channels and carcinoma cells in plasma clot culture*. Clin Exp Metastasis, 1986. **4**(2): p. 91-104.
147. Nicosia, R.F., R. Tchao, and J. Leighton, *Angiogenesis-dependent tumor spread in reinforced fibrin clot culture*. Cancer Res, 1983. **43**(5): p. 2159-66.
148. Seano, G., et al., *Modeling human tumor angiogenesis in a three-dimensional culture system*. Blood, 2013. **121**(21): p. e129-37.
149. Page, H., P. Flood, and E.G. Reynaud, *Three-dimensional tissue cultures: current trends and beyond*. Cell Tissue Res, 2013. **352**(1): p. 123-31.
150. Mehta, G., et al., *Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy*. J Control Release, 2012. **164**(2): p. 192-204.
151. Vaupel, P., *Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology*. Semin Radiat Oncol, 2004. **14**(3): p. 198-206.

152. Mikhail, A.S., et al., *Image-based analysis of the size- and time-dependent penetration of polymeric micelles in multicellular tumor spheroids and tumor xenografts*. Int J Pharm, 2014. **464**(1-2): p. 168-77.
153. Burdett, E., et al., *Engineering tumors: a tissue engineering perspective in cancer biology*. Tissue Eng Part B Rev, 2010. **16**(3): p. 351-9.
154. Laird, A.K., *DYNAMICS OF TUMOR GROWTH*. Br J Cancer, 1964. **13**: p. 490-502.
155. Sutherland, R.M., *Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model*. Science, 1988. **240**(4849): p. 177-84.
156. Katt, M.E., et al., *In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform*. Front Bioeng Biotechnol, 2016. **4**: p. 12.
157. Weiswald, L.B., D. Bellet, and V. Dangles-Marie, *Spherical cancer models in tumor biology*. Neoplasia, 2015. **17**(1): p. 1-15.
158. Lang, G., *Histotechnik Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2. Auflage ed. 2013: Springer Verlag Wien.
159. Schutze, F., et al., *Inhibition of Lysyl Oxidases Improves Drug Diffusion and Increases Efficacy of Cytotoxic Treatment in 3D Tumor Models*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 17576.
160. Friedrich, J., et al., *Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach*. Nat Protoc, 2009. **4**(3): p. 309-24.
161. Lal-Nag, M., et al., *Exploring Drug Dosing Regimens In Vitro Using Real-Time 3D Spheroid Tumor Growth Assays*. SLAS Discov, 2017. **22**(5): p. 537-546.
162. Shakibaei, M., et al., *Curcumin potentiates antitumor activity of 5-fluorouracil in a 3D alginate tumor microenvironment of colorectal cancer*. BMC Cancer, 2015. **15**: p. 250.
163. Li, L., et al., *Neural lineage differentiation of embryonic stem cells within alginate microbeads*. Biomaterials, 2011. **32**(20): p. 4489-97.
164. Wang, C., et al., *Human adipocytes stimulate invasion of breast cancer MCF-7 cells by secreting IGFBP-2*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0119348.
165. Song, W., et al., *Conditioned medium from stimulated macrophages inhibits growth but induces an inflammatory phenotype in breast cancer cells*. Biomed Pharmacother, 2018. **106**: p. 247-254.
166. Baker, M., et al., *Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis*. Nat Protoc, 2011. **7**(1): p. 89-104.
167. De Rossi, G., R. Scotland, and J. Whiteford, *Critical Factors in Measuring Angiogenesis Using the Aortic Ring Model*. J Genet Syndr Gene Ther, 2013. **4**(5).
168. Nowak-Sliwinska, P., et al., *Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays*. Angiogenesis, 2018. **21**(3): p. 425-532.
169. Massoudi, D., et al., *Procollagen C-proteinase enhancer 1 (PCPE-1) functions as an anti-angiogenic factor and enhances epithelial recovery in injured cornea*. Cell Tissue Res, 2017. **370**(3): p. 461-476.
170. Van Valckenborgh, E., et al., *Murine 5T multiple myeloma cells induce angiogenesis in vitro and in vivo*. Br J Cancer, 2002. **86**(5): p. 796-802.
171. Suarez-Carmona, M., et al., *Soluble factors regulated by epithelial-mesenchymal transition mediate tumour angiogenesis and myeloid cell recruitment*. J Pathol, 2015. **236**(4): p. 491-504.

172. Drebert, Z., et al., *Colon cancer-derived myofibroblasts increase endothelial cell migration by glucocorticoid-sensitive secretion of a pro-migratory factor*. *Vascul Pharmacol*, 2017. **89**: p. 19-30.
173. Rego, S.L., R.S. Helms, and D. Dreau, *Breast tumor cell TACE-shed MCSF promotes pro-angiogenic macrophages through NF-kappaB signaling*. *Angiogenesis*, 2014. **17**(3): p. 573-85.
174. Riabov, V., et al., *Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis*. *Front Physiol*, 2014. **5**: p. 75.
175. Ligresti, G., et al., *Macrophage-derived tumor necrosis factor-alpha is an early component of the molecular cascade leading to angiogenesis in response to aortic injury*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(5): p. 1151-9.
176. Gurevich, D.B., et al., *Live imaging of wound angiogenesis reveals macrophage orchestrated vessel sprouting and regression*. *Embo j*, 2018. **37**(13).

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung des Tumorstromas mit den wichtigsten enthaltenen Zelltypen.....	4
<b>Abbildung 2:</b> Die vaskulogene Zone mit darin beherbergten Stamm- und Vorläuferzellen. ....	14
<b>Abbildung 3:</b> Aortenring-Sphäroid-Konfrontationsassay. ....	34
<b>Abbildung 4:</b> EMT6-Sphäroide in Kollagen mit Opti-MEM mit verschiedenen FCS-Konzentrationen.....	35
<b>Abbildung 5:</b> Tumorsphäroide in Kollagen mit Opti-MEM mit verschiedenen FCS-Konzentrationen an Versuchstag 10. ....	36
<b>Abbildung 6:</b> Konfrontationsassay mit Opti-MEM 2,5% FCS an Versuchstag 9.....	38
<b>Abbildung 7:</b> Alginatebeads der Zelllinie MT6. ....	40
<b>Abbildung 8:</b> Alginatebeads der Zelllinie 4T1.....	41
<b>Abbildung 9:</b> ARA + 4T1-Beads an Versuchstag 10. ....	43
<b>Abbildung 10:</b> Aortenring-Bead-Konfrontationsassay an Versuchstag 10.....	44
<b>Abbildung 11:</b> Aortenring-Bead-Konfrontationsassay an Versuchstag 10.....	45
<b>Abbildung 12:</b> Aortenring-Bead-Konfrontationsassay an Versuchstag 10. Auswanderungsmorphologie.....	48
<b>Abbildung 13:</b> Auswanderung der Zellen bei nicht stimulierten und mit VEGF stimulierten Aortenringen.....	49
<b>Abbildung 14:</b> Auswanderung der Zellen im Aortenring-Bead-Konfrontationsassay mit EMT6 und 4T1. ....	50
<b>Abbildung 15:</b> Auswanderung der Zellen im Aortenring-Bead-Konfrontationsassay mit MT6.....	50
<b>Abbildung 16:</b> Vergleich der Auswanderung der Zellen bei Aortenringen ohne Stimulation, mit VEGF-A-Stimulation sowie bei Konfrontation der Aortenringe mit EMT6, MT6 und 4T1 an Versuchstag 3/4. ....	54
<b>Abbildung 17:</b> Vergleich der Auswanderung der Zellen bei Aortenringen ohne Stimulation, mit VEGF-A-Stimulation sowie bei Konfrontation der Aortenringe mit EMT6, MT6 und 4T1 an Versuchstag 6. ....	55

<b>Abbildung 18:</b> Vergleich der Auswanderung der Zellen bei Aortenringen ohne Stimulation, mit VEGF-A-Stimulation sowie bei Konfrontation der Aortenringe mit EMT6, MT6 und 4T1 an Versuchstag 10. ....	56
<b>Abbildung 19:</b> F4/80-Färbung DAB an Versuchstag 10. ....	58
<b>Abbildung 20:</b> CD34-Färbung DAB an Versuchstag 10. ....	59
<b>Abbildung 21:</b> Verteilung der CD34-stark positiven –schwach positiven und -negativen Zellen bei den fünf verschiedenen Versuchsbedingungen an Versuchstag 10.....	60
<b>Abbildung 22:</b> CD31-Färbung DAB an Versuchstag 10. ....	61
<b>Abbildung 23:</b> Verteilung der CD31-positiven und -negativen Zellen an Versuchstag 10.....	62
<b>Abbildung 24:</b> NG2-Färbung DAB an Versuchstag 10.....	63
<b>Abbildung 25:</b> Verteilung der NG2-positiven und -negativen Zellen an Versuchstag 10. ....	64

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b> Primärantikörper.....	24
<b>Tabelle 2:</b> Sekundärantikörper.....	24
<b>Tabelle 3:</b> Murine Tumorzelllinien.....	24

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
2D/3D	Zwei-/dreidimensional
A.	Arteria
AB-Komplex	Avidin-Biotin-Komplex
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	Aluminiumsulfat
Ang	Angiopoietin
ARA	Aortic Ring Assay
bez.	bezüglich
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CAF	Cancer Associated Fibroblast
CD	Cluster of Differentiation
C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> x H <sub>2</sub> O	Zitronensäure
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAB	3-3-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diaminidin-2-phenylindol (C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> )
dest. H <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ECM	Extrazellulärmatrix
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPC	Endothelial Progenitor Cell (Endotheliale Vorläuferzelle)
et al.	und Andere
EtOH	Ethanol

FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGF2, bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
ggü.	gegenüber
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff/Salzsäure
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
INF	Interferon
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
M-CSF	Makrophage Colony-Stimulating Factor
MCTS	Multizelluläre Tumorsphäroide
mg,g	Milligramm, Gramm
min	Minute(n)
mind.	mindestens
ml, l, µl	Milliliter, Liter, Mikroliter
MMP	Matrixmetalloproteinase
n	Anzahl
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
neg.	Negativ
NGS	Normal Goat Serum
NiSO <sub>4</sub>	Nickelsulfat
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen

NS	Nicht signifikant
NSTIM	Nicht stimulierte Aortenringe
INF	Interferon
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PFA	Paraformaldehyd
PIGF	Placental Growth Factor
pos.	positiv
P/S	Penicillin/Streptomycin
Rb	Retinoblastom
rpm	Rounds per minute
SDF1	Stromal Cell Derived Factor 1
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
Shh	Sonic hedgehog
sog.	sogenannt
TAM	Tumor assoziierte Makrophagen
TGF	Transforming Growth Factor
TH	T-Helferzelle
TNF	Tumor Nekrose Faktor
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Zelle
u.a.	unter anderem
V.	Vena
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
x	mal
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

## **Publikationen**

Rossow L, Veitl S, Vorlová S, Wax JK, Kuhn AE, Maltzahn V, Upcin B, Karl F, Hoffmann H, Gätzner S, Kallius M, Nandigama R, Scheld D, Irmak S, Herterich S, Zernecke A, Ergün S, Henke E

LOX-catalyzed collagen stabilization is a proximal cause for intrinsic resistance to chemotherapy.

Oncogene. 2018;37(36):4921-4940. doi:10.1038/s41388-018-0320-2

Schütze F, Röhrig F, Vorlová S, Gätzner S, Kuhn A, Ergün S, Henke E

Inhibition of Lysyl Oxidases Improves Drug Diffusion and Increases Efficacy of Cytotoxic Treatment in 3D Tumor Models.

Sci Rep. 2015;5:17576. doi:10.1038/srep17576

## **Danksagung**

Zunächst möchte ich mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater, Professor Dr. Süleyman Ergün für die freundliche Überlassung des Themas meiner Dissertation sowie das konstante Interesse am Fortgang meiner Arbeit und die fachliche Unterstützung während meiner Zeit im Forschungslabor bedanken.

Ein großes Dankeschön geht auch an meinen Betreuer, Herrn Dr. Erik Henke, der stets ein offenes Ohr und eine offene Bürotür für meine Anliegen hatte und sich immer die Zeit nahm, um mich tatkräftig zu unterstützen und auftretende Fragen zu klären. Dieses hohe Maß an „Ansprechbarkeit“ und Erreichbarkeit ist, wie ich aus Gesprächen mit anderen Doktoranden erfahren habe, nicht selbstverständlich und ich kann mich glücklich schätzen, hier auf das Ideal eines Betreuers getroffen zu sein.

Ebenfalls möchte ich mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Tumor-vaskularisierung und -mikroumgebung Friedrich Schütze, Simona Veitl, Leonie Rossow und Berin Upcin für die schöne gemeinsame Zeit im Institut, fachliche Ratschläge und psychologische Krisenintervention bedanken.

Den Mitarbeiterinnen in der Histologie des anatomischen Institutes Erna Kleinschroth, Doris Dettelbacher-Weber und Elke Varin danke ich für ihre Unterstützung, Tipps und gute Gespräche während der histologischen Färbungen und für das Anfertigen der Paraffinschnitte. Es war eine sehr angenehme Zusammenarbeit und ich fühlte mich jederzeit willkommen.

Ursula Roth hat mich in die Technik des Aortenringassays eingeführt, dafür ebenfalls ein herzliches Dankeschön.

Ulrike Kuhn möchte ich für die wiederholten und geduldigen Nachhilfestunden in Statistik danken.

An meine Freunde, meine Eltern und meinen Bruder sowie an meinen Partner ergeht hiermit auch ein sehr großes Dankeschön dafür, wie sie mich durch die lange Zeit der Dissertation mit ihren Höhenflügen und Tiefpunkten begleitet haben, mit Interesse, Geduld, Ratschlägen oder auch mal einer Schulter zum Anlehnen bereit standen und somit einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.