

**Aus der Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Christoph Härtel**

**Entwicklung eines dreidimensionalen Zellkulturmodells zur Untersuchung
der Apoptoseinduktion von kolorektalen Tumorzellen durch periphere
Blutlymphozyten**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der

Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Florian Alexander Rudolf Scherg

aus

Lohr am Main (Sackenbach)

Würzburg, Mai 2021

Referentin: Prof. Martina Prelog

Korreferent: Prof. Andreas Beilhack

Korreferentin: Prof. Alma Zerneck-Madsen

Dekan: Prof. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2022

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Das angeborene Immunsystem.....	1
1.1.1	Die Zell-vermittelte Immunantwort durch Makrophagen	
1.1.2	Die Zell-vermittelte Immunantwort durch natürliche Killerzellen	
1.2	Das erworbene Immunsystem.....	6
1.2.1	Die Zell-vermittelte Immunantwort: CTL und pro-inflammatorische Typ-1-Reaktion durch TH1-Zellen	
1.2.2	Die humorale Immunantwort: nicht-inflammatorische Typ-2-Reaktion durch TH2-Zellen und B-Lymphozyten	
1.3	Auflistung der wichtigsten Zytokine.....	11
1.4	Immunologische Tumor-Wirt Beziehung.....	12
1.4.1	Reaktion des Immunsystems auf Tumorzellen (Immun-Editing)	
1.4.2	Mechanismen der Immunevasion bei Tumoren	
1.4.3	Rolle der Inflammation auf Tumorentstehung und Tumorprogression	
1.5	Tissue Engineering – Vergleich zwei- und dreidimensionaler Zellkulturen.....	18
1.6	Kolorektales Karzinom.....	21
1.7	Rationale, Fragestellung und Zielsetzung.....	22
1.7.1	Rationale	
1.7.2	Fragestellung und Zielsetzung	

2. Material und Methoden

2.1	Material.....	27
2.2	Geräte.....	28
2.3	Chemikalien.....	29
2.4	Puffer und Medien.....	30
2.5	Antikörper	31
2.6	Gebrauchsfertige Lösungen.....	32
2.7	Gebrauchsfertige Kits.....	33
2.8	Biologisches Material für die Zellkultur.....	33
2.9	Histologische und immunhistologische Lösungen.....	35
2.10	Methoden.....	35

2.10.1 Lymphozytenisolierung durch Dichtezentrifugation.....	33
2.10.2 Zellzählung durch Neubauer-Zählkammer.....	34
2.10.3 Kryokonservierung von PBMC und Tumorzellen.....	34
2.10.4 Zellkultur und Versuchsdurchführungen.....	35
2.10.4.1 Passagieren von Fibroblasten und SW480-Zellen	
2.10.4.2 2D-Zellkultur	
2.10.4.2 3D-Zellkultur	
2.10.5 ELISA.....	41
2.10.5.1 M30-ELISA	
2.10.5.2 IFNY-ELISA und TNF α -ELISA	
2.10.6 Histologie und Immunhistologie.....	44
2.10.6.1 PFA-Fixierung	
2.10.6.2 Paraffineinbettung und Schnitt	
2.10.6.3 Immunhistologische Fluoreszenzfärbung	
2.10.7 Auswertung	
2.10.7.1 Regressive Konzentrationsbestimmung	
2.10.7.2 Berechnung der relativen Apoptoserate	
2.10.8 Experimente.....	50
2.10.8.1 2D Kokultivierung von Fibroblasten und SW480-Zellen mit PBMC: Vergleich der relativen Apoptoserate nach Zugabe von PBMC	
2.10.8.2 3D Kokultivierung von Fibroblasten und SW480-Zellen mit PBMC: Vergleich der relativen Apoptoserate nach Zugabe von PBMC	
2.10.8.3 3D Kultivierung von SW480-Zellen mit PBMC: Vergleich der relativen Apoptoserate nach Zugabe von PBMC	
2.10.8.4 3D Kultivierung von SW480-Zellen mit PBMC: Vergleich der relativen Apoptoserate nach Zugabe unterschiedlich vieler PBMC	
2.10.8.5 3D Kokultivierung von SW480-Zellen mit Fibroblasten mit PBMC: Vergleich der Zunahme der relativen Apoptoserate der SW480- Zellen in Monokultur und Kokultur mit Fibroblasten nach Zugabe unterschiedlich vieler PBMC	
2.10.8.6 2D Kultivierung von SW480-Zellen mit PBMC: Korrelation der relativen Apoptoserate der SW480-Zellen und der TNF α - Produktion der PBMC	

- 2.10.8.7 2D Kultivierung von SW480-Zellen mit PBMC: Vergleich der relativen Apoptoserate der SW480-Zellen nach Zugabe von konditioniertem Medium
- 2.10.8.8 3D Kultivierung von SW480-Zellen mit PBMC: Vergleich der relativen Apoptoserate der SW480-Zellen nach Zugabe von konditioniertem Medium
- 2.10.8.9 TNF α - und IFN γ -Konzentrationsänderungen im 3D-System mit SW480-Zellen nach Zugabe von konditioniertem Medium

3. Ergebnisse

- 3.1 2D Kokultivierung von Fibroblasten und SW480-Zellen mit PBMC: Vergleich der relativen Apoptoserate nach Zugabe von PBMC.....60
 - 3.1.1 Bestimmung einer Grund-Apoptoserate
 - 3.1.2 Mikroskopische Charakterisierung der Zellmorphologien
- 3.2 3D Kultivierung von SW480-Zellen mit und ohne Fibroblasten mit PBMC: Vergleich der relativen Apoptoserate der SW480-Zellen nach Zugabe von PBMC.....64
- 3.3 3D Kultivierung von SW480-Zellen mit und ohne Fibroblasten mit PBMC: Vergleich der relativen Apoptoserate der SW480-Zellen nach Zugabe unterschiedlich vieler PBMC.....66
 - 3.3.1 Relative Apoptoserate der SW480-Zellen
 - 3.3.2 Immunhistologische Färbung der 3D-Modelle
 - 3.3.3 Vergleich der relativen Apoptoserate der SW480-Zellen im 2D-System mit derjenigen im 3D-System
- 3.4 2D Kokultivierung von SW480-Zellen mit PBMC: Korrelation der relativen Apoptoserate der SW480-Zellen und der TNF α -Produktion der PBMC.....73
- 3.5 2D Kokultivierung von SW480-Zellen mit PBMC: Vergleich der relativen Apoptoserate der SW480-Zellen nach Zugabe von konditioniertem Medium.....74
- 3.6 3D Kokultivierung von SW480-Zellen mit PBMC: Vergleich der relativen Apoptoserate der SW480-Zellen nach Zugabe von konditioniertem Medium und Vergleich der Konzentrationsänderung von TNF α und IFN γ nach Konfrontation mit SW480-Zellen.....76
 - 3.6.1 Relative Apoptoserate der SW480-Zellen

3.6.2 TNF α - und IFN γ -Konzentrationsänderungen im 3D-System mit SW480-Zellen nach Zugabe von konditioniertem Medium

4. Diskussion	
4.1 Vergleich des Ausmaßes der Apoptose der SW480-Zellen durch PBMC im 2D-System mit demjenigen im 3D-System.....	81
4.2 Vergleich der durch PBMC induzierten Apoptose der SW480-Zellen mit und ohne Kokultivierung mit Fibroblasten.....	82
4.3 Mögliche Mechanismen der Apoptoseinduktion der SW480-Zellen durch die PBMC im 2D-System.....	83
4.3.1 Hauptakteure des unspezifischen Immunsystems im Kampf gegen die Tumorzellen	
4.3.2 Hauptakteure des spezifisches Immunsystems im Kampf gegen die Tumorzellen	
4.3.3 Apoptoseinduktion durch konditioniertes, aktiviertes Medium in 2D und 3D	
4.4 Immunhistologische Färbung der 3D-Modelle.....	92
4.5 Standardisierung der Methode und der verwendeten Zellen.....	93
4.6 Ausblick.....	96
5. Zusammenfassung.....	100
6. Literaturverzeichnis.....	104
7. Anhang	
7.1 Eigenleistung	
7.2 Danksagung	
7.3 Lebenslauf	
8. Appendix	
Publikation der wissenschaftlichen Arbeit	

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Auflistung verwendeter Materialien mit Hersteller
Tabelle 2:	Auflistung verwendeter Geräte mit Hersteller
Tabelle 3:	Auflistung verwendeter Chemikalien mit Hersteller und Lotnummer
Tabelle 4:	Auflistung verwendeter Puffer und Medien mit Hersteller und Lotnummer
Tabelle 5:	Auflistung verwendeter Antikörper mit Hersteller und Lotnummer
Tabelle 6:	Auflistung verwendeter gebrauchsfertiger Lösungen und Lotnummer
Tabelle 7:	Auflistung verwendeter gebrauchsfertiger Kits mit Hersteller und Lotnummer
Tabelle 8:	Charakterisierung der SW480-Zellen
Tabelle 9:	Auflistung verwendeter histologischer und immunhistologischer Lösungen
Tabelle 10:	Darstellung der einzelnen Schritte der Paraffineinbettung
Tabelle 11:	Darstellung der einzelnen Schritte der Entparaffinierung und Hydratisierung zur Vorbereitung der immunhistologischen Färbung
Tabelle 12:	Darstellung der unterschiedlichen Zellzahlen für SW480-Zellen, Fibroblasten und PBMC pro Well im 2D-Experiment
Tabelle 13:	Darstellung der unterschiedlichen Zellzahlen für SW480-Zellen, Fibroblasten und PBMC pro Well im 3D-Experiment

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Die drei Phasen der Immunreaktion bei einer Krebserkrankung
- Abbildung 2: 3D-Zellkultur von der Dezellularisierung bis zum fertigen statischen System
- Abbildung 3: Vorbereiten der Zellkronen für die Zellbesiedlung
- Abbildung 4: Funktionsmechanismus des M30-ELISAs zum Nachweis von Apoptose in Zellen epithelialen Ursprungs
- Abbildung 5: 2D: Relative Apoptoseraten der MK SW480 nach Zugabe von 1, 2 und 3 Millionen PBMC
- Abbildung 6: 2D: Relative Apoptoseraten der KK SW480/Fibroblasten nach Zugabe von 1, 2 und 3 Millionen PBMC
- Abbildung 7: Mikroskopische Darstellung der Zellzahl und Zellmorphologie der MK SW480 (A) und der KK SW480/Fibroblasten (B) mit unterschiedlichen PBMC-Konzentrationen nach 48 h und 72 h
- Abbildung 8: 3D: Relative Apoptoseraten der MK SW480 nach Zugabe von 1, 2 und 3 Millionen PBMC
- Abbildung 9: 3D: Relative Apoptoseraten der KK SW480/Fibroblasten nach Zugabe von 1 Millionen PBMC
- Abbildung 10: 3D: Relative Apoptoseraten der MK SW480 nach Zugabe von 1, 2, 3, 4 und 5 Millionen PBMC
- Abbildung 11: 3D: Relative Apoptoseraten der KK SW480/Fibroblasten nach Zugabe von 1, 2, 3, 4, 5 und 6 Millionen PBMC
- Abbildung 12: Immunhistologische Charakterisierung der 3D-MK SW480 stimuliert mit 3 Millionen PBMC
- Abbildung 13: Immunhistologische Charakterisierung der 3D-KK SW480/Fibroblasten stimuliert mit 3 Millionen PBMC
- Abbildung 14: A) MK: Vergleich der relativen Apoptoseraten der MK SW480 nach Zugabe von 2 Millionen PBMC im 2D-System mit den korrespondierenden relativen Apoptoseraten im 3D-System
B) KK: Vergleich der relativen Apoptoseraten der KK SW480/Fibroblasten nach Zugabe von 2 Millionen PBMC im 2D-System mit den korrespondierenden relativen Apoptoseraten im 3D-System
- Abbildung 15: TNF α -Konzentrationsänderungen im Zellkultur-Überstand von mit SW480-Zellen kultivierten PBMC im Vergleich zu monokultivierten PBMC
- Abbildung 16: A) Ansatz I 2D: Relative Apoptoserate der MK SW480 nach Zugabe von 2 Millionen PBMC
B) Ansatz II 2D: Vergleich der relativen Apoptoserate der MK SW480 nach Zugabe von aktiviertem Zellkultur-Überstand aus Ansatz I mit der Apoptoserate ohne die Zugabe von aktiviertem Zellkultur-Überstand
- Abbildung 17: A) Ansatz I 2D: Relative Apoptoseraten der MK SW480 Zellen nach Zugabe von 2 Millionen PBMC
B) Ansatz II 3D: Vergleich der relativen Apoptoseraten der MK SW480 nach Zugabe von aktiviertem Zellkultur-Überstand aus Ansatz I mit den relativen Apoptoseraten ohne die Zugabe von aktiviertem Zellkultur-Überstand
- Abbildung 18: A) 3D: Vergleich der TNF α -Konzentration der aktivierten zellfreien PBMC-Überstände aus dem 2D-Ansatz I nach 24 h ohne Konfrontation mit SW480-Zellen mit den TNF α -Konzentration nach Konfrontation mit SW480-Zellen
B) 3D: Vergleich der IFN γ -Konzentration der aktivierten zellfreien PBMC-Überstände aus dem 2D-Ansatz I nach 24 h ohne Konfrontation mit SW480-Zellen mit den IFN γ -Konzentration nach Konfrontation mit SW480-Zellen

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
5-FU	5-Fluoruracil
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zellen
BCG	Bacillus-Calmette-Guerin
bzw.	Beziehungsweise
CEA	Carcinoembryonale Antigen
CCR	Chemokin-Rezeptor
CD	Engl. cluster of differentiation
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTL	Zytotoxische T-Effektorzelle (engl. cytotoxic T-lymphocyte)
CTLA4	Zytotoxisches T-Effektorzellen assoziiertes Protein 4 (engl. <i>cytotoxic T-lymphocyte associated Protein 4</i>)
CXCL	Chemokinligand
CXCR	Chemokin-Rezeptor
d. h.	Das heißt
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DC	Engl. dendritic cell
DMEM	Engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Engl. extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Engl. epidermal growth factor
ELISA	Engl. enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	Engl. epithelial-mesenchymal-transition
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	Fetales Kälber Serum
Fibro	Fibroblasten
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde (<i>engl. hour</i>)
H ₂ O	Wasser
HNPCC	Hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom-Syndrom
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
KK	Kokultur
KRK	Kolorektales Karzinom
LotNr.	Lotnummer
M-CSF	Engl. macrophage-colony stimulating factor
MET	Engl. mesenchymal-epithelial-transition
MHC	Engl. major histocompatibility complex
min	Minuten
MK	Monokultur
ml	Milliliter

mm	Milimeter
MSC	Engl. mesenchymal stem cells
NaCl	Natriumchlorid
NFkB	Engl. nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NSAIDS	Engl. non-steroidal antiinflammatory drugs
PBMC	Engl. peripheral blood mononuclear cells
PBS	Engl. phosphate buffered saline
PCK	Engl. pan cytokeratin = Pan-Zytokeratin
PFA	Paraformaldehyd
rpm	Engl. revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SIS	Engl. small intestinal submucosa
SISmuc	Engl. small intestinal submucosa with mucosa
sog.	Sogenannt
SOP	Standardarbeitsanweisung (engl. standard operating procedure)
TAA	Engl. tumor associated antigen
Tab.	Tabelle
TCM	Engl. central memory cells
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEM	Engl. effector memory cells
TGF	Engl. transforming growth factor
TH	T-Helferzelle
TLR	Toll-ähnliche-Rezeptoren
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Familie
TNF α	Tumornekrose Faktor alpha
TREG	Regulatorische T-Zellen
Tween 20	Polysorbat 20
U	Units
u.a.	Unter anderem
UICC	Franz. Union Internationale Contre le Cancer
VEGF	Engl. vascular endothelial growth factor
verd.	Verdünnt
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

1. Einleitung

1.1 Das angeborene Immunsystem

Die Hauptaufgabe unseres Immunsystems ist toxische Substanzen und Mikroorganismen, sowie nekrotische, apoptotische, alternde, fremde oder entartete Zellen aufzuspüren, um sie dann in einem zweiten Schritt zu eliminieren [1]. Hierbei bedienen sich die Immunzellen aus einem stetig modifizierten Pool an hochkomplexen angeborenen und unspezifischen sowie erworbenen und spezifischen Abwehrmechanismen. Da sich die zu bekämpfenden Strukturen sowohl in Körperflüssigkeiten wie Blut oder Gewebsflüssigkeit als auch im Inneren von körpereigenen Zellen oder entarteten Zellen aufhalten, haben sich im Laufe der Evolution jeweils zwei unterschiedliche Abwehrstrategien durchgesetzt: Die humorale Immunantwort und die zelluläre Immunantwort. Um die Immunabwehr möglichst effektiv zu gestalten, ist es ganz besonders wichtig, dass diese Vorgänge zu einem bestimmten Zeitpunkt und in der korrekten Reihenfolge ablaufen. Dabei müssen sich die Angriffsmechanismen spezifisch gegen die gewünschten Ziele richten, um Fehlreaktionen, wie sie beispielsweise bei Allergien oder bei Autoimmunerkrankungen vorkommen, zu vermeiden [2]. Ist die Spezifität für diese Zielstrukturen ausgebildet, ist es wichtig ein Immungedächtnis auszubilden, um eine lebenslange Abwehr dieser Fremdstoffe zu gewährleisten. Für die Koordination dieser einzelnen Schritte der Immunabwehr, das Wachstum und die Ausdifferenzierung der Immunzellen sowie die Kommunikation dieser Zellen untereinander, sind Zytokine - wie beispielsweise Interleukine, Chemokine, Interferone und die Zytokine der Tumornekrosefaktor-Familie - unerlässlich [3]. Zur angeborenen unspezifischen Immunabwehr gehören physikalische, chemische und biologische Mechanismen, wie sie die natürliche mechanische Schutzbarriere der intakten Haut, die Ziliarfunktion der Atemwege oder die Schutzfunktion des sauren PH-Wertes im Magen darstellen. Im Falle des angeborenen Immunsystems läuft die Unterscheidung von „fremden“ und „körpereigenen“ Strukturen über die Erfassung immer wiederkehrender Muster von Oberflächenmolekülen durch

immunologische Rezeptormoleküle, deren wichtigste Gruppe die Toll-ähnlichen Rezeptoren (engl. *toll-like receptor*, TLR) darstellen [4].

1.1.1 Die Zell-vermittelte Immunantwort durch Makrophagen

Der Hauptmechanismus des unspezifischen zellulären Abwehrsystems ist die Phagozytose. Unter Phagozytose versteht man die Aufnahme extrazellulärer fester Partikel in das Innere sogenannter Phagozyten. Dieses mononukleäre Phagozytosesystem als wichtiger Hauptbestandteil des angeborenen Immunsystems wurde erstmals von Elie Metchnikoff im Jahre 1908 näher beschrieben. Elie Metchnikoff postulierte, dass die Stimulation der Phagozyten der Schlüssel zur Immunität ist [5]. Die Phagozyten werden in drei Gruppen eingeteilt: Granulozyten (eosinophile, neutrophile und basophile Granulozyten), dendritische Zellen und Makrophagen, die aus ihren Vorläuferzellen, den Monozyten, nach Eintritt in das Gewebe durch den Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren entstehen und gewebespezifische Fähigkeiten entwickeln. Monozyten differenzieren sich aus peripher zirkulierenden einkernigen Blutzellen (engl. *peripheral blood mononuclear cell*, PBMC), die sich wiederum aus einer gemeinsamen myeloidischen Progenitorzelle im Knochenmark entwickeln [6]. Monozyten werden, bevor sie ins Gewebe migrieren, abhängig von ihrer Verweildauer im peripheren Blut, in zwei Populationen unterteilt [7]: residente Monozyten und inflammatorische Monozyten. Diese zwei Populationen können immunphänotypisch mithilfe der Oberflächenproteine CD14 und CD16 unterschieden werden. Die residenten Monozyten sind positiv für CD14 und CD16 (CD14+CD16+) und exprimieren zudem CCR5, während die inflammatorischen Monozyten ausschließlich für CD14 positiv sind (CD14+CD16-) und CCR2 exprimieren [6]. Die inflammatorischen Monozyten verlassen, im Gegensatz zu den residenten Monozyten, schnell das Blutsystem und wandern ins Gewebe ein, wo sie sich zu sogenannten soliden Gewebemakrophagen entwickeln. Man bezeichnet sie als inflammatorische Monozyten, da sie während einer Entzündung oder eines Traumas von elementarer Bedeutung sind [8]. Da die Einwanderung weiterer Monozyten in das entzündete, infizierte oder geschädigte

Gewebe entscheidend gestört ist, übernehmen die bereits dort existenten Makrophagen die Koordination dieser Entzündungsreaktionen. Sie können einerseits im Sinne einer Immun-Effektorzelle fungieren und andererseits im Sinne eines „Hausmeisters und Recyclers“ das Interstitium von Zellresten nekrotischer und apoptotischer Zellen befreien, die beispielsweise durch Traumata, oxidativen Stress oder bei der physiologischen Reorganisation von Geweben angefallen sind. Diese Reinigungsprozesse durch nicht stimulierte ansässige Makrophagen (Fresszellen = *scavenger cells*) verlaufen unabhängig von dem klassischen Immunsignalweg, also ohne die Aktivierung desselben durch andere Immunmodulatoren [2]. Zu den Rezeptoren, über die diese Art der Phagozytose initiiert wird, gehören Scavenger-Rezeptoren, Phosphatidylserin-Rezeptoren, Integrine und Komplement-Rezeptoren [1]. Makrophagen, die Zellreste durch TLR erkennen und anschließend phagozytieren, ändern daraufhin die Expression bestimmter Oberflächenproteine und pro-inflammatorischer Proteine [1]. Diese Reaktion der Makrophagen auf endogene Trigger im Interstitium ist nur ein Beispiel, um ihre bemerkenswerte Plastizität zu verdeutlichen, mit der sie auf unterschiedlichste Reize in ihrer Umgebung reagieren können [9]. So verwundert es auch nicht, dass die Makrophagen mit ihren vielen verschiedenen charakteristischen Eigenschaften eine bedeutende Rolle sowohl bei der angeborenen als auch bei der adaptiven Immunabwehr spielen.

Im Sinne ihrer Funktion als Immunabwehrzellen innerhalb des angeborenen Immunsystems können sie bei fremden und entarteten Zellen oder Mikroorganismen im Rahmen der Phagozytose durch die Freisetzung zelltoxischer Stoffe wie z. B. Sauerstoffradikale oder Enzyme wie z. B. Lysozyme und saure Hydrolasen eine Nekrose induzieren. Die Aktivierung von Makrophagen kann über folgende Faktoren erfolgen: 1) Tumornekrose-Faktor alpha ($TNF\alpha$), der bei Zelltod freigesetzt wird, 2) über die endotoxisch wirkenden Lipopolysaccharidstrukturen auf der Bakterienoberfläche bei einer bakteriellen Infektion oder 3) über Interferon gamma (IFN γ), ausgeschüttet von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und T-Helferzellen [1, 4]. Die Kontrolle der Makrophagenaktivierung erfolgt hauptsächlich durch Glukokortikoide, Arachinodonsäurederivate und über

Zytokine wie TGF β (engl. *transforming growth factor*) und Interleukin (IL) 10 [10]. Durch die Aktivierung können die Makrophagen selbst Zytokine, Chemokine und weitere Mediatoren freisetzen, um somit ein Entzündungsmilieu zu schaffen, in dem alle beteiligten Zellen und Proteine ihre optimale Wirkung erzielen können [4]. Zu den Zytokinen, die nach Kontakt mit Fremdpartikeln von Makrophagen freigesetzt werden, gehören IL-2, IL-6 und TNF α [8]. Bekannte Chemokine, die von Makrophagen produziert werden, sind CX3CL1, CCL2 und CCL5 für T-Helferzellen 1 (TH1-Zellen), CD8 $^{+}$ -T-Zellen, natürliche Killerzellen und Makrophagen, CCL9 und CCL10 für Memory-T-Zellen und CCL17 und CCL22 für die Migration von TH1-Zellen und regulierende T-Zellen (TREGs) in das Tumorgewebe [11]. Auch aktivierte Makrophagen zeigen eine erstaunliche Plastizität abhängig von ihrer Umgebung, sodass man sie in viele Subpopulationen mit unterschiedlichen Charakteristika einteilen kann. Mosser und Edwards nehmen eine Einteilung in drei Subpopulationen vor, an deren ursächlicher Entstehung sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem beteiligt sein kann [1]: 1) wundheilende Makrophagen, 2) klassisch aktivierte Makrophagen und 3) regulatorische Makrophagen. Dabei wird die Differenzierung der nicht-aktivierten Makrophagen zu wundheilenden Makrophagen über einen Gewebeschaden initiiert. Als klassisch aktivierte Makrophagen wird hier diejenige Makrophagenpopulation bezeichnet, die für die Immunabwehr gegen verschiedene Erreger sowie die Eliminierung entarteter Zellen verantwortlich ist. Sie sind Bestandteil des Zell-vermittelten angeborenen Immunsystems und besitzen eine über IFN γ - und TNF α -vermittelte mikrobiologische und anti-karzinogene Toxizität. IFN γ wird von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) gebildet und stimuliert die Makrophagen zur Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine, sowie zur Steigerung ihres Vorrats an zelltoxischem Sauerstoff und Stickstoffradikalen. Da die Produktion von IFN γ durch NK-Zellen zeitlich begrenzt ist, wird sie von TH1-Zellen als Teil des adaptiven Immunsystems aufrechterhalten [1]. Diese TH1-Zellen werden von Zytokinen koordiniert und stimuliert, die wiederum von den klassisch aktivierten Makrophagen freigesetzt werden [12]. Die regulatorischen Makrophagen als dritte beschriebene Subpopulation besitzen regulatorischen Einfluss auf die Immunabwehr und auf inflammatorische

Vorgänge. So verwundert es auch nicht, dass die Ausschüttung von Glukokortikoiden zu einer Erhöhung dieser Makrophagenpopulation führt und Glukokortikoide somit indirekt auch über diesen Weg ihre entzündungshemmende und immunsuppressive Wirkung entfalten [1]. Alle regulatorischen Makrophagen benötigen unabdingbar die folgenden beiden Stimuli, um ihre anti-inflammatorische Aktivität zu entfalten: Der erste Stimulus ist die apoptotische Zelle und sobald dieser mit einem zweiten Stimulus wie z. B. einem TLR oder dem Zytokin TGF β kombiniert wird, wird der Makrophage angeregt, IL-10 zu produzieren. IL-10 hemmt die Produktion und die Aktivität pro-inflammatorischer Zytokine und seine Ausschüttung ist somit das bedeutendste Merkmal der regulatorischen Makrophagen.

1.1.2 Die Zell-vermittelte Immunantwort durch natürliche Killerzellen

NK-Zellen entwickeln sich aus Zellen der lymphatischen Reihe im Knochenmark und zirkulieren anschließend frei im Blut. Ihr Tötungsmechanismus ähnelt sehr dem der zytotoxischen T-Effektorzellen (CTL = *cytotoxic T-lymphocyte*), die ein Bestandteil der adaptiven Immunabwehr sind. Nach Andocken an der Oberfläche der Zielzelle werden Effektorproteine wie Granzym B und Perforine freigesetzt, die die Zellmembran durchdringen und den programmierten Zelltod (Apoptose) der Zielzelle einleiten. Die Aktivierung der NK-Zellen erfolgt durch Interferone wie IFN α und IFN γ und Zytokine wie z. B. das durch Makrophagen ausgeschüttete IL-12. IL-12 bewirkt in Kombination mit TNF α die Freisetzung von IFN γ durch NK-Zellen selbst [13]. Dieser Mechanismus ist entscheidend für das Bereitstellen von IFN γ in frühen Phasen einer Immunabwehr, bevor die Produktion zu einem späteren Zeitpunkt von aktivierten CTL übernommen wird. Welche Strategie NK-Zellen zur Unterscheidung von „fremd“ und „körpereigen“ verwenden, ist noch weitestgehend unerforscht. Es wird vermutet, dass ein entscheidender Schritt der Identifikation fremder Zellen auf dem Erkennen veränderter Strukturen an der Zelloberfläche beruht. Bei den veränderten Oberflächenstrukturen kann es sich um körperfremde Glykoproteine handeln, die von entarteten Zellen, Bakterien oder Viren präsentiert werden oder um veränderte körpereigene Strukturen (z. B.

veränderte MHC-I-Moleküle). Viele intrazelluläre Erreger oder auch Tumorzellen verändern, während sie vom Immunsystem abgewehrt werden, die Anzahl und die Struktur eben dieser MHC-I-Moleküle, um diese antigenpräsentierende Funktion aufzuheben [4, 13, 14].

1.2 Das erworbene Immunsystem

Während die eigentliche Hauptaufgabe des angeborenen Immunsystems, neben der Antigenpräsentation, darin besteht, zwischen „körpereigen“ und fremd“ zu unterscheiden, besteht die Aufgabe des adaptiven Immunsystems darin, nicht nur antigenspezifisch zu agieren, sondern auch diese erlernten Abwehrstrategien per immunologischem Gedächtnis für eine lange Zeit zu bewahren. Die Hauptakteure dieser spezifischen Immunabwehr sind die T- und B-Lymphozyten. Man unterscheidet eine zelluläre adaptive Immunabwehr durch T-Lymphozyten von einer humoralen adaptiven Immunabwehr durch B-Lymphozyten. Beide Abwehrstrategien sind zu Beginn ähnlich: Antigene oder Antigenbruchstücke werden auf der Zelloberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) zum einen über MHC-I-Moleküle präsentiert, wie es beispielsweise bei dendritischen Zellen, Langerhans Zellen, Monozyten oder Makrophagen der Fall ist. Zum anderen werden Antigenbruchstücke über MHC-II-Moleküle auf B-Lymphozyten präsentiert [2]. Unreife naive T-Lymphozyten oder B-Lymphozyten erkennen im Folgenden über ihre T- und B- Zell-Rezeptoren diese Antigene und können durch klonale Expansion zu unterschiedlichsten T- bzw. B-Zellsubpopulationen ausdifferenzieren. Dabei wird die hohe Spezifität des erworbenen Immunsystems gegenüber einer sehr großen Menge verschiedenster Antigene durch die Vielfalt und genetische Variabilität der T- und B-Zell-Rezeptoren gewährleistet [4]. Es bestehen nun vier verschiedene Immunantworten des adaptiven Immunsystems [8]:

Zell-vermittelte Immunantwort:

1. Direkte Zellyse oder Induktion der Apoptose durch CD8+ zytotoxische T-

Effektorzellen, basierend auf dem MHC-I-vermittelten Erkennen von Antigenen auf infizierten oder entarteten Zellen

2. Zell-vermittelte proinflammatorische Typ-1-Reaktion der CD4⁺-TH1-Zellen

Humorale Immunantwort:

1. T-Zell-abhängige nicht-inflammatorische Typ-2-Reaktion der CD4⁺-TH2-Zellen und der B-Lymphozyten (Antikörper)
2. T-Zell-unabhängige Aktivierung der B-Lymphozyten (Antikörper)

Die T-Lymphozyten gehören der zellulären adaptiven Immunabwehr an und erkennen ihr Antigen über T-Zell-Rezeptoren (engl. *t cell receptor*, TCR) auf ihrer Oberfläche. Diese TCR bestehen dabei immer aus membrangebundenen Proteinen, die den Immunglobulinen der B-Zell-Rezeptoren sehr ähneln, da sie sowohl variable und konstante Regionen aufweisen als auch sehr variabel sind. Dennoch gibt es einen entscheidenden Unterschied zwischen T- und B-Zell-Rezeptoren und damit auch zwischen der Initiierung der erworbenen und adaptiven Immunabwehr: Der TCR erkennt seine Antigene nicht direkt (wie der B-Zell-Rezeptor), sondern nur einzelne Antigenbruchstücke, die mittels MHC-I- oder über MHC-II-Molekülen präsentiert werden. Dabei erkennen CD8⁺-CTL ihre Antigene ausschließlich über MHC-I-Moleküle und CD4⁺-T-Helferzellen Antigene ausschließlich über MHC-II-Moleküle. MHC-Moleküle sind Glykoproteine, die von einer bestimmten Gruppe an Genen codiert werden: dem Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) [3]. MHC-I-Moleküle befinden sich in unterschiedlicher Dichte auf allen kernhaltigen Zellen. So tragen die kernlosen Erythrozyten auf ihrer Oberfläche keine MHC-I-Moleküle, sodass es ihnen nicht möglich ist, Antigene für zytotoxische T-Zellen zu präsentieren. MHC-II-Moleküle befinden sich normalerweise auf B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen, aber nicht auf Gewebszellen. Diese Selektivität der Interaktion zwischen T-Zell-Rezeptoren und MHC-Molekülen führt zu einer sogenannten MHC-Abhängigkeit (MHC-Restriktion) [4]. So sind die Erkennungsmechanismen des Antigens nicht nur spezifisch für ein bestimmtes Antigenbruchstück, sondern auch für die Kombination von MHC-

Molekülen, durch die diese Antigene präsentiert werden. Nach Erkennung der Antigen-MHC-Kombination auf den APC durch den TCR der naiven T-Zelle, differenziert sich diese zu einer T-Effektorzellen oder einer T-Gedächtniszelle, die je nach Spezialisierung verschiedenen funktionellen Subpopulationen zugeordnet werden kann. In der Gruppe der T-Zell-Subpopulationen unterscheidet man CD8+-T-Zellen und CD4+-T-Helferzellen. Ausdifferenzierte CD8+-T-Zellen nennt man auch zytotoxische T-Effektorzellen bzw. zytotoxische Lymphozyten (engl. *cytotoxic lymphocyte*, CTL). Innerhalb der CD4+-Populationen unterscheidet man ausgehend von den naiven CD4+-T-Zellen die ausgereiften zentralen (engl. *central memory cells*, TCM) und peripheren T-Gedächtnis-Effektorzellen (engl. *effector memory cells*, TEM) und die CD4+-T-Effektorzellen. Letztgenannte können sich weiter zu immunologisch aktivierenden TH1, TH2 und TH17 oder zu immunologisch regulatorischen T-Zelle (TREG) ausdifferenzieren [3]. Dabei gehört die proinflammatorische TH1-Zellpopulation der Zell-vermittelten Immunabwehr an und die anti-inflammatorische TH2-Zellpopulation der humoralen Immunantwort. Die TH1-Zellen sind unmittelbar mit der Aktivierung und Differenzierung von zentralen CD4+-TCM und peripheren CD4+-TEM verknüpft. Wichtig für die Aktivierung naiver T-Zellen, die klonale Expansion und das weitere Überleben der T-Effektorzelle, sowie für die Steuerung der verschiedenen Differenzierungen in die einzelnen T-Zellsubpopulationen sind drei Signale, die im Folgenden als Signal 1, Signal 2 und Signal 3 bezeichnet werden: Signal 1 ist die antigenspezifische T-Zell-Rezeptor-Aktivierung; Signal 2 ist das Zusammenspiel bestimmter Kostimulantien auf APC mit Liganden auf den T-Zellen und Signal 3 wird durch den umgebenden Zytokincocktail und die vorhandenen Zytokin-Rezeptorbindungen bestimmt [3]. Am Anfang dieser Signalkette steht das angeborene Immunsystem mit seinen TLR, über die die „Fremd“-Signale übermittelt werden, welche die Voraussetzung für die Aktivierung der APC sind [4]. Ein bekanntes Beispiel für das Signal 2 stellt die Wechselwirkung des kostimulierenden Rezeptors CD28 auf der naiven T-Zelle mit dem kostimulierenden Liganden B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) auf APC dar. Dabei kann die naive T-Zelle nur dann zur Differenzierung zur T-Effektorzelle angeregt werden, wenn sie gleichzeitig das Antigen und den entsprechenden kostimulierenden Faktor auf der APC detektiert. Somit wird

sichergestellt, dass die naive T-Zelle nicht fälschlicherweise durch eine APC, die nur zufälligerweise das Antigen trägt, aktiviert wird [4, 15]. Durch diese Aktivierung der T-Effektorzelle wird von dieser wiederum IL-2 und der passende IL-2 Rezeptor (CD25) präsentiert, wodurch die autokrine Proliferation der T-Effektorzelle gewährleistet wird. Während der Ausdifferenzierung vermindert eine naive CD4⁺-T-Zelle, die über eine T-Gedächtniszelle weiter zur T-Effektorzelle differenziert, mit wachsender Antigenerfahrung die Expression des Chemokinsrezeptors CCR7. Dieser bindet an CCL19 und ist für die Navigation der naiven T-Zellen ins lymphatische Gewebe verantwortlich. So sind TCM, welche in lymphatisches Gewebe zirkulieren, CCR7-positiv. Im Gegensatz dazu sind Effektor T-Gedächtniszellen, die sich eher in der Peripherie aufhalten und unter anderem Homing-Rezeptoren für Endothelzellen exprimieren, CCR7-negativ. Naive T-Zellen sind noch CD45RO-positiv und exprimieren wenig IFN γ und TNF α . Die ausgereifte T-Zelle ist dagegen CD45RO-negativ und exprimiert viel IFN γ und TNF α [16-18]. Als weitere Zytokin-Beispiele, die Einfluss auf die T-Zell-Differenzierung haben, sind das von dendritischen Zellen und Makrophagen (nach Aktivierung spezieller Mustererkennungs-Rezeptoren wie TLR) produzierte IL-12 und IL-4 zu nennen. So stimuliert IL-12 die TH1-Polarisierung, während IL-4 die TH2-Polarisierung stimuliert [3].

1.2.1 Die Zell-vermittelte Immunantwort: CTL und pro-inflammatorische Typ-1-Reaktion durch TH1-Zellen

CD8⁺-CTL sind in der Lage virusinfizierte oder entartete Zellen direkt zu töten. Um eine solche Fähigkeit zu erlangen, bedarf es einer sog. Kostimulation: Entweder wird die CD8⁺-T-Zelle direkt über den Kontakt mit der reifen APC und gleichzeitig dem 4-1B-Liganden stimuliert, also ohne die Hilfe der CD4⁺-T-Helferzelle, oder sie wird über eine CD4⁺-T-Zelle stimuliert, die ihrerseits auch durch eine reife APC über CD40L stimuliert wurde [4]. Während T-Gedächtniszellen für die Bildung des immunologischen Gedächtnisses von großer Bedeutung sind, übernehmen CD8⁺-CTL die Aufgabe der Zelleliminierung infizierter oder entarteter Tumorzellen nach Antigenerkennung über MHC I-Moleküle. Sie induzieren Apoptose entweder über

Ausschüttung zytotoxischer Granula oder über sogenannte Todesrezeptoren (engl. *death receptors*) [19]. In den zytotoxischen Granula sind drei Effektorproteine enthalten, die nach Freisetzung aktiviert werden: Das erste zytotoxische Protein ist das Perforin. Perforin polymerisiert calciumabhängig und macht die Zellmembran der entarteten Zelle durch Porenbildung durchlässig für Granzym B [20, 21]. Weitere Proteine sind Serinproteasen, die als Granzyme bezeichnet werden, und die zusammen mit der dritten Protein-Gruppe, den Granulysin, die Fähigkeit besitzen, Apoptose in der Zielzelle zu induzieren. Apoptotische Zellen werden dann von Phagozyten aufgenommen und in kleine Fragmente zerlegt. Da dieser Vorgang ohne Kostimulantien abläuft, kann dieser programmierte Zelltod ausgelöst durch CD8+-CTL als immunologisch „stummes Ereignis“ betrachtet werden. Das heißt, es werden dadurch keine Immunreaktionen ausgelöst [4, 20]. Dennoch können CTL auch IFN γ produzieren, das einen großen Einfluss auf die Expression von MHC-I und auf die Makrophagenaktivierung hat. Über TNF α wirken sie weiter immunmodulierend. CTL eliminieren ausschließlich diejenigen Zellen, die ein Antigen präsentieren, das über den T-Zell-Rezeptor auf dem CTL erkannt werden kann. Dabei bleiben benachbarte Zellen ohne dieses über MHC-I präsentierte Antigen durch eine zielgerichtete Freisetzung der zytotoxischen Granula verschont [4]. Apoptose kann auch über die sog. Todesrezeptoren der TNFR-Familie induziert werden, wie z. B. der TNF-Rezeptor oder der sogenannte FAS-Ligand, der CD95+ ist. Als Liganden dieser Todesrezeptoren können zum Beispiel TNF α , CD95 Liganden und andere Zytokine sein, die von T-Lymphozyten freigesetzt werden. APC können ihr phagozytiertes Antigen oder Antigenbruchstücke über MHC-II-Moleküle präsentieren. Diese Struktur wird durch den T-Zell-Rezeptor von CD4+-T-Helferzellen erkannt, wodurch diese aktiviert werden. Für die Differenzierung des jeweiligen T-Helfersubtyps TH1, TH2 oder TH17 entscheidend ist das Zytokinmilieu (Signal 3), dessen Zusammensetzung entscheidend von den aktivierten APC mitbestimmt wird [22]. Die pro-inflammatorischen TH1-Zellen werden über die Interaktion von CD40 der APC und ihrem CD40-Ligand zur Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie z. B. IL-2 und IFN γ angeregt. Während IL-2 autostimulierend über die Bindung an CD25 wirkt, fördert das IFN γ in den antigenpräsentierenden Makrophagen die

Interaktionsfähigkeit von APC und TH1-Zelle durch die Hochregulierung von CD40 und MHC-II-Molekülen. Außerdem wirkt auch IL-12 stimulierend auf TH1-Zellen. Weiterhin steigert IFN γ die Freisetzung von TNF α und es hemmt die humorale B-Zell-vermittelte TH2-Antwort [23]. Eine weitere wichtige Gruppe der T-Helferzellen sind regulatorische T-Zellen. Sie haben regulatorischen Einfluss auf immunologische Vorgänge durch die Produktion ihrer Leitzytokine IL-10 und TGF β .

1.2.2 Die humorale Immunantwort: nicht-inflammatorische Typ-2-Reaktion durch TH2-Zellen und B-Lymphozyten

Die anti-inflammatorischen TH2-Zellen sind entscheidende Akteure der humoralen spezifischen Immunantwort. Sie werden ebenfalls wie TH1-Zellen über CD40 der APC kostimuliert, interagieren aber nicht mit Makrophagen als APC, sondern mit B-Lymphozyten als APC. Durch die Interaktion mit dem über MHC-II-Moleküle präsentierten Antigenbruchstück auf der Oberfläche des B-Lymphozyten erfolgt die Stimulation der Zytokinproduktion der TH2-Zelle. Eine wichtige Rolle spielen IL-4 und IL-10, die autostimulierend wirken und über die Hemmung von Makrophagen die pro-inflammatorische TH1-Antwort inhibieren. Diese Autostimulation bewirkt die Differenzierung von der naiven B-Zelle zur antigenspezifischen Antikörper-produzierenden reifen B-Zelle [23]. Die von der Zelle produzierten Antikörper erreichen nun auf humoralem Weg die entsprechenden Antigene auf den Zielzellen und leiten die Eliminierung dieser APC über das Komplementsystem ein.

1.3 Auflistung der wichtigsten Zytokine

In diesem Abschnitt werden stichpunktartig diejenigen Zytokine aufgelistet, die bei der Immunantwort eine zentrale Rolle spielen.

- Interleukine: Es handelt sich hierbei um pleiotrope Proteine, sezerniert von Immunzellen. Sie regulieren in unterschiedlicher Art und Weise die immunologischen Vorgänge.
- Interferone: Man unterscheidet Interferone vom Typ I (= $\text{INF}\alpha$ und $\text{INF}\beta$) und Typ II ($\text{IFN}\gamma$). $\text{IFN}\gamma$ ist ein zentraler Entzündungsmediator und wird von CD4^+ -TH1-Zellen, CD8^+ -Zellen und NK-Zellen produziert.
- Tumor-Nekrose-Faktoren: Sie wurden so benannt, weil es ihnen möglich ist, Tumorzellen zu zerstören. $\text{TNF}\alpha$ wird von Makrophagen produziert und $\text{TNF}\beta$ wird von pro-inflammatorischen T-Zellen produziert.
- Transformierende Wachstumsfaktoren (TGF): Sie dienen der Förderung der Vermehrung von Tumorzellen.
- Koloniestimulierende Faktoren
- Chemokine: Diese Faktoren sind chemotaktische Proteine, die Leukozyten den Weg zu sekundären lymphatischen Organen und Entzündungsgebieten weisen. Sie werden von Leukozyten oder Zellen wie z. B. Epithelzellen und Tumorzellen produziert und unterliegen einer einheitlichen Nomenklatur bezogen auf die Position ihrer Cysteinreste: CC-Subfamilie; CXC-Subfamilie, C-Subfamilie und CX3C Subfamilie [3].

1.4 Immunologische Tumor-Wirt-Beziehung

1.4.1 Reaktion des Immunsystems auf Tumorzellen (Immun-Editing)

Viele Studien und Metaanalysen haben in der Vergangenheit gezeigt, dass sowohl das unspezifische als auch das spezifische Immunsystem eine Schlüsselrolle im Kampf gegen Tumorzellwachstum und Tumorentstehung einnimmt [24-26]. Experimente mit Mäusen in den 1950er Jahren, bei denen mittels chemischer Karzinogene, oder durch Bestrahlung Tumoren induziert wurden, führten zur Erkenntnis, dass Mäuse eine schützende Immunantwort gegen Tumore entwickeln können. In diesen Versuchen wurde ein endogener Tumor von einer Maus in eine zweite Maus transplantiert und anschließend beobachtet, dass das Immunsystem

der zweiten Maus die Tumorzellen zerstörte, weil es die auf der Tumorzelloberfläche präsentierten Antigene der ersten Maus über MHC-I-Moleküle als fremd erkannte [27]. Inzwischen ist bekannt, dass bestimmte Tumore bis zu 100mal stärker in immunsupprimierten Menschen wachsen als in Menschen mit einem normal funktionierenden Immunsystem. Beim kolorektalen Karzinom konnte zudem eine positive Korrelation von Anwesenheit tumorinfiltrierender T-Lymphozyten und dem mittleren Überleben der Patienten gezeigt werden [22]. Somit hat auch das menschliche Immunsystem einen entscheidenden Einfluss auf das Tumorwachstum. Strukturell veränderte Proteine, die von Tumorzellen exprimiert und durch diese präsentiert werden, können von unserem Immunsystem als sogenannte tumorassoziierte Antigene (TAA) erkannt werden. Die Hauptaufgabe des Immunsystems ist es nun, Zellen mit diesen TAA zu eliminieren. Ein progredienter Tumor könnte demnach also auch auf einen Immundefekt zurückzuführen sein. Diese Hypothese hat Paul Ehrlich erstmals im Jahre 1900 formuliert, bis sie viele Jahre später von Mac Farlane Burnet als „immune surveillance“ definiert wurde [28, 29] und heute als Theorie der Immunüberwachung von Tumoren angesehen wird. Basierend auf diesen Erkenntnissen und zahlreichen weiteren experimentellen Untersuchungen wurde diese Theorie Anfang des 21. Jahrhunderts von Schreiber um den Begriff des „cancer immunoediting“ erweitert [25, 30].

Immun-Editing bezeichnet heute die Reaktion unseres Immunsystems auf Tumorzellen und kann, wie in Abbildung 1 dargestellt, in drei Phasen unterteilt werden: Eliminierungsphase (engl. *immune surveillance*), Gleichgewichtsphase (engl. *immune equilibrium*) und Entkommensphase (engl. *immune escape*) [31].

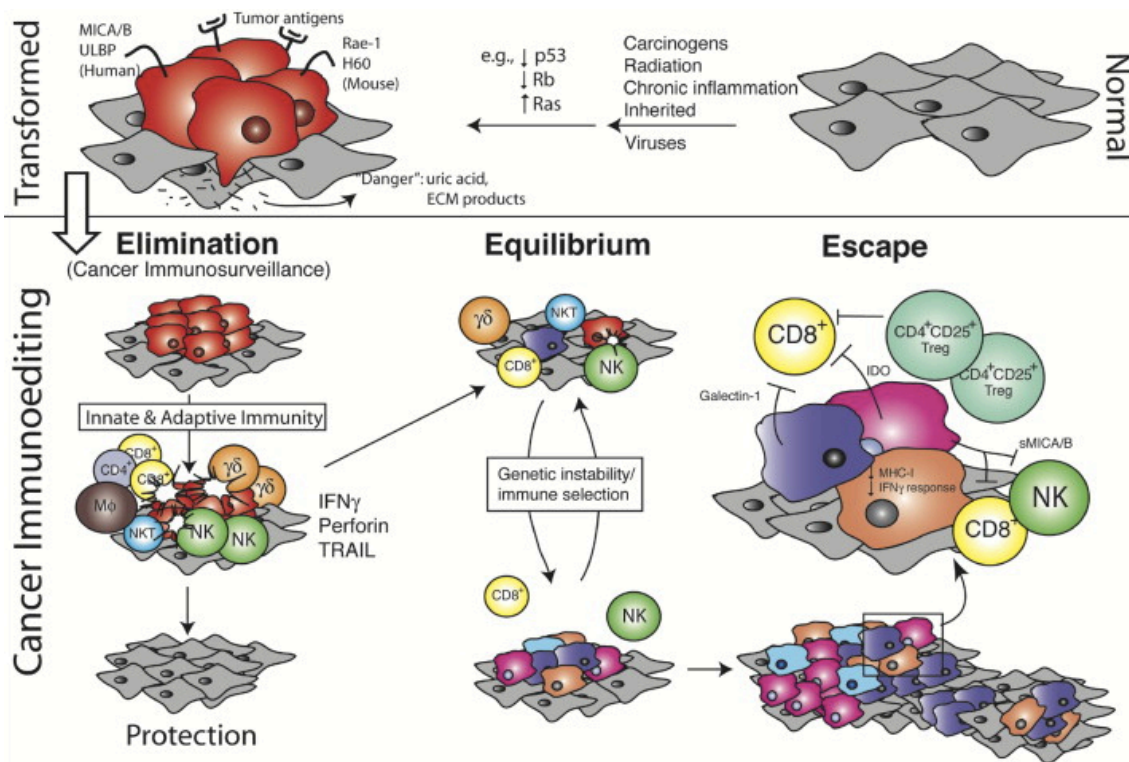


Abb. 1: Die drei Phasen der Immunreaktion bei einer Krebserkrankung: adaptiert nach [31]: Eliminierungsphase (Links) mit ihren typischen Hauptakteuren des angeborenen und erworbenen Immunsystems, die entartete Zellen angreifen und zerstören. In der Gleichgewichtsphase (Mitte) mutieren die Angriffspunkte der nicht-zerstörten Tumorzellen, motiviert durch den vom Immunsystem ausgehenden Selektionsdruck um so ihr weiteres Überleben über diese Phase hinaus zu sichern. Der Vorgang des Immun-Editing wird abgeschlossen durch die Entkommensphase (rechts), in der die entarteten Zellen die Fähigkeit der Immunevasion (engl. *immun escape*) erlangt haben.

In der Eliminierungsphase werden entartete Zellen sowohl durch das unspezifische als auch durch das spezifische Immunsystem erkannt und zerstört. In der Gleichgewichtsphase bleiben resistente Tumorzellen übrig, die durch Mutationen dem Immunsystem entkommen konnten. In der anschließenden Entkommensphase haben die Tumorzellen aufgrund ihrer Mutationen die Fähigkeit, dem Immunsystem zu entkommen, sodass sie sich ungehindert vermehren können [31].

Diese letzte Phase, in der die Tumorzellen dem Immunsystem entkommen, wird in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

1.4.2 Mechanismen der Immunevasion bei Tumoren

Die sog. Immunevasion (engl. *immune escape*) ist eine mögliche Erklärung dafür, warum Tumorzellen, die als immunogen identifiziert wurden, trotzdem nicht von Immunzellen eliminiert werden. Man unterscheidet antigenspezifische von nicht-antigenspezifischen Tumorescape-Mechanismen [32]. Um unseren anti-kanzerinogenen Immunzellen zu entkommen, bedient sich der Tumor oft unspezifischer Zell-vermittelter Abwehrstrategien. Dazu zählt die Aktivierung immunsupprimierender TREGs. Zu seinen humoralen Abwehrstrategien gehört außerdem die Produktion solubler immunsupprimierender Zytokine wie TGF β , VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) oder IL-10. Außerdem gibt es Tumorzellen, die durch die Produktion von apoptotischen Stoffen wie den FasLiganden (CD95L) die Apoptose von aktivierten T-Zellen, die auf ihrer Zelloberfläche den passenden CD95-Rezeptor tragen, einleiten können [21]. Weil hierdurch die anti-kanzerinogenen CTL abgetötet werden, nennt man diesen Prozess auch „Tumor counterattack“. Die entarteten Zellen können aber nicht nur der Eliminierung über den zytotoxischen Weg via Todesrezeptoren durch die T-Effektorzellen entgehen, indem sie die CD95 Expression herunterregulieren, sondern auch ihrer Eliminierung über den Weg der granulozytären Zytotoxizität. So sind manche Tumorzellen in der Lage, diese solublen Stoffe aus der zytotoxischen Granula der T-Effektorzellen mit Hilfe eines Serinprotease-Inhibitors zu eliminieren [21]. Zudem besitzen viele Tumorzellen die Fähigkeit, Faktoren zu sezernieren, die eine physikalische Barriere gegen das menschliche Immunsystem bilden wie z. B. Kollagen [4]. Wichtige Beispiele für die antigenspezifische Abwehr sind das Entfernen tumorspezifischer Antigene (zB durch Endozytose), dem sogenannten Antigen-shedding, oder auch die Herunterregulierung von MHC-I-Molekülen oder kostimulierenden Molekülen, die zur Aktivierung naiver T-Zellen nötig sind [33]. Eine komplette MHC-I-Herunterregulierung würde jedoch die Tumorzelle wieder für den Angriff durch NK-Zellen prädestinieren, sodass viele Tumorzellen gleichzeitig sog. MHC-Surrogate exprimieren [21].

1.4.3 Rolle der Inflammation auf Tumorentstehung und Tumorprogression

Das Immunsystem operiert nicht nur, wie geschildert, im Sinne einer Abwehr vor körperfremden Substanzen oder entarteter Zellen, sondern es kann auch zur Entstehung von Krebs beitragen [34]. Rudolf Virchow postulierte erstmals im 19. Jahrhundert einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von chronischen Entzündungen und Tumoren. Heute ist die Schlüsselrolle von Entzündungszellen in der Tumorentstehung und im Tumorwachstum allgemein bekannt. Man vermutet, dass ein entzündliches Milieu im Rahmen der Immunabwehr durch die freigesetzten Sauerstoffradikale und anderer zelltoxischer Stoffe erbgutschädigend wirkt. Es besitzt aber nicht nur Einfluss auf die Tumorentstehung, sondern auch auf die Tumorprogression. So sezernieren Tumorzellen viele inflammatorische Botenstoffe, ähnlich der Situation nach Gewebsverletzungen, um den Heilungsprozess zu fördern. Diese Substanzen regen die Gefäß- und Gewebsbildung an und schaffen somit einen geeigneten Nährboden für die Ausbreitung der Tumorzellen. Dieser schmale Grat zwischen pro-kanzerinogenen und anti-kanzerinogenen Immunreaktionen bzw. Entzündungsreaktionen in unserem Körper muss täglich von unserem Immunsystem bewältigt werden. Von welchen Immunzellen und Immunmodulatoren diese immunologische Homöostase abhängt, wird in der Veröffentlichung von Powrie und Maloy 2013 in der Fachzeitschrift Science deutlich [34]. Sie postulierten in Bezug auf das kolorektale Karzinom (KRK), dass das Entstehungsrisiko dann am größten ist, wenn das Gleichgewicht der Aktivitäten von TREGs, Darmbakterien und der unspezifischen Immunabwehr gestört ist. Die molekulare Schlüsselrolle im Zusammenspiel von chronischer Entzündung durch Autoimmunreaktionen oder bakteriellen Infekten und Tumorentstehung war lange ungeklärt, bis sie u.a. dem $TNF\alpha$, dem IL-6 und dem nukleären Transkriptionsfaktor NkFB zugeschrieben wurde [35]. So kann ein schlecht reguliertes inflammatorisches Milieu mit hoher Konzentration an IL-6 über die Differenzierung der TREGs in pro-inflammatorische TH17-Helferzellen in ein pro-karzinogenes Milieu übergehen. Dieser Zustand ist

reversibel und kann durch Immunsuppression oder Herunterregulation von IL-6 wieder rückgängig gemacht werden. Außerdem konnte die Forschungsgruppe um Horwitz zeigen, dass die Neutralisation von TNF α die Remission eines KRK verbessert [36]. So verwundert es nicht, dass ein Zusammenhang zwischen der Einnahme entzündungshemmender NSAIDS (engl. *non-steroidal antiinflammatory drugs*) und dem verminderten Auftreten von sporadischen und nicht-sporadischen KRK besteht [37].

Der paradoxe Sachverhalt, dass chronische Entzündungen, beispielsweise verursacht durch bakterielle Infektionen, zur Tumorentstehung beitragen und Menschen in Entwicklungsländern mit niedrigen hygienischen Standards dennoch weniger KRK entwickeln, könnte folgendermaßen erklärt werden: Das kindliche Immunsystem wird durch die frühe Konfrontation mit unterschiedlichen Bakterien im Darm trainiert und kann so die IL-10- und TREG-abhängige inhibitorische Antwort auf chronische Entzündungen perfektionieren. So zeigen Individuen mit einem naiveren Immunsystem und daraus resultierender schwächeren IL-10 und TREG-abhängiger Immunsuppression einen höheren unkontrollierbaren Anstieg von IL-6 und IL-17, der mit einem vermehrten Auftreten von entzündungsbedingter Tumor assoziiert ist [34].

Diesen tumorprotektiven Effekt bestimmter Mikroorganismen hat man erfolgreich auf die Behandlung eines Urothelkarzinoms projizieren können [38]. Bei dieser Therapieform geht es um eine Rezidivprophylaxe mit attenuierten Bacillus-Calmette-Guerin(BCG)-Präparaten nach Resektion oberflächlich wachsender Blasenkarzinome. Durch das mehrfache Spritzen der künstlich attenuierten Mykobakterien direkt in die Umgebung des Resektionsortes, wird das Risiko für Tumorrezidive um bis zu 50 Prozent gesenkt. Verantwortlich für das Minimieren des Rezidivrisikos und die Verlängerung der Überlebensrate der Patienten ist die lokale BCG-induzierte TH1-vermittelte Immunantwort. Aufgrund der künstlich herbeigeführten Entzündung migrieren Immunzellen (Granulozyten, Makrophagen und T-Helferzellen) ins Gewebe. Freigesetzte Zytokine wie IL-2, IL-12, IFN γ und TNF α aktivieren im Rahmen der Reaktion auf die BCG-Konfrontation NK-Zellen und CTL, welche die Tumorentstehung und Tumorprogression verhindern. TNF α und IFN γ sind Schlüsselzytokine für die TH1- und TH17-vermittelte adaptive

Immunantwort und sind mit einem verbesserten klinischen Ausgang assoziiert. Zusätzlich erhöhen die BCG-Antigene die Anzahl an CD56⁺-APC, sodass wiederum vermehrt CD56⁺-NK-Zellen zur IFN γ - und TNF α -Produktion angeregt werden [38, 39].

Über Liganden, die an Chemokin-Rezeptoren wie CCR6 und CXCR3 binden, initiieren TH1 und TH17 ihre Einwanderung in entzündetes Gewebe [40].

1.5 Tissue Engineering – Vergleich zwei- und dreidimensionaler Zellkulturen

Im Fokus der Forschung an dem Lehrstuhl Tissue Engineering Würzburg, sind die präklinische Testung von regenerativen Therapien, aufbauend auf autologen Stammzellen wie MSC (engl. *mesenchymal stem cells*) oder Matrix-basierten Ansätzen, sowie das Tissue Engineering von humanen Gewebemodellen als Alternativen zu Tiermodellen. Durch die Kombination von Trägerstrukturentwicklung und Zellkulturtechniken werden humane Modelle generiert, die sowohl gesundes als auch erkranktes Gewebe abbilden. Weiterhin werden in vitro Erkrankungs- sowie Infektions- und Immunmechanismen am humanen Gewebemodell studiert, um basierend auf den Ergebnissen regenerative Therapien und neuen Medikamente und Impfstoffe zu entwickeln. Um möglichst viele dieser physiologischen dreidimensionalen (3D) Modelle zu entwickeln, ist es wichtig, die natürliche in-vivo Umgebung der Zellen zu simulieren. Sie besitzen somit durch die sehr viel komplexere histologische Struktur im Vergleich zu den zweidimensionalen Monolayer-Systemen eine höhere Aussagekraft, bieten eine bessere Vergleichbarkeit mit Tumorsystemen in lebenden Organismen und mindern die experimentelle Fehlinterpretationsraten im Vergleich zu 2D-Modellen, weshalb wir in unseren Experimenten auch den Vergleich beider Systeme einfließen lassen [41-43]. Aufgrund ihres unphysiologisch hohen Proliferationsindex (häufig 80 % bis 90 %) führen 2D-Modelle im Allgemeinen zu einer Überschätzung beispielsweise der zytostatischen Effekte [44].

Mit der Entwicklung des Tissue Engineering und der Verwendung biokompatibler

Trägerstrukturen für Zellen in Zellkultur in den 1980er Jahren durch Dr. Vacanti und Dr. Langer [45] ist man bestrebt, die gewonnenen Erkenntnisse zu nutzen, um humane Testsysteme für Tumore zu entwickeln [46], die der in vivo-Situation ähneln. Sie können einen entscheidenden Beitrag zur Verbesserung individualisierter Therapien und Immunotherapien leisten [47].

Stimuli, wie direkter Zell-Zell Kontakt oder der Kontakt zur extrazellulären Matrix (engl. *extracellular matrix*, ECM) und zu Fibroblasten [48], beeinflussen erst im Gewebeverbund durch adhäsionsvermittelte Signaltransduktion ihre vielfältigen Wirkungen auf die Differenzierungsvorgänge, auf den Metabolismus und auf das Migrationsverhalten der Tumorzelle [49]. Die ECM bildet ein Reservoir an Makromolekülen und Wachstumsfaktoren, welche unter anderem von Fibroblasten gebildet werden und im Gewebe Gradienten bilden können [50]. So wurden bereits zahlreiche Versuche unternommen, 3D Zellkultursysteme zu entwickeln, die die Simulation eines Gewebes mit all seinen biophysikalischen Reizen und Signalmolekülen möglich machen [47]. Verbesserte In-vitro-Modelle könnten die Anzahl der Tiere, die für die Grundlagenforschung, die präklinische Forschung sowie die translationale Forschung verwendet werden, drastisch reduzieren.

Bereits etablierte 3D-Modelle sind beispielsweise bioartifizielle Gewebe oder Gewebestücke von Ösophagus, Herz oder Darm, die auf einer biokompatiblen azellularisierten Trägerstruktur basieren [46, 47].

Spheroide

Das am weitesten verbreiteste 3D-Zellkulturmodell ist die Spheroidkultur. Spheroide stellen nicht-adhärenente Zellagglomerate dar. So können viele verschiedene Tumorzelllinien auf unterschiedlichste Art und Weise durch die Ausbildung dieser Spheroide kultiviert und analysiert werden. Innerhalb des dreidimensionalen Zellkonstruktes eines Spheroids können zellspezifische Mikroumgebungsmilieus kreiert werden [51, 52]. Beispiele für diese Methoden Spheroide von Durchmessern zwischen 20µm und 1mm zu generieren, sind 1) sogenannte Hanging-Drop Kulturen [53], 2) der Gebrauch von Mikrofluidchips [54] und 3) nicht-adhärenente Kulturen auf mit Agarose beschichteten

Mikrotiterplatten (*engl. agarose-coated plates*) [55]. In Experimenten mit Spheroïden aus Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass die Tumorzellen im Spheroïd, im Gegensatz zu Monolayer-Zellkulturen, von einem sauren, sauerstoffarmen Milieu und extrazellulären Strukturen umgeben sind, wie sie typisch für Tumorzellen im lebenden Organismus sind. Durch den niedrigen pH-Wert, die Anwesenheit von IL-6 und M-CSF (*engl. macrophage colony-stimulating factor*) und den Sauerstoffgradienten mit einer großen Differenz zwischen dem Inneren des Spheroïds und der äußeren Umgebung wird die Differenzierung von nicht-aktivierten zu aktivierten Makrophagen und die Zytokinproduktion von dendritischen Zellen (*engl. dendritic cells, DC*) gehemmt, die maßgeblich an der Immunabwehr des Tumors beteiligt sind. Der niedrige Sauerstoffgehalt im Inneren eines Tumors bzw. im Inneren des Spheroïds bedingt eine Hochregulierung der Genexpression von VEGF, dem Glukosetransporter sowie von Glykolyseenzymen wie der Lactatdehydrogenase [56] und hat eine erhöhte Produktion von immunsuppressivem IFN γ durch Makrophagen und DC zur Folge [57]. Diese Ergebnisse zeigen, wie wichtig es ist, dreidimensionale Testsysteme zu entwickeln, um valide Aussagen über die Tumorzellbiologie zu erhalten. Trotzdem ist das Modell der mikrozellulären Spheroïde sehr limitiert. Ein bedeutender Nachteil liegt darin begründet, dass die Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff oder der Transport von Arzneistoffen ins Innere des Spheroïds aufgrund der hohen Distanz nicht möglich ist, da Diffusion nur über eine Strecke von 0,2 mm erfolgt. Außerdem ist sowohl die Größe als auch die Proliferationsgeschwindigkeit der enthaltenen Zellen in einer Spheroïd- Zellkultur sehr variabel, sodass das Generieren reproduzierbarer Ergebnisse nicht immer gelingt. Sie eignen sich daher überwiegend für einfache Hochdurchsatz-Screenings (*engl. high-throughput-screening*) in der Arzneistoffforschung und weniger für Grundlagenforschung in architektonisch komplizierten Geweben wie Tumoren [49].

Scaffolds

Eine weitere Methode, 3D-Zellkulturen aufzubauen, ist die Verwendung von Scaffolds (eher hart) bzw. Matrizen (eher weich). Diese sog. Matrizen, die den Zellen eine Struktur vorgeben, auf der sie sich ansiedeln können, sind vergleichbar

mit der ECM im lebenden Organismus. Solche Matrizen können aus biosynthetischen Membranen oder aus biologischen oder artifiziellen Komponenten aufgebaut sein. Biologische Scaffolds bestehen oft aus tierischem azellularisiertem Gewebe und können entweder statisch oder dynamisch kultiviert und untersucht werden [41, 47]. Da die einzelnen Bestandteile der ECM speziesübergreifend hoch konserviert sind [58], gibt es bisher nur selten Abstoßungsreaktionen bei der Implantation in den lebenden Organismus.

Der wichtigste Vorteil von Scaffolds gegenüber Hydrogelen oder Spheroïden ist die Möglichkeit, mechanische und chemische Gegebenheiten innerhalb des Systems leichter und schneller zu verändern [59, 60]. Diesen Systemen fehlen zwar für den intrinsischen Signalweg wichtige Schlüssel-moleküle, dennoch besteht die Möglichkeit das zellumgebende Medium durch die Zugabe unterschiedlicher Substanzen und Zellen zu modifizieren und zu kontrollieren [61].

1.6 Kolorektales Karzinom

Das KKR zählt zu den häufigsten Tumoren in den westlichen Industrienationen. Es ist auf der vom Robert Koch Institut veröffentlichten Liste der Krebs-häufigkeiten das zweithäufigste Karzinom der Frau und das dritthäufigste Karzinom des Mannes. Dabei beträgt die relative 5-Jahres-Überlebensrate durchschnittlich 62,5 % [62]. Es werden etwa 10 % der Diagnosen vor dem 55. Lebensjahr gestellt. Das Durchschnittsrisiko eines Deutschen an einem KKR zu erkranken liegt bei 5 % und daran zu sterben bei 2,8 % [63]. Die Lokalisationshäufigkeit des KKR steigt von proximal nach distal an.

Die Ätiologie von KKR ist noch nicht eindeutig geklärt. Heute wird eine Kombination aus endogenen und exogenen Risikofaktoren diskutiert. Hierzu zählen Alter, Ernährungs- und Lebensstil, prädisponierende chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis ulzerosa und Morbus Crohn, kolorektale Adenome oder Diabetes mellitus Typ 2 [64]. Genetische prädisponierende Faktoren sind anamnestisch kolorektale Karzinome in der Familie, familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC) [65]. Meist entwickelt sich das KKR über

gutartige Vorstufen, den sog. Polypen, deren Zellen über einen Zeitraum von meist mehreren Jahren verschiedene Mutationen erwerben. Dieses molekularbiologische Modell nennt man Adenom-Karzinom-Sequenz nach Fearon und Vogelstein. Es gibt derzeit Untersuchungen, die die Vermutung nahe legen, dass nicht nur genetische Veränderungen prädisponierend wirken, sondern auch epigenetische Faktoren [65].

Zu den wichtigsten diagnostischen Mitteln zählen die digital-rektalen Untersuchungen und die bildgebenden Verfahren, vor allem die Koloskopie. Bei Nachweis eines KRK wird ein Staging durchgeführt, sodass die TNM Klassifikation bzw. die Einteilung in UICC (franz. Union Internationale Contre le Cancer)-Stadien vorgenommen werden kann [66]. Diese Klassifikation ist sehr bedeutend für die richtige Auswahl der Therapie und für eine valide prognostische Aussage. 95 % der Karzinome sind Adenokarzinome.

In den letzten Jahren haben sich die Erfolge der vielen Therapieansätze des KRK erheblich verbessert. So hat sich je nach TNM Stadium und Lokalisation des Tumors eine multimodale Therapie aus operativer Entfernung und adjuvanter Chemotherapie oder aus neoadjuvanter Radiatio, operativer Entfernung und adjuvanter Chemotherapie etabliert [67].

1.7 Rationale, Fragestellung und Zielsetzung

1.7.1 Rationale

Viele Studien und Metaanalysen haben in der Vergangenheit gezeigt, dass das unspezifische und das spezifische Immunsystem eine Schlüsselrolle im Kampf des lebenden Organismus gegen die Entstehung und das Wachstum von KRK einnehmen. Wenn es gelingt, diese immunologischen Vorgänge besser zu verstehen, ist es vielleicht nicht nur möglich diese Karzinome früher zu diagnostizieren und prognostisch validere Aussagen zu treffen, sondern auch, bessere individualisierte Therapiestrategien zu entwickeln. Um die immunologisch beeinflussten, kolorektalen Zellen vor und nach der Konfrontation mit

Immunzellen in vitro zu untersuchen, werden 3D-Zellkulturmodelle eingesetzt, die die in vivo Situation realitätsnäher abbilden als die geläufigen zweidimensionalen Tumortestsysteme [41, 47, 68]. Ein etabliertes dreidimensionales Tumortestsystem könnte nicht nur den Verlauf der Krebserkrankung des Patienten durch das bessere Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge und durch die Etablierung neuer Therapieverfahren verbessern, sondern auch durch die höhere klinische Relevanz dabei helfen, die Anzahl der in vivo Tierversuche zu minimieren [47, 69]. Es hat sich gezeigt, dass auch die Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse aus humanen Testsystemen auf die in vivo Situation im Organismus Mensch besser ist als dies bei Tierversuchen möglich ist [47, 70]. Schwerwiegende Einschränkungen gelten auch für das Testen von Immuntherapeutika in humanisierten Tiermodellen: Abgesehen von den enormen Kosten und dem enormen Aufwand führen speziesspezifische Unterschiede von Zytokinen typischerweise zu einer beeinträchtigten Reifung und Differenzierung bestimmter menschlicher Immunzell-Untergruppen in einer Maus-Mikroumgebung [71]. Die Überwachung der immunvermittelten Tumorkontrolle in einem prädiktiven, vollständig menschlichen In-vitro-System wird somit die präklinische Forschung erheblich vorantreiben können.

Obwohl dies schon lange bekannt ist, gibt es keine genaue Untersuchung, die die Reaktion von kolorektalen Karzinomzellen (mit und ohne Kultivierung von Gewebszellen) auf Immunzellen im zweidimensionalen System mit dem dreidimensionalen System vergleicht und gleichzeitig versucht, die immunologische Reaktion näher zu charakterisieren. Für die Experimente zur Untersuchung der Interaktion zwischen Krebszellen und Immunzellen, wurden SW480-Zellen und PBMC verwendet. Bei den SW480-Zellen handelt es sich um kommerziell erhältliche Zellen einer Kolonkarzinomzelllinie, isoliert aus einem 50-jährigen Patienten, die seitdem unter standardisierten Bedingungen weiter kultiviert wurden.

1.7.2 Fragestellung und Zielsetzung

Fragestellung

Als zentrale Frage wurde in vorliegender Arbeit untersucht, ob ein 2D- bzw. ein 3D-Kokultursystem von kolorektalen SW480 Zellen und PBMC mit und ohne Fibroblasten geeignet ist, die Mechanismen der T-zellulären Zytotoxizität gegen kolorektale Karzinomzellen und die Mechanismen der Tumorevasion zu untersuchen.

Zielsetzung

Zur Beantwortung meiner Frage wurden für meine Dissertation folgende Ziele formuliert:

1. Entwicklung eines 2D- und parallel dazu eines 3D-Tumortestsystems, zum Vergleich. Folgende Ansätze wurden untersucht:

- *Kokultivierung der kolorektalen SW480-Zellen im 2D- und im 3D-System mit und ohne Fibroblasten und zusätzlich mit einer unterschiedlich großen Anzahl an PBMC.*

Hier sollte für 2D und 3D die Grundapoptoserate der SW480-Zellen bestimmt werden, um zu zeigen, dass nicht autologe Immunzellen verwendet werden müssen, um ein Modell mit zusätzlicher Immunkomponente zu entwickeln. Deshalb wurde die Apoptose-Rate, der durch mit diesen allogenen PBMC kultivierten Tumorzellen (SW480) ermittelt. Das Modell wurde bereits als Kokultur mit Fibroblasten als modular erweitertes Modell mit stromaler Komponente etabliert [41] und als solches ebenso für die Ermittlung der Apoptose-Baseline herangezogen.

- *Kultivierung der kolorektalen SW480-Zellen mit und ohne Fibroblasten im 3D-System mit unterschiedlich hohen PBMC-Konzentrationen und*

Bestimmung der Apoptose-Baseline der SW480-Zellen.

2. Darstellung von Unterschiede des 2D- und 3D-Systems bezogen auf die Zell-Zell-Kontakte

- *Immunhistologische Fluoreszenzfärbung der eingewanderten Zellen im 3D-System mittels Vimentin (Fibroblasten) und Pan-Zytokeratin (SW480-Zellen).*

3. Charakterisierung der angewandten Tumorabwehrstrategie der PBMC

- *Beantwortung der Frage: Sind es soluble Substanzen oder Zellen, die für die Induktion der Apoptose der SW480-Zellen im 3D-System verantwortlich sind?*
Hierzu nimmt man den durch die PBMC aktivierten Zellkultur-Überstand der SW480-Zellen im 2D-System (=konditioniertes zellfreies Medium mit solublen Stoffen) ab, befreit ihn von Zellen und Zellresten und gibt ihn zusammen mit frischem Medium anschließend auf SW480-Zellen im 2D-System und 3D-System. So kann man testen, ob dieses aktivierte zellfreie Tumorumgebungsmilieu in der Lage ist, in ähnlicher Weise die Apoptoserate der SW480-Zellen zu steigern wie die naiven, nicht konditionierten PBMC. Nach Betrachtung der im Kapitel 3.5 (2D) und im Kapitel 3.6 (3D) aufgeführten Ergebnisse der Experimente 2.10.8.7 (2D) und 2.10.8.8 (3D) muss man schlussfolgern, dass im 2D-System keine Apoptose durch soluble Stoffe induziert werden konnte, ganz im Gegensatz zum 3D-System.
- *Vergleich der Konzentrationen von TNF α und IFN γ (nach Konfrontation der PBMC mit SW480-Zellen im 2D-System) mit und ohne Konfrontation mit SW480-Zellen im 3D-System.*

Durch die Tatsache, dass im 2D-System keine Apoptose durch soluble Stoffe induziert werden kann und im 3D-System Apoptose induziert werden kann, stellt sich die Frage, welche solublen Stoffe wie z.B. Zytokine bei der Induktion der Apoptose der SW480-Zellen eine große Rolle spielen könnten und ob man dann einen Rückschluss auf die Art und Weise (spezifisches oder unspezifisches Immunsystem) der Apoptoseinduktion der

Tumorzellen schließen kann: Entweder das unspezifische Immunsystem über die Makrophagen (in der PBMC Population heißen sie Monozyten) und die NK-Zellen oder das spezifische Immunsystem über die TIL und CTL. Beide Zytokine (TNF α und IFNY) sind ganz entscheidend als Schlüsselzytokine für die Funktionen sowohl der Makrophagen und NK-Zellen als auch der CTL beteiligt. Sie werden also als Schlüsselzytokine zwischen adaptiver und angeborener Immunabwehr verstanden. TNF α und IFNY sind beide sehr bekannte und viel erforschte Zytokine, welche von PBMC sowohl in vivo als auch in vitro produziert werden und eine antitumorale Aktivität aufweisen. Deshalb lag es nahe, diese zwei Zytokine zu messen um herauszufinden, ob sie an der Apoptoseinduktion der SW480-Zellen durch die PBMC in vitro beteiligt sein könnten [24, 72]. Da wie bereits beschrieben TNF α bei Apoptose der Tumorzellen freigesetzt wird, ob sie nun durch den spezifischen oder unspezifischen Weg induziert wurde und IFNY zwar zumindest am Anfang eher dem unspezifischem System zugeschrieben werden kann, später jedoch auch eine wichtige Rolle im spezifischen System spielt, wird es schwierig anhand der beiden Zytokine sich endgültig auf einen Weg festzulegen. Vielmehr geben sie einen ersten Anhaltspunkt und somit war es erst einmal in einem ersten Schritt interessant herauszufinden, ob es einen Unterschied der Zytokin-Konzentrationen gibt wenn man das konditionierte zellfreie soluble Medium mit Tumorzellen konfrontiert oder nicht. Also anders formuliert: Spielen TNF α und IFNY eine Rolle bei der Apoptoseinduktion der SW480-Zellen im 3D-System durch das konditionierte zellfreie Medium?

2. Material und Methoden

In dem folgenden Kapitel werden alle in der Arbeit verwendeten Materialien tabellarisch mit Hersteller und Lotnummer aufgelistet, sowie die angewandten experimentellen Methoden ausführlich beschrieben.

2.1 Material

Tabelle 1 zeigt eine vollständige Auflistung aller Materialien, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 1: Auflistung verwendeter Materialien mit Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Chamberslides Permax/Glas	Nunx, Wiesbaden, Deutschland
Deckgläser 24x60 mm	A.Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Edelstahlgießformen	Labonord, Mönchengladbach, Deutschland
Einbettfilterpapier	Labonord, Mönchengladbach, Deutschland
Einbettkassetten	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Einfrierbehälter	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Einhängethermostat für Wasserbad	Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland
Einmalpipetten (5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Nerb plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
Einmalpipetten aus Polysterol (5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Frosty Box	Nalgene, Rochester, USA
Glaswaren	Schott, Mainz, Deutschland
Glaspipette (5ml, 10ml, 25ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Handschuhe Nitril	Kimberly-Clark, Koblenz Rheinhafen, Deutschland
Handzähler	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Kryoröhrchen	Faust Lab Science GmbH, Klettgau, Deutschland
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Magnetrührstäbchen	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrotiterplatte 6/12 Well, transparent	TPP, Trasadingen, Deutschland
Mikrotim Einmalklingen, Typ A35	Pfm medical, Köln, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Objektträger aus Glas	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Petrischalen (Ø 10 cm, Ø 15 cm)	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

Petrischalen mit Glasboden	World Precision Instruments, Inc., Berlin, Deutschland
Pinzetten	A.Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	nerb plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Pipettenspitzen steril (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pumpschlauch	Ismatec/Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Silikonschläuche	Saint-Gobain, Aachen, Deutschland
Skalpellschalenhalter	Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Skalpellschalen	Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Well-Platte	Faust Lab Science GmbH, Klettgau, Deutschland
Zellkulturflaschen (T75, T150)	Faust Lab Science GmbH, Klettgau, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland

2.2 Geräte

Tabelle 2 zeigt eine vollständige Auflistung aller Geräte, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 2: Auflistung verwendeter Geräte mit Hersteller

Bezeichnung	Hersteller	
Absaugereinrichtung Vacusafe	Integra Bioscience, Fernwald, Deutschland	
Abzug	Prutscher, Neudörfel, Deutschland	
Autoklav	Biomedics Systec, Giessein, Deutschland	
Brutschrank	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland	
Blockstation	Leica, Wetzlar, Deutschland	
Dampfgerät	Braun, Kronberg/Taunus, Deutschland	
Einbettautomat	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland	
Eismaschine AF-80	Scotsman/HIBU, Sprockhövel, Deutschland	
Fluoreszenz-Mikroskop BZ-9000	Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland	
Gefrierschrank	Comfort -20°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
	Hera Freeze -80°C	Thermo Fisher, Langenselbold, Deutschland Kendro, München, Deutschland
Glaspipettenreinigungsautomat	Hözel, Hörlkofen, Deutschland	
Heißluftsterilisator	Memmert Heraeus, Hanau, Deutschland	
Kurzzeitmesser	Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	
Magnetischer Heizrührer	VWR International GmbH, Darmstadt,	

		Deutschland
Mikroskop	Phase Contrast LWD o52	Nikon, Tokio, Japan
	Axiovert 40 C	Zeiss, Göttingen, Deutschland
	Axio Observer D1	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Multimode-Mikroplatten Photometer Sunrise		Tecan, Männedorf, Schweiz
Multistep-Pipette (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)		Brand, Wertheim, Deutschland
Multistep-Pipette (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)		Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multistep Pipette (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)		Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer		Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Photometer Infinite 200		Tecan, Männedorf, Schweiz
Rasterelektronenmikroskop DSM940		Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Schlittenmikrotom		Leica, Wetzlar, Deutschland
Spiegelreflexkamera EOS 1000D		Canon, Krefeld, Deutschland
Sterilwerkbank	Gelaire BSBS 6A	Flow Laboratories GmbH, Meckenheim, Deutschland
	Rotarix GZE 8C8	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Trockenschrank		Memmert Heraeus, Hanau, Deutschland
Vortexer (RetschMixer)		Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Waage	Analysenwaage	Kern, Balingen-Frommern, Deutschland
	Präzisionswaage	
Wasserbad		Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland
Wasserbad für Paraffinschnitte		Medax, Kiel, Deutschland
Zentrifuge	Universal 32R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
	Rotanta/K	
	Rotixal/P	
	Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
	Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Zentrifuge 5424 C	
	Cytospin 4	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland

2.3 Chemikalien

Tabelle 3 zeigt eine vollständige Auflistung aller Chemikalien, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 3: Auflistung verwendeter Chemikalien mit Hersteller und Lotnummer

Chemikalien	Hersteller	LotNr.
DAPI	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland	13100801-022M4004V
DMEM	Sigma-Aldrich GmbH,	G000111-0121

	München, Deutschland	
DMSO	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland	D2438-50ML
Ethanol (96 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	T171.2
KCl	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland	1.04936.1000
Kaliumhydrogenphosphat	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland	1.04873.1000
NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	HN00.3
Na-EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland	A3813,0500
Natriumhydrogenphosphat	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland	1.06580.1000
Na-Pyruvat	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland	R5345-50ML
Paraffin Roti-Plast	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	6642.6
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	31000997 7T004466
Tryptanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich GmbH, Karlsruhe, Deutschland	T8154-100ML
Trypsin	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland	18912-014
Trypsin-EDTA (10x)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	15400-054
Tween-20	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland	P1379
VE H2O	UKW-LTERM, Würzburg, Deutschland	-
Xylol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	9713.3

2.4 Puffer und Medien

Tabelle 4 zeigt eine vollständige Auflistung aller Puffer und Medien, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 4: Auflistung verwendeter Puffer und Medien mit Hersteller und Lotnummer

	Handelsname	Hersteller	LotNr.
Pufferlösungen	Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P-9144
			RNBD6341
			RNBD8505
			RNBD4081
			RNBD0647
			RNBD3332

	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	E-5134
	Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	D8418-50ML
	Lyse-Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	1322071
Nährmedium	RPMI 1640 + GlutaMax-I	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	R8758
		GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, USA	1695248
			1644906
			1712287
			1644401
	FCS (Fetales Kälber Serum)	GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, USA	10270-106
			BS 196368
			BS210601.5
	DMEM	GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, USA	1634508
			1617357
FicoL	FicoLite-H (Human)	Linaris, Dossenheim, Deutschland	151122P
	Aqua ad iniectabilia	B. Braun, Melsungen Deutschland	114558061
	Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland	14FA1014

2.5 Antikörper

Tabelle 5 zeigt eine vollständige Auflistung aller Antikörper, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 5: Auflistung verwendeter Antikörper mit Hersteller und Lotnummer

	Bezeichnung	Hersteller	LotNr.
M30-ELISA	Standard Zero	Peviva/Diapharma Group, West Chester, USA	P-RS 1152
	Standard Low		P-RS 3610
	Standard Medium		P-RS 3611
	Standard High		P-RS 3612
TNF α -ELISA	Standard Human TNF α	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland	E08250-1643
	Capture Antikörper		E05527-1636
	Detection Antikörper		E07879-1637
IFN γ -ELISA	Standard Human TNF α	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland	E24553-104
	Capture Antikörper		E12695-106
	Detection Antikörper		E25203-103
Immun-	Alexa Fluor 555 Anti-	BD Biosence, San Jose, Canada	1626617

histologische Färbung	Mouse Pan-Zytokeratin		1476616
	Alexa Fluor 647 Anti-Rabbit Vimentin		

2.6 Gebrauchsfertige Lösungen

Tabelle 6 zeigt eine vollständige Auflistung aller gebrauchsfertigen Lösungen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 6: Auflistung verwendeter gebrauchsfertiger Lösungen und Lotnummer

Bezeichnung		Zusammensetzung	LotNr
Nährmedium RPMI	Ficoll	RPMI + 1 % PenStrep + 10 % FCS	-
	Zellkultur	RPMI(+GlutaMAX) + 10 % FCS	-
Nährmedium DMEM		DMEM(+GlutMAX) + 10 % FCS + Na-Pyruvat	-
Nährmedium RPMI/DMEM		Nährmedium RPMI 50 % + Nährmedium DMEM 50 %	-
Erythrozyten-Lysis-Puffer		8,26 g Ammoniumchlorid + 1 g Kaliumbicarbonat + 0,037 g EDTA in 1 l Aqua dest.	-
Einfriermedium		RPMI + 20 % FCS + 10 % DMSO	-
PBS-		1,37 mmol/l NaCl + 2,68 mmol/l KCl + 1,45 mmol/l KH ₂ PO ₄ + 6,46 mmol/l Na ₂ HPO ₄	-
PBS- / EDTA		PBS- + EDTA	-
M30-ELISA	HRP-Konjugat Lösung	HRP-Konjugat 0,4 ml + 9,2 ml Konjugat Verdünnungspuffer	P-RS 1416
			P-PS 3592
	TMB-Substrat	-	P-1811
	Stopp-Lösung	-	P-PS 3596
Waschtablette	Tablette in 500 ml VE H ₂ O auflösen	P-PS 3613	
IFNY-ELISA	Enzym-Avidin HRP	0,4 % Enzym + 99,6 % Eliaspot Diluent	E00005-1639
	Eliaspot Diluent	20 % Eliaspot Diluent + 80 % VE H ₂ O	E00009-1641
	TMB-Substrat	-	E00007-1645
	Coating Puffer	10 % Coating Buffer + 90 % VE H ₂ O	E10287-1644
	Stopp-Lösung	Schwefelsäure (2N)	X873.1
	Verdünnungspuffer	PBS- + 0,05 % Tween 20	-
TNF α -ELISA	Enzym-Avidin HRP	0,4 % Enzym + 99,6 % Eliaspot Diluent	E00006-1644

	Eiaspot Diluent	20 % Eiaspot Diluent + 80 % VE H2O	E00010-1661
	TMB-Substrat	-	E00008-1653
	Coating Puffer	10 % Coating Buffer + 90 % VE H2O	E10288-1647
	Stopp-Lösung	Schwefelsäure (2N)	X873.1
	Verdünnungspuffer	PBS- + 0,05 %Tween 20	-

2.7 Gebrauchsfertige Kits

Tabelle 7 zeigt eine vollständige Auflistung aller gebrauchsfertigen Kits, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 7: Auflistung verwendeter gebrauchsfertiger Kits mit Hersteller und Lotnummer

	Handelsname	Hersteller	LotNr
M30-ELISA	M30 CytoDeath	Peviva/Diapharma Group, West Chester, USA	P-PS 3557
			PE-RS 1159
			PE-RS 2590
			PE-RS 3556
			PE-0134
IFNY-ELISA	Human IFNY-ELISA Ready- SET-Go	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland	4279156
TNF α -ELISA	Human TNF α -ELISA Ready- SET-Go	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland	E09512-1658

2.8 Biologisches Material für die Zellkultur

2.8.1 SW480-Zellen

Bei den hier verwendeten SW480-Zellen (Charakterisierung: siehe Tab. 8) handelt es sich um eine etablierte Tumorzelllinie, welche bei der DSMZ bestellt wurden. Sie wurden isoliert und kultiviert aus einem humanen kolorektalen Adenokarzinom Grad 3-4 (DUKE B) eines 50-jährigen Kaukasiers [73]. Diese etablierte Zelllinie gewährleistet experimentelle Untersuchungen über einen langen Zeitraum und ermöglicht eine Reproduktion dieser Experimente. Die SW480-Zellen wachsen adhärent und sind hauptsächlich epithelialen Ursprungs. Sie produzieren u.a. CEA (Carcinoembryonale Antigen). Sie wurden schon in der Forschung verwendet, um

den antiproliferativen Effekt von *F. mughelea* Pesmen auf Tumorzellen zu untersuchen [74] und um Schlüsselprozesse während des Vorgangs der Metastasierung aufzudecken [75]. In der vorliegenden Arbeit wurden sie in RPMI-Medium mit 10 % FCS und 1 % L Glutamin im Brutschrank bei 37°C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) kultiviert und bei einer Konfluenz von 70-80 % regelmäßig bedarfsorientiert passagiert. In der Regel müssen die SW480-Zellen, unter täglicher mikroskopischer Kontrolle auf mögliche Kontaminationen, der Zellmorphologie und der Zelldichte (Konfluenz) zweimal pro Woche 1:8 aufgeteilt werden. Die Arbeit wurde gemäß den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki 2010 durchgeführt und von der örtlichen Ethikkommission genehmigt (Ethikvotum 182/10).

Tabelle 8: Charakterisierung der SW480-Zellen [73]

Organismus	Homo sapiens
Gewebe	Kolon
Morphologie	epithelial
Wachstumsverhalten	adhärent
Klassifikation	Kolorektales Kolonkarzinom, DUKES B
Spender	50 Jahre männlich Kaukasier
Rezeptorexpression	EGF (engl. <i>epidermal growth factor</i>)
Zellprodukte	CEA TGFβ

2.8.2 Fibroblasten

Humane primäre Fibroblasten wurden nach Einverständnis des Spenders aus Hautbiopsaten aus dem Universitätsklinikum Würzburg nach standardisierten Arbeitsanweisungen (engl. *standard operating procedure*, SOP) isoliert und anschließend weiter kultiviert bzw. nach Bedarf kryokonserviert [41]. Die Arbeit wurde gemäß den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki 2010 durchgeführt und von der örtlichen Ethikkommission genehmigt (Ethikvotum 182/10).

2.8.3 PBMC

Für die Versuche vorliegender Arbeit wurden PBMC eines einzigen Spenders verwendet (männlich, 30 Jahre), um die Bedingungen konstant zu halten und Spender-abhängige Varianz zu vermeiden. Die Zellen wurden unter standardisierten Bedingungen am Uniklinikum Würzburg isoliert und anschließend kultiviert. Die Arbeit wurde gemäß den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki 2010 durchgeführt und von der örtlichen Ethikkommission genehmigt (Protokollnummer: 242/11).

2.9 Histologische und immunhistologische Lösungen

Tabelle 9 zeigt eine vollständige Auflistung der verwendeten histologischen und immunhistologischen Lösungen.

Tabelle 9: Auflistung verwendeter histologischer und immunhistologischer Lösungen

Bezeichnung	Bestandteile	Zusammensetzung
Blockierlösung	Antikörperverdünnungslösung	nach Bedarf
	Serum der Spezies des Sekundärantikörpers	5 %
Eindecklösung	Movicol DABCO	Nach Bedarf
	DAPI	0,1 %
Waschpuffer	PBS	1 l
	Tween-20	0,5 %

2.10 Methoden

2.10.1 Lymphozytenisolierung durch Dichtezentrifugation

Bei der Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung von PBMC aus heparinisiertem Blut wird Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer Ficoll als Separationsmedium verwendet. Diese Methode bedient sich dem Prinzip der isopyknischen Zentrifugation. So trennen sich die einzelnen Blutzellen nach ihren

Buoyant-Dichten auf. Diese Methode wird verwendet, wenn man Partikel auftrennen will, die sich weder in ihrer Größe noch in ihrer Masse ausreichend unterscheiden. Man nutzt ihre unterschiedlichen Zelldichten als Zellisolierungscharakteristikum. Es wird daher so lange zentrifugiert, bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat und jede Zelle ihren spezifischen Dichtebereich erreicht hat. Da das Ficoll Medium mit der Dichte 1,077 g/ml eine größere Dichte als Blutplasma, Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten, aber eine geringere Dichte als Erythrozyten und der meisten Granulozyten aufweist, wandern letztere durch die Zentrifugalkraft auf den Boden der Röhrchen. Das Ficoll Medium sammelt sich entsprechend seiner Dichte über dem Pellet und unter der PBMC Schicht. Die PBMC reichern sich somit nach der Zentrifugation in der Interphase zwischen Ficoll und dem restlichen Blutplasma an. Nachdem 10 ml Probandenblut unter sterilen Bedingungen mit 10 ml 0,9 % NaCl 1:1 verdünnt und in einem 50 ml Falcon Röhrchen mit jeweils 10 ml vorgelegter Ficoll Lösung langsam und behutsam überschichtet worden ist, wird das Gemisch bei Raumtemperatur (RT) und 1500 Umdrehungen pro Minute (rpm) - welches 350 x g entspricht - für 25 min ohne Bremse zentrifugiert. Nun wird der Lymphozytenring mit einer 10 ml Glaspipette geerntet, ohne dabei zusätzlich das zelltoxische Ficoll einzusaugen. Die PBMC werden anschließend in einem 50 ml Falcon Röhrchen mit 0,9 % NaCl aufgefüllt und 10 min lang bei 1700 rpm zentrifugiert, um eventuell vorhandene Medium-Reste auszuwaschen. Der Überstand wird anschließend abgesaugt, das Pellet in 5 ml Erythrozyten Lyse-Puffer resuspendiert und bei RT für 5 min inkubiert, um verbliebene Erythrozyten zu zerstören. Daraufhin wird das Röhrchen mit 10 ml Nährmedium (RPMI + 10 % FCS) aufgefüllt, weitere 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die nach der Resuspension des Pellets in 5 ml Nährmedium entstandene Zellsuspension der PBMC wird zur Zellzählung vorbereitet [76-78].

2.10.2 Zellzählung durch Neubauer-Zählkammer

Die Zellzahlbestimmung der Lymphozyten erfolgt mittels eines konventionellen Hämazytometers, wie es die Neubauer Zählkammer darstellt. Dazu werden 10 µl

Zellsuspension mit 40 µl Trypitanblau in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und homogen vermischt. Das Trypitanblau ist ein saurer Farbstoff, der nur tote Zellen anfärbt und somit auch als Vitalitätsnachweis dient. Diese Suspension wird nun in die Zählkammer überführt. Nach Auszählung zweier Großquadrate wird der Mittelwert errechnet und das Ergebnis in Zellen pro Milliliter angegeben [78].

2.10.3 Kryokonservierung von PBMC und Tumorzellen

Nach Zellzählung wird die Zellsuspension 5 min bei 350 x g zentrifugiert und das entstandene Pellet mit Einfriermedium (70 % RPMI + 20 % FCS + 10 % DMSO) resuspendiert. Zur Kryokonservierung werden 1 ml Zellsuspension mit der Konzentration 5×10^6 Zellen/ml in ein Kryoröhrchen mit Schraubverschluss gegeben, welches anschließend erst für mindestens 2 Tage und maximal 1 Monat bei -20°C und dann bei -80°C in flüssigem Stickstoff gelagert wird. Hierbei ist darauf zu achten, möglichst schnell zu arbeiten, weil das DMSO bei Raumtemperatur (RT) zelltoxisch wirkt. Im Fall der PBMC und der Tumorzellen gibt es auch standardisierte Protokolle für das Auftauen von Zellen [79].

2.10.4 Zellkultur und Versuchsdurchführungen

Für die Kultivierung von Zellen ist es wichtig, alle Arbeiten steril durchzuführen. Sie werden in Sicherheitswerkbänken durchgeführt, die sowohl Produkt- als auch Personenschutz gewährleisten. Um mikrobielle Kontaminationen zu verhindern, ist eine aseptische Arbeitsweise unabdingbar. Dies wird durch die Beachtung steriler standardisierter Arbeitstechniken und die Verwendung ausnahmslos steriler Materialien gewährleistet. Deshalb werden mehrfach benötigte Materialien vor jedem Gebrauch heißluftsterilisiert oder autoklaviert und Puffer und Kulturmedien entweder autoklaviert oder sterilfiltriert. Die Kultivierung der Zellen findet in Brutschränken mit wasserdampfgesättigter Atmosphäre, 5 % CO₂ und einer Temperatur von 37°C statt. Auf diese Weise werden die in vivo Bedingungen simuliert.

Am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin (TERM) in

Würzburg, wurden alle Experimente (ausgenommen die Isolierung und Kryokonservierung der PBMC) durchgeführt. Es wird mit einem standardisierten Arbeitsanweisungs-System (SOP-System) gearbeitet. Für die Versuche wurden PBMC, humane Fibroblasten und humane SW480-Zellen verwendet. Die PBMC wurden jeweils von demselben gesunden Spender, der vorher eine Einverständniserklärung unterschrieben hatte, auf die immer gleiche Art und Weise nach einem bereits etablierten Protokoll isoliert und bis zur Verwendung kryokonserviert. Die kryokonservierten Zellen wurden bei Bedarf aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und auf Trockeneis innerhalb einer Stunde ins Sterillabor transportiert und im Wasserbad (37°C) bis zum vollständigen Verschwinden der Eiskristalle aufgetaut. Um die DMSO-vermittelte Zytotoxizität bei RT möglichst gering zu halten, wurde darauf geachtet, alle Schutzsubstanzen des Einfriermediums so schnell wie möglich auszuwaschen. Man gibt dabei den Inhalt der Röhrchen unter der Sterilbank in ein Zentrifugenröhrchen, in das vorgewärmte zellspezifische Medium vorgelegt wurde. Anschließend wird bei 350 x g 5 min lang zentrifugiert und der Überstand abgesaugt und verworfen. Das Pellet wird in zellspezifischem Medium resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wird ein Aliquot für den Vitalitätstest und für die Zellzählung mit Trypanblau entnommen.

2.10.4.1 Passagieren von Fibroblasten und SW480-Zellen

Adhärente Zellen wie z. B. Fibroblasten und SW480-Zellen wurden immer auf die gleiche Art und Weise nach der vorgegebenen SOP passagiert. Sobald sich eine Konfluenz von 80 % eingestellt hat, müssen SW480-Zellen im Verhältnis 1:8 zweimal pro Woche und Fibroblasten im Verhältnis 1:2 einmal pro Woche aufgeteilt werden. Kolorektale Zellen der Zelllinie SW480 und primäre dermale Fibroblasten müssen, zunächst mit dem Enzym Trypsin von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgelöst werden. Zum Ablösen der Zellen wird mithilfe steriler Pipetten das Medium abgesaugt und anschließend werden 8 ml 37°C warmer Waschpuffer (PBS-/EDTA) zugegeben und 10 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. PBS-/EDTA kommt unterstützend beim Ablösen von Zellen zum Einsatz.

EDTA ist ein Chelatbildner, der zweiwertige Ionen komplexiert. Da diese Ionen essentiell für das Adhärenzverhalten der Zellen an der Plastikoberfläche sind, führt die Komplexbildung zum Abkugeln der Zellen. Hierdurch kann die Inkubationsdauer von Enzymen wie Trypsin verkürzt werden. Unter dem Mikroskop kann das Abkugeln der noch adhärenzhaften Zellen erkennen. Nun werden 3 ml Trypsin dazugegeben und darauf geachtet, dass die Oberfläche der Zellkulturflasche ausreichend benetzt ist. Nach erfolgter 5-minütiger Inkubation im Brutschrank und erfolgreicher mikroskopisch nachgewiesener Zellablösung wird 10 ml Nährmedium zugegeben, um die Enzymreaktion durch diese Verdünnung zu stoppen. Der gesamte Flascheninhalt wird nun in ein 50 ml Röhrchen gefüllt und bei 350 x g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird nach Absaugen des Überstandes in 5 ml Medium resuspendiert. Anschließend wird 1/8tel der Zellsuspension auf 12 ml mit Nährmedium aufgefüllt, homogen vermischt und in die leere Zellkulturflasche gegeben. Sie wird verschlossen und wieder zur weiteren Kultivierung in den Brutschrank gestellt.

2.10.4.2 2D-Zellkultur

Die 2D-Zellkultur erfolgte in 12-Well-Platten. Es wurden Experimente mit einer unterschiedlichen Anzahl von SW480-Zellen, Fibroblasten und PBMC mit dem Medium RPMI/DMEM (1:1) durchgeführt. Da das vorhergesehene Medium für Fibroblasten DMEM und für SW480-Zellen RPMI ist, wurde bei den Experimenten ein 1:1 Gemisch aus Beiden verwendet. Der Mediumwechsel und eine mikroskopische zellmorphologische Kontrolle sowie eine Kontaminationskontrolle erfolgten täglich. Dabei war darauf zu achten, dass das Medium mit nicht-adhärenzhaften Zellen wie den PBMC nach der Entnahme und vor der Entsorgung bei 350 x g 5 min lang zentrifugiert und das entstandene Zellpellet in frischem 37°C warmen Medium resuspendiert wurde. Nach der Resuspension wurde eine Vitalitätsdiagnostik und Zellzählung mit Trypanblau durchgeführt. Auch bei der Entnahme von Zellkulturüberständen zu bestimmten Zeitpunkten für die ELISA-Analyse wurde vor dem Wegfrieren bei 350 x g 5 min lang zentrifugiert, der Überstand in ein zweites Eppendorf-Röhrchen überführt und schließlich bei -80°C

aufbewahrt um analytische Untersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt vorzunehmen.

2.10.4.3 3D-Zellkultur

Um die *in vivo* Situation besser abzubilden wurden die Experimente, wie in Abbildung 2 schematisch dargestellt, nicht nur in 2D, sondern auch in 3D-Zellkulturen auf azellularisiertem Jejunum von Schweinen, das die Basis für die hier verwendete biologische Matrix SISmuc (engl. *small intestine submucosa + mucosa*, SISmuc) war, die durch standardisierte Dezellularisierungsprozesse hergestellt wird, durchgeführt [41, 47]. Die sog. SISmuc unterscheidet sich von anderen SIS Matritzen durch die zusätzlich vorhandene Mukosa mit Kryptenstrukturen, Mikrovilli. Als einzigartiges Merkmal der Matrix bleiben die Strukturen der Basalmembran nach der Dezellularisierung erhalten, was ein physiologisch verankerungsabhängiges Wachstum von Epithelzellen ermöglicht [80] Darüber hinaus ermöglicht diese Struktur die Prüfung von Substanzen, die invasive Tumorzellen eliminieren sollen, sobald sie diese natürliche Grenze überschreiten. Frühe Schritte in der Metastasenbildung können ebenfalls untersucht werden, um die zugrunde liegenden Mechanismen zu verstehen und mögliche Angriffspunkte zu identifizieren. Es wurde bereits gezeigt, dass matrixbasierte Lungenkrebsmodelle die Arzneimittelreaktionen auf gezielte Therapien, die in der Klinik beobachtet wurden, genau widerspiegeln - nicht nur besser als 2D, sondern teilweise auch zuverlässiger als Tiermodelle [80, 81].

Diese Tatsachen erlauben eine genaue Betrachtung der Auswirkungen bestimmter Immunmodulatoren auf die tumorinvasiven Eigenschaften der Karzinomzellen [82]. Experimente mit SW480-Zellen in 2D- und 3D-Kultur zeigten, dass die Karzinomzellen im 3D-Tumormodell, verglichen mit dem 2D-Modell, weniger stark proliferierten und somit dem KRK *in vivo* in allen UICC-Stadien stärker ähnelten [41, 47, 83]. Diese Experimente von SW480-Zellen und Fibroblasten auf SISmuc unterschiedlicher Zellzahlen pro Zellkrone und Kultivierungsdauer waren Ausgangspunkt für die Versuchsplanung [41, 82].



Abb. 2: 3D-Zellkultur von der Dezellularisierung bis zum fertigen statischen System (modifiziert nach [41]). SISmuc = small intestinal submukosa mit erhaltener Mukosa. Hier sind die einzelnen Schritte von der Dezellularisierung bis zum fertigen statischen System dargestellt. Die azellularisierte SISmuc Röhre wird längs mit einem Skalpell eröffnet und in gleich große Stücke geschnitten. Jeweils ein Stück wird nun über den inneren Ring einer Zellkrone aus Metall gestülpt. Anschließend wird der äußere Ring über den inneren Ring geschoben, sodass am Ende die ehemalige Lumenseite nach oben zeigt. Jetzt können Zellen wie Fibroblasten oder Tumorzellen mit entsprechendem Nährmedium in den inneren Ring auf die Matrix gegeben werden. Die adhärennten Zellen können nun den Darm besiedeln [41].

Die verwendeten autoklavierten Zellkronen bestehen jeweils aus einem inneren Ring und aus einem äußeren Ring, welcher auf vier Füßchen steht (**Abb. 2**). Dabei kann der größere äußere Ring über den inneren Ring mit der Darmmatrix geschoben werden, sodass die Matrix von den beiden Zylindern fixiert wird. Innerhalb dieser Zellkrone stehen beide Ringe auf gleicher Höhe, während der innere Ring (ohne Füßchen) aber nicht bis zum Boden ragt.

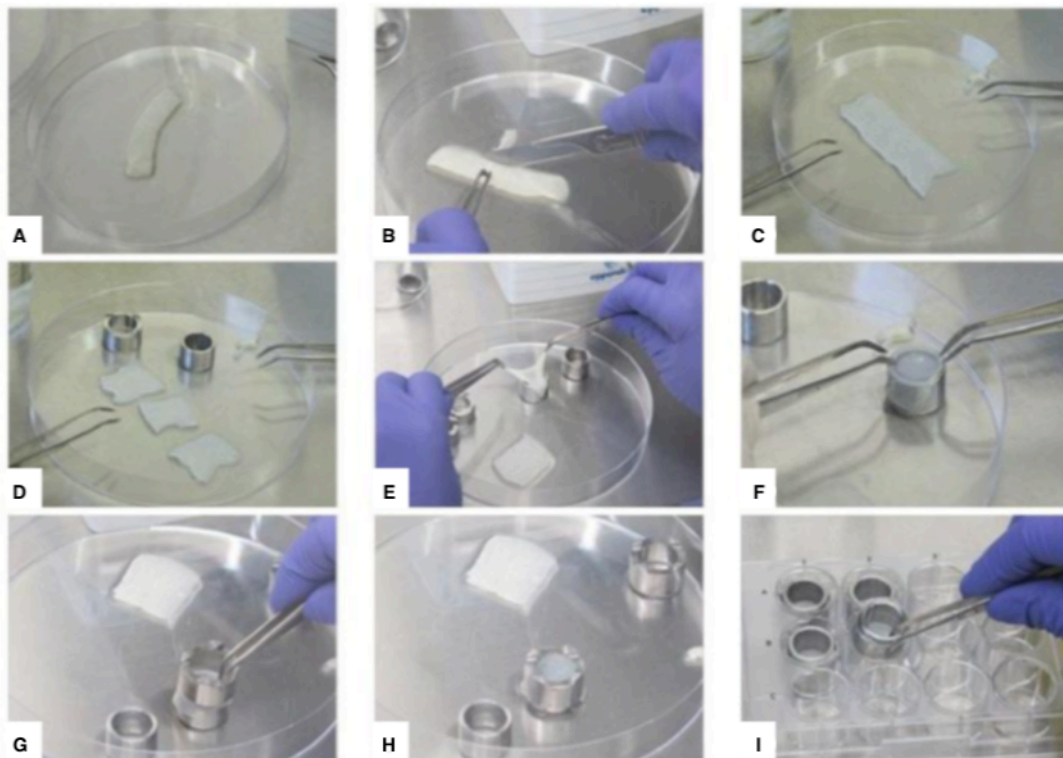


Abb. 3: Vorbereiten der Zellkronen für die Zellbesiedlung (modifiziert nach [84]). A: Auslegen der Darmröhre auf der Petrischale; B: Eröffnen der Darmröhre mit dem Skalpell durch einen Schnitt längs der Darmaufhängung; C: Aufklappen der Darmröhre; D: Schneiden der Darmröhre in etwa gleich große Quadrate; E und F: Bespannen des inneren Rings mit der Lumenseite nach unten; G und H: Herüberstülpen des äußeren Rings über den inneren Ring; I: Überführen der Zellkrone in die Wells;

Wie man in der Abbildung 3 (A-I) sehen kann, wird in einem ersten Schritt die SISmuc auf einer Petrischale ausgebreitet (Abb.3, A) und mit einem Skalpell an einer Seite aufgeschnitten (Abb.3, B), sodass sie sich aufklappen lässt. Die Darmlumenseite zeigt nun nach oben (Abb.3, C). Nun werden mit dem Skalpell 2x2cm große Stücke aus der Matrix geschnitten, die mit der Lumenseite nach unten über die obere Zellkronenhälfte des inneren Zylinders gezogen werden (Abb.3, D-F). Anschließend wird die untere Zellkronenhälfte mit den Füßchen nach oben über die obere Hälfte mit SISmuc gestülpt (Abb.3, G) und langsam herunter gedrückt, sodass beide Ringe ineinander stecken. Die Zellkrone mit SISmuc (Abb.3, H) wird nun umgedreht und auf die Füßchen gestellt und jeweils in ein Well der 12-Well-Platte überführt (Abb.3, I). Anschließend werden alle Zellkronen innen (1,0 ml) und außen (1,5 ml) mit zellspezifischem Medium aufgefüllt und mindestens 12 h im Inkubator inkubiert. Nach Entfernen des inneren und äußeren Mediums können die Zellkronen mit den jeweiligen Zellen in gewünschter

Konzentration besiedelt werden. Adhärenente Zellen werden von der Zellkulturflaschenoberfläche, analog zum Vorgang des Passagierens abgelöst, gezählt und in 500 µl zellspezifischem Medium suspendiert luftblasenfrei ins Zellkroneninnere überführt. Nach zweistündiger Inkubation, in der die Zellen absinken und adhären konnten, wird zuerst das Zellkroneninnere mit 500 µl Medium und anschließend das Zellkronenäußere mit 1,5 ml Medium aufgefüllt. Die Zellen in den Zellkronen werden für 14 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert [41]. Das gesamte Medium muss alle 48 h gewechselt werden. Beim Medienwechsel wird das verbrauchte Medium abgesaugt und anschließend erst das innere - und dann das äußere Kompartiment wieder aufgefüllt. Das Sammeln von Überständen erfolgt analog zum 2D-Modell [41, 85].

2.10.5 ELISA

Für die Quantifizierung der Apoptose der SW480-Zellen (M30-ELISA) oder für die Quantifizierung der sezernierten solublen Faktoren (TNF α -ELISA und IFN γ -ELISA) werden die Zellkultur-Überstände nach 0 (=24 h nach Besiedlung der Fibroblasten und SW480, d. h. direkt vor der PBMC-Zugabe) 24 h und 48 h in entsprechende Eppendorf-Röhrchen überführt, zentrifugiert (300 x g; 5 min) und der Zellkultur-Überstand in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und bei -20°C eingefroren, um sie später mit M30-, TNF α - und IFN γ -ELISA zu messen. Dabei ist darauf zu achten, dass die Zellkultur-Überstände ohne PBMC anders behandelt werden müssen als die Zellkultur-Überstände mit PBMC:

Entnahme des Zellkultur-Überstandes ohne PBMC

Hier werden 300 µl Zellkultur-Überstandes abgenommen, zentrifugiert und anschließend eingefroren. Das fehlende Medium im entsprechenden Well wird mit 300 µl frischem Medium ersetzt.

Entnahme des Zellkultur-Überstandes einer Kokultur mit PBMC

Hier werden 300 µl Zellkultur-Überstand abgenommen, zentrifugiert und anschließend eingefroren. Das zurückbleibende Pellet mit PBMC wird

anschließend mit 300 µl frischem Medium resuspendiert und wieder dem entsprechenden Well zugefügt.

2.10.5.1 M30-ELISA

Um die Apoptose der mehrheitlich epithelialen SW480-Zellen in der Zellkultur zu quantifizieren, bedient man sich der Methode des M30 CytoDeath™ ELISA (Peviva). Es ist ein einstufiger in vitro Immunoassay zur quantitativen Analyse eines während der Apoptose von Kaspasen gespalteten Zytokeratins. Da SW80-Zellen Tumorzellen epithelialen Ursprungs sind, exprimieren sie wie die meisten Epithelzellen das intermediäre Filamentprotein Zytokeratin 18. Dieses Zytokeratin 18 wird - wie in Abbildung 4 dargestellt - während der Apoptose von Kaspasen in drei Teile geschnitten und ins extrazelluläre Medium abgegeben. Zytokeratin 18 stellt somit einen geeigneten quantifizierbaren Marker für die Apoptose von epithelialen SW480-Zellen dar und wird auch eingesetzt, um beispielsweise den Behandlungserfolg einer Chemotherapie im Serum von Krebspatienten nachzuweisen: Dabei wird das mittlere Fragment von Zytokeratin 18 (Neoepitop M30) mittels monoklonalem Mausantikörper (M30) vom Typ IgG2b nachgewiesen [86, 87]. Nach Vorbereitung der Komponenten des verwendeten Cytodeath M30-Kits kann der Test bei RT (24°C ±3°C) durchgeführt werden. Die Proben werden am Tag der Durchführung des M30-ELISAs aus dem Gefrierschrank genommen und auf Eis aufgetaut. Die einzelnen Proben müssen mit dem Nährmedium verdünnt werden, sodass der gemessene Wert anschließend innerhalb der Standardkurve liegt. Diese Verdünnung wird zunächst geschätzt und gegebenenfalls durch Wiederholung des ELISAs adjustiert. Anschließend werden innerhalb von 20 min jeweils 25 µl der einzelnen Standard-Konzentrationen und 25 µl der jeweiligen Proben in Duplikaten auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte aufgetragen und zu jeder Probe/jedem Standard 75 µl Konjugatlösung zugegeben. Die Mikropipettierplatte wird mit Deckel 4 h auf dem Schüttler (600 U/min) inkubiert. Anschließend wird die Mikrotiterplatte fünfmal mit 250 µl Waschpuffer pro Well gewaschen und nach jedem Waschen trocken geklopft. Dann erfolgt die Zugabe von 200 µl TMB Substratpuffer in jedes Well. Nach 20-minütiger

Inkubation im Dunklen werden 50µl Stopp-Lösung zu jeder Probe gegeben und die Platte im Absorptionslesegerät (Tecan) für 5-10 s geschüttelt. Nach 5 min wird die Absorption bei 450 nm in einem für Mikrotiterplatten bestimmt und die Ergebnisse aufgezeichnet [86].

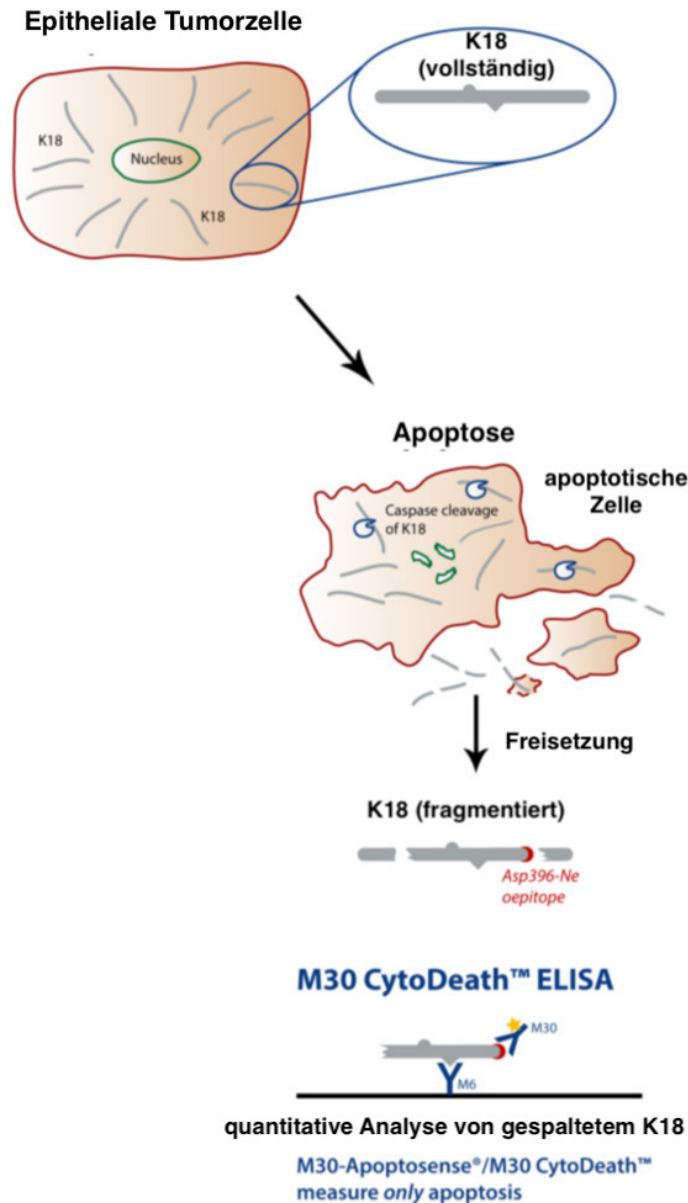


Abb. 4: Funktionsmechanismus des M30-ELISAs zum Nachweis von Apoptose in Zellen epithelialen Ursprungs (modifiziert nach [86]). Da SW80-Zellen Tumorzellen epithelialen Ursprungs sind, exprimieren sie - wie die meisten Epithelzellen - das intermediäre Filamentprotein Zytokeratin 18. Dieses Zytokeratin 18 wird während der Apoptose von Kaspasen in drei Teile geschnitten und ins extrazelluläre Medium abgegeben. Das mittlere Fragment von Zytokeratin 18 (Neopeptid M30) kann nun mittels monoklonalem Mausantikörper (M30) vom Typ IgG2b im Rahmen des ELISAs quantifiziert werden.

2.10.5.2 IFN γ - und TNF α -ELISA

Die IFN γ - und TNF α -Konzentration in den Überständen wird mit dem ELISA-Ready-SET-Go (eBioscience) bestimmt. Nach Vorbereitung der Komponenten des verwendeten ELISA-Kits kann der Test bei RT (24°C \pm 3°C) durchgeführt werden. Die Zellkulturproben werden analog zum M30-ELISA vorbereitet. Man inkubiert über Nacht bei 4°C 100 μ l/Well des Capture Anti-TNF α bzw. Anti-IFN γ Antikörpers mit der Matrix der Mikropipettierplatte. Am nächsten Morgen wäscht man die Mikropipettierplatte dreimal mit 250 μ l Waschpuffer pro Well analog des M30-ELISAs und gibt anschließend zum Blocken 200 μ l Stopp-Lösung (= Blockierungslösung) in jede Mulde und inkubiert bei RT für eine h. Anschließend pipettiert man Proben und Standards (100 μ l pro Well) und zusätzlich zwei weitere Wells mit Verdünnungspuffer als Referenzwert. Nach zwei h Inkubation bei RT folgen vier weitere Waschvorgänge. Anschließend werden 100 μ l Detektions-Antikörper pro Well zugegeben und für eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Nach vier Waschvorgängen mit Waschpuffer werden 100 μ l Avidin-HRP Substrat pro Well zugegeben und für weitere 30 min inkubiert. Nach sechs Waschvorgängen werden schließlich 100 μ l TMB-Substratpuffer pro Well pipettiert und nach 15 min Inkubation mit 50 μ l Stopp-Lösung pro Well der Prozess wieder gestoppt. Die Absorption wird abschließend bei 450 nm gemessen (Tecan- Reader) und die Ergebnisse aufgezeichnet [86].

2.10.6 Histologie und Immunhistologie

Durch verschiedene histologische und immunhistologische Färbungen ist es möglich, Zellen und Gewebekomponenten zu charakterisieren. Das Gewebe muss zunächst fixiert werden (2.10.6.1) und anschließend in Paraffin eingebettet und geschnitten werden (2.10.6.2).

2.10.6.1 PFA-Fixierung

Um eine autolytische und mikrobielle Degradation des Gewebes aus der Zellkrone zu verhindern und die Zellmembran für eine Immundetektion durch Antikörper zu permeabilisieren, erfolgt eine chemische Fixierung durch 4 % Paraformaldehyd (PFA).

Nach Abnahme des letzten Zellkultur-Überstandes aus dem inneren Kompartiment der Zellkrone wird das Gewebe durch das Spülen mit PBS- von Medienresten befreit. Unter dem Abzug und unter Einhaltung der Sicherheitsvorschriften wird das zu fixierende Gewebe in eine Einbettkassette mit Filterpapier überführt und anschließend in frisch hergestellten 4 % PFA für 2 h mit geschlossenem Deckel inkubiert. Dann wird das Gewebe mithilfe eines Skalpells zu recht geschnitten. Die nicht mit Zellen besiedelten Ränder werden entfernt. Nach 2 h in einem mit destilliertem Wasser gefüllten Gefäß erfolgt die Paraffineinbettung in einem Einbettautomaten [78].

2.10.6.2 Paraffineinbettung und Schnitt

Im Anschluss an die chemische Fixation folgt die Einbettung des Präparates in Paraffin. Die einzelnen Schritte der Paraffineinbettung sind in Tabelle 10 dargestellt. Als Erstes muss das Fixativ gründlich mit Wasser ausgespült werden, um Färbeartefakte zu vermeiden. Wichtig für die spätere Paraffineinbettung ist die vollständige Entwässerung des Gewebeschnittes. Dies erfolgt mithilfe eines Einbettautomaten, der das Präparat erst mittels aufsteigender Ethanolreihe dehydratisiert und anschließend mittels Isopropanol und Xylol entfettet und entalkoholisiert, um eine vollständige Paraffineinbettung zu ermöglichen. Den letzten Schritt stellt die Paraffinisierung bei 60°C dar. Nach Entnahme der Einbettkassette aus dem Einbettautomaten wird der Gewebeschnitt in flüssigem Paraffin geschmolzen (Blockstation, Firma Leica) und anschließend mit dem erwärmten Skalpell in gleich große rechteckige Teile geschnitten. Diese Gewebeschnitte stellt man in senkrechter Position in die mit Paraffin gefüllte

Blockform und lässt sie unter Abkühlung aushärten. Anschließend kann man Gewebeschnitte unterschiedlicher Dicke anfertigen.

Tabelle 10: Darstellung der einzelnen Schritte der Paraffineinbettung

Zeitablauf [h]	Lösung	Ziel
1-2	H ₂ O	Dehydrierung bei RT
> 1	EtOH 50 %	
1	EtOH 70 %	
1	EtOH 90 %	
1	EtOH 96 %	
1	Isopropanol	
1	Isopropanol	
1	Isopropanol/Xylol (1:2)	
1	Xylol	
1	Xylol	
über Nacht	Paraffin	Inkubieren bei 60°C
	Paraffin	

Die Blöcke werden dafür auf -20°C heruntergekühlt und in das Mikrotom (Leica) eingespannt. Man erreicht man Schnitte von 3-3,5 µm Dicke, die sofort auf der Oberfläche eines warmen Wasserbades (50°C) gestreckt und auf einen Objektträger überführt werden. Dabei können mehrere Schnitte nebeneinander auf einem Objektträger platziert werden. Anschließend erfolgt die Trocknung über Nacht bei 40°C [78].

2.10.6.3 Immunhistologische Fluoreszenzfärbung

Mit einer immunhistologischen Färbung können spezifische Peptidstrukturen einer Zelle mit einer Antigen-Antikörper-Reaktion nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine indirekte 2-Schritt Detektion eingesetzt, um die Sensitivität zu erhöhen. So bindet an das Antigen erst der spezifische Primärantikörper aus Maus oder Kaninchen, dann binden an diesen

Primärantikörper die gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichteten Sekundärantikörper, die dadurch als Verstärker (engl. *Amplifier*) des Signals dienen und durch die Konjugation mit Alexa Fluor Farbstoffen als Detektionsantikörper fungieren. Diese Farbstoffe fluoreszieren bei Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge. Dabei wird bei Doppelmarkierungen darauf geachtet, dass nur die Fluorochrome gemeinsam verwendet werden, die einen großen Abstand ihrer spezifischen Emission aufweisen, um sie nebeneinander detektieren zu können [78].

Am Anfang einer solchen Prozedur steht die Entparaffinierung und Hydratisierung des Gewebeschnitts durch eine absteigende Alkoholreihe (Tab. 11). Dabei wird darauf geachtet, das Xylol regelmäßig zu wechseln, um einer Verunreinigung mit Paraffin entgegen zu wirken.

Tabelle 11: Darstellung der einzelnen Schritte der Entparaffinierung und Hydratisierung zur Vorbereitung der immunhistologischen Färbung

Zeitablauf [min]	Lösung	Ziel
10	Xylol	Entparaffinieren
10	Xylol	
2	EtOH 96 %	Hydratisierung
2	EtOH 96 %	
2	EtOH 70 %	
2	EtOH 50 %	
	H2O	

Die Paraffinschnitte werden im Trägerkorb mit Metallhenkel fixiert und 1 h in den Wärmeschrank (60°C) gegeben. Im Folgenden werden die Nativ-Gewebeschnitte analog zu den Probenschnitten behandelt, nur ohne Primärantikörper. Somit kann man die Spezifität des Sekundärantikörpers überprüfen, weil man die unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers an andere Zell- oder Gewebestrukturen durch das dem Primärantikörper nachgeschaltete Nachweissystem detektiert. Nach der Paraffinschmelze wird die Entparaffinierung und Hydratisierung der Präparate durch die Überführung in Xylol eingeleitet. Anschließend erfolgt die Epitop-Demaskierung. Eine Prozedur, die die Epitop- oder Antigenität der Proteine erhöht und die teilweise reversible Fixativ-bedingte

Quervernetzung der Proteine (Maskierungen) rückgängig macht. Hierzu gibt man die Objektträger mit den Gewebeschnitten für 20 min in ein mit Citratpuffer (PH 6; 1:10 mit H₂O verd.) gefülltes Gefäß, das vorher auf 100°C erhitzt wurde. Anschließend werden die Schnitte in Waschpuffer überführt und mit einem Fettstift umrandet. Durch Waschen mit TBS-Waschpuffer, welcher das nicht ionische Tensid Polysorbat 20 (Tween 20) enthält, das für den Aufschluss der Zellen sorgt, können die bei der Färbung zur Verwendung kommenden Reagenzien auch das Zellinnere erreichen. Nach dieser Waschprozedur werden die Objektträger in die Trägerbox überführt und getrocknet. Dann werden auf beide Schnitte eines Objektträgers 100 µl Blockierlösung mit 5% Serum aus der gleichen Spezies wie der Sekundärantikörper gegeben, um die unspezifischen Bindungsstellen der Primärantikörper zu blocken. Es wird 20 min bei RT inkubiert. Nach Herstellung der AK-Verdünnungen mit AK-Verdünnungslösung und der Negativkontrollen mit IgG in gleicher Konzentration wird von beiden jeweils 100 µl auf jeden Schnitt gegeben und darauf geachtet, dass die Lösung innerhalb des Fettrandes verbleibt. Bei den primären Antikörpern handelt es sich um Anti-Maus IgG gegen Panzytokeratin (konjugiert mit HexaFluor555) und um Anti-Kaninchen IgG gegen Vimentin (konjugiert mit HexaFluor647). Nach Inkubation über Nacht im Dunklen werden die Objektträger im Waschpuffer durch 5-minütiges Schütteln auf dem Schüttler ausgewaschen. Diesen Vorgang wiederholt man dreimal. Nun werden die Schnitte mit Sekundärantikörpern (1:400 verdünnt in Antikörper-Verdünnungslösung) überschichtet und 60 min bei RT inkubiert. Ab diesem Zeitpunkt wird im Dunklen weitergearbeitet. Nach drei Waschvorgängen werden die Zellen zur Kern-Gegenfärbung, Konservierung und Lagerung mit 100µl des Mounting-Mediums Moviol, versetzt mit DAPI, eingedeckt. Die spezifische Zusammensetzung des Eindeckmediums verhindert eine Autofluoreszenz in den relevanten Spektralbereichen und ebenso ein Ausbleichen. Auf den Objektträger wird ein Deckglas gelegt und gegebenenfalls entstandene Luftblasen herausgedrückt. Nach Abdecken des Objektträgers mit Alufolie werden die Proben über Nacht getrocknet und bis zum Mikroskopieren dunkel gelagert. Die Immundetektion erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit dem BZ-9000 Fluoreszenz-Mikroskop der Firma Keyence.

2.10.7 Auswertung

2.10.7.1 Regressive Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Proben wurde standardisiert nach Empfehlung des Herstellers des ELISA-Kits durchgeführt.

M30-ELISA

Die Auswertung der Daten des M30-ELISAs erfolgte exponentiell per Standardkurve (Origin).

IFNY- und TNF α -ELISA

Die Auswertung der Daten des IFNY- und TNF α -ELISA erfolgte linear per Standardgerade (Excel).

2.10.7.2 Berechnung der relativen Apoptoserate

Die Berechnung der einzelnen finalen Werte der relativen Apoptose erfolgte nachfolgender Formel:

Relative Apoptoserate und relative Konzentrationsänderung:

Vergleich der M30-Konzentrationen (für die Ermittlung der relativen Apoptoserate) oder anderer Konzentrationen (für die Ermittlung der relativen Konzentrationsänderung) der Zellkultur-Überstände zu verschiedenen Zeitpunkten der behandelten Probe bezogen auf die unbehandelte Probe.

Beispiel: Berechnung des 24-h Wertes:

$$\frac{\frac{T_{24}}{T_0} \text{ (behandelt)}}{\frac{T_{24}}{T_0} \text{ (unbehandelt)}}$$

T0 (behandelt):	Konzentration der gesuchten Substanz des Zellkultur-Überstandes vor der Behandlung
T24 (behandelt):	Konzentration der gesuchten Substanz des behandelten Zellkultur-Überstandes nach 24 h
T0 (unbehandelt):	Konzentration der gesuchten Substanz des unbehandelten Zellkultur-Überstandes zum gleichen Zeitpunkt wie T0 (behandelt)
T24 (unbehandelt):	Konzentration der gesuchten Substanz des unbehandelten Zellkultur-Überstandes nach 24 h

2.10.8 Experimente

2.10.8.1 2D Kokultivierung von Fibroblasten und SW480-Zellen mit PBMC: Vergleich der relativen Apoptoserate nach Zugabe von PBMC

Experiment 2.10.8.1:

Fragestellung: Haben PBMC einen Einfluss auf 2D kultivierte SW480-Zellen?

Mit diesem Experiment wurde in herkömmlicher 2D-Kultur getestet, ob und auf welche Weise PBMC auf SW480-Zellen oder auf heterologe Fibroblasten reagieren. Hierfür wurde die Apoptoserate der SW480-Zellen in Mono (MK)- und Kokultur (KK) mit Fibroblasten einmal mit PBMC und einmal ohne PBMC zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen und die daraus resultierenden relativen Apoptoseraten miteinander verglichen. Gemessen wurde die Apoptoserate der SW480-Zellen mittels M30-ELISA des zellfreien Zellkultur-Überstandes. Außerdem wurde während des zeitlichen Verlaufs zu verschiedenen Zeitpunkten eine mikroskopische Beurteilung der Zellmorphologien der Zellkulturen vorgenommen und diese bildlich festgehalten. Die Ergebnisse des M30-ELISAs wurden graphisch dargestellt, um die zell-spezifische Grund-Apoptoserate zu ermitteln.

Zunächst wurde die optimale Zellzahl der PBMC ermittelt (Tab. 12). Es wurde ein Mischmedium für alle Ansätze verwendet: 1:2 RPMI:DMEM.

Tabelle 12: Darstellung der unterschiedlichen Zellzahlen für SW480-Zellen, Fibroblasten und PBMC pro Well im 2D-Experiment

	SW480	Fibroblasten	PBMC
Zellzahl / Well	100*10 ³	20*10 ³	1*10 ⁶ 2*10 ⁶ 3*10 ⁶

2.10.8.2 3D Kokultivierung von Fibroblasten und SW480-Zellen mit PBMC: Vergleich der relativen Apoptoserate nach Zugabe von PBMC

Experiment 2.10.8.2:

Fragestellung: Haben PBMC einen Einfluss auf die Apoptose der 3D kultivierten SW480-Zellen in Kokultur mit Fibroblasten?

Mit diesem Experiment wurde in 3D-Kultur getestet, ob und auf welche Weise (vergleichbar mit dem 2D-System) eine Konzentration von 1*10⁶ PBMC auf SW480-Zellen in Mono- und Kokultur mit heterologen Fibroblasten reagieren. Dazu wurden SW480-Zellen in Mono- und Kokultur mit Fibroblasten kultiviert und deren Apoptoserate mit PBMC in Relation zu deren Apoptoserate ohne PBMC betrachtet und graphisch dargestellt. Das Gewebe dieses 3D-Experimentes wurde anschließend fixiert und in Paraffin eingebettet und bei Bedarf wieder entparaffiniert und geschnitten. Anschließend wurde eine immunhistologische Fluoreszenzfärbung der Darmmatrix durchgeführt.

Zunächst wurden die optimalen Zellzahlen ermittelt (Tab. 13). Es wurde ein Mischmedium für alle Ansätze verwendet: 1:2 RPMI:DMEM.

Tabelle 13: Darstellung der unterschiedlichen Zellzahlen für SW480-Zellen, Fibroblasten und PBMC pro Well im 3D-Experiment

	SW480	Fibroblasten	PBMC
Zellzahl / Well	100*10 ³	100*10 ³	1*10 ⁶

2.10.8.3 3D Kultivierung von SW480-Zellen mit PBMC: Vergleich der relativen Apoptoserate nach Zugabe von PBMC

Experiment 2.10.8.3:

Fragestellung: Haben PBMC einen Einfluss auf die Apoptose der 3D kultivierten SW480-Zellen in Monokultur?

Mit diesem Experiment wurde in 3D-Kultur getestet, ob und auf welche Weise (vergleichbar mit dem 2D-System) PBMC eine Auswirkung auf die Apoptoserate der SW480-Zellen hat. Während des zeitlichen Verlaufs wurde analog zum 3D-Experiment 2.10.8.2 (gleiche Anzahl der SW480-Zellen und der PBMC) mithilfe des M30-ELISAs die Apoptoserate der SW480-Zellen ohne und mit PBMC gemessen, in Relation zueinander gesetzt und graphisch dargestellt, um eine spezifische Grund-Apoptoserate zu ermitteln. Es wurde ein Mischmedium für alle Ansätze verwendet: 1:2 RPMI:DMEM. Das Gewebe dieses 3D-Experimentes wurde anschließend fixiert und in Paraffin eingebettet und bei Bedarf wieder entparaffiniert und geschnitten. Anschließend wurde eine immunhistologische Fluoreszenzfärbung der Darmmatrix durchgeführt.

2.10.8.4 3D Kultivierung von SW480-Zellen mit PBMC: Vergleich der Zunahme der relativen Apoptoserate nach Zugabe unterschiedlich vieler PBMC

Experiment 2.10.8.4:

Fragestellung: Kann eine zunehmende Anzahl an PBMC eine Zunahme der Apoptose in 3D kultivierten SW480-Zellen in Monokultur induzieren?

Mit diesem Experiment wurde in 3D-Kultur getestet, ob und auf welche Weise (vergleichbar mit dem 2D-System) eine zunehmende Konzentration von PBMC eine Auswirkung auf die Apoptoserate der SW480-Zellen hat. Während des zeitlichen Verlaufs wurde analog zum 3D-Experiment 2.10.8.2 mithilfe des M30-ELISAs die Apoptoserate der SW480-Zellen ohne und mit PBMC mit unterschiedlichen Zellzahlen gemessen, in Relation zueinander gesetzt und graphisch dargestellt, um zu schauen, ob eine Zunahme der PBMC auch eine Zunahme der Apoptose der SW480-Zellen bewirkt. Es wurde ein Mischmedium für alle Ansätze verwendet: 1:2 RPMI:DMEM. Das Gewebe dieses 3D-Experimentes wurde anschließend fixiert und in Paraffin eingebettet und bei Bedarf wieder entparaffiniert und geschnitten. Anschließend wurde eine immunhistologische Fluoreszenzfärbung der Darmmatrix durchgeführt.

2.10.8.5 3D Kokultivierung von SW480-Zellen mit Fibroblasten mit PBMC: Vergleich der Zunahme der relativen Apoptoserate der SW480- Zellen in Monokultur und in Kokultur mit Fibroblasten nach Zugabe unterschiedlich vieler PBMC

Experiment 2.10.8.5:

Fragestellung: Kann eine zunehmende Anzahl an PBMC eine Zunahme der Apoptose in 3D kultivierten SW480-Zellen in Monokultur und in Kokultur mit Fibroblasten induzieren?

Mit diesem Experiment wurde in 3D-Kultur getestet, ob und auf welche Weise (vergleichbar mit dem 2D-System) eine zunehmende Konzentration von PBMC eine Auswirkung auf die Apoptoserate der SW480-Zellen in Mono- und Kokultur hat. Während des zeitlichen Verlaufs wurde analog zum 3D-Experiment 2.10.8.2 und 2.10.8.3 mithilfe des M30-ELISAs die Apoptoserate der SW480-Zellen in Mono- und Kokultur mit Fibroblasten mit PBMC mit unterschiedlichen Zellzahlen gemessen, in Relation zueinander gesetzt und graphisch dargestellt, um zu schauen, ob eine Zunahme der PBMC auch eine Zunahme der Apoptose der SW480-Zellen in Mono- und Kokultur bewirkt. Es wurde ein Mischmedium für alle Ansätze verwendet: 1:2 RPMI:DMEM. Das Gewebe dieses 3D-Experimentes wurde anschließend fixiert und in Paraffin eingebettet und bei Bedarf wieder entparaffiniert und geschnitten. Anschließend wurde eine immunhistologische Fluoreszenzfärbung der Darmmatrix durchgeführt.

2.10.8.6 2D Kultivierung von SW480-Zellen mit PBMC: Korrelation der relativen Apoptoserate der SW480-Zellen mit der TNF α -Produktion der PBMC

Experiment 2.10.8.6:

Fragestellung: Wie korreliert die TNF α -Produktion der PBMC mit der Apoptoserate der SW480-Zellen im 2D-System?

Mit diesem Experiment wurde in herkömmlicher 2D-Kultur getestet, ob und auf welche Weise die relativen Apoptoserate der SW480-Zellen in Mono- und Kokultur mit PBMC mit der gemessenen TNF α -Konzentration in ihren zellfreien Überständen korrelieren, um herauszufinden ob die Apoptoseinduktion über soluble Stoffe abläuft. Während des zeitlichen Verlaufs wurden nicht nur mithilfe des M30-ELISAs die Apoptoserate der SW480-Zellen gemessen, sondern auch die TNF α -Konzentrationen in den korrespondierenden Zellkultur-Überständen. Die ermittelten Daten wurden anschließend graphisch dargestellt und ausgewertet.

2.10.8.7 2D Kultivierung von SW480-Zellen mit PBMC: Vergleich der relativen Apoptoserate der SW480-Zellen nach Zugabe von konditioniertem Medium

Experiment 2.10.8.7:

Fragestellung: Können von PBMC sezernierte soluble Faktoren in 2D kultivierten SW480-Zellen Apoptose induzieren?

Mit diesem Experiment wurde in 2D-Kultur getestet, ob ein im Vorfeld durch PBMC Zugabe im 2D-System aktivierter zellfreier Zellkultur-Überstand (konditioniertes Medium) bzw. seine enthaltenen solublen Faktoren, die durch PBMC sezerniert wurden, einen Einfluss auf die Apoptose von SW480-Zellen haben. Während des zeitlichen Verlaufs wurde sowohl von dem vorangegangenen

2D-Experiment (Ansatz I) als auch von dem eigentlichen nachfolgenden 2D-Experiment (Ansatz II) mithilfe des M30-ELISAs die Apoptoserate der SW480-Zellen mit und ohne PBMC (Ansatz I) bzw. mit und ohne konditioniertes Medium (Ansatz II) gemessen, zueinander in Relation gesetzt und graphisch dargestellt. Ziel war es herauszufinden, ob im Vorfeld durch PBMC aktivierte soluble Stoffe im Zellkultur-Überstand in der Lage sind im Gegensatz zu nicht-aktivierten solublen Stoffen bei den SW480-Zellen Apoptose zu induzieren.

2.10.8.8 3D Kultivierung von SW480-Zellen mit PBMC: Vergleich der relativen Apoptoserate der SW480-Zellen nach Zugabe von konditioniertem Medium

Experiment 2.10.8.8:

Fragestellung: Können von PBMC sezernierte soluble Faktoren in 3D kultivierten SW480-Zellen Apoptose induzieren?

Mit diesem Experiment wurde analog zu dem Experiment 2.10.8.7 (2D-Kultur) in 3D-Kultur getestet, ob ein im Vorfeld durch PBMC Zugabe im 2D-System aktivierter zellfreier Zellkultur-Überstand (konditioniertes Medium) bzw. die enthaltenen solublen Faktoren, die durch PBMC sezerniert wurden, einen Einfluss auf die Apoptose von SW480-Zellen haben. Während des zeitlichen Verlaufs wurde sowohl von dem vorangegangenen 2D-Experiment (Ansatz I) als auch von dem eigentlichen nachfolgenden 3D-Experiment (Ansatz II) mithilfe des M30-ELISAs die Apoptoserate der SW480-Zellen mit und ohne PBMC (Ansatz I) bzw. mit und ohne konditioniertes Medium (Ansatz II) gemessen, zueinander in Relation gesetzt und graphisch dargestellt. Ziel war es herauszufinden, ob im Vorfeld aktivierte soluble Stoffe im Überstand der mit PBMC kokultivierten SW480-Zellen in der Lage sind, in den 3D kultivierten SW480-Zellen Apoptose zu induzieren. Des Weiteren wurden parallel zu den M30-Konzentrationen die TNF α - und IFN γ -Konzentrationen gemessen, um zu testen, ob die Apoptoserate der SW480-Zellen mit der TNF α - und IFN γ -Konzentrationen der jeweiligen Überstände korrelieren.

2.10.8.9 TNF α - und IFNY-Konzentrationsänderungen im 3D-System mit SW480-Zellen nach Zugabe von konditioniertem Medium

Experiment 2.10.8.9:

Fragestellung: Welche immunologischen Vorgänge spielen bei der Induktion der Apoptose durch das konditionierte 2D-Medium im 3 D System eine Rolle? Sind dabei TNF α - und IFNY wichtige Zytokine?

Dieses Experiment wurde analog zum Experiment 2.10.8.8 durchgeführt. Gemessen wurden die TNF α - und IFNY-Konzentrationsänderungen in den Zellkulturüberständen nach Konfrontation mit SW480-Zellen um herauszufinden ob sie eine wichtige Rolle bei der Induktion der Apoptose der SW480-Zellen spielen. Man hat also die TNF α - und die IFNY-Konzentrationen der aktivierten zellfreien PBMC-Überstände aus dem 2D-Ansatz I nach 24 h ohne Konfrontation mit SW480-Zellen (unbehandelt) mit den TNF α - und die IFNY-Konzentrationen nach Konfrontation mit SW480-Zellen (behandelt) verglichen. Während des zeitlichen Verlaufs wurden nicht nur mithilfe des M30-ELISAs die Apoptoserate der SW480-Zellen gemessen, sondern auch die TNF α - und IFNY-Konzentrationen in den korrespondierenden Zellkultur-Überständen. Die ermittelten Daten wurden anschließend graphisch dargestellt und ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 2D Kokultivierung von Fibroblasten und SW480-Zellen mit PBMC: Vergleich der relativen Apoptoserate nach Zugabe von PBMC

3.1.1 Bestimmung einer Grund-Apoptoserate

Das Ergebnis des M30-ELISAs aus Experiment 2.10.8.1 ist in der Abbildung 5 und in der Abbildung 6 graphisch dargestellt.

Zu sehen ist der Verlauf der relativen Apoptoseraten von 2D kultivierten SWW480-Zellen in MK und in KK mit Fibroblasten nach Zugabe von 1, 2 und 3 Millionen PBMC über die Zeit von 24 bis 72 Stunden.

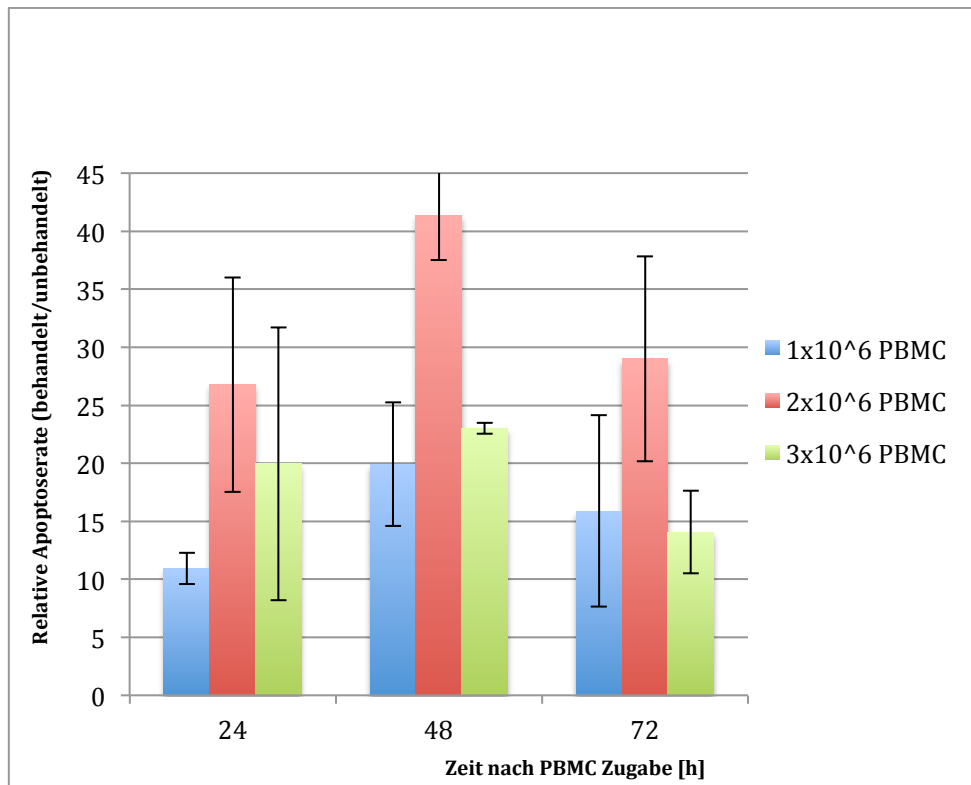


Abb. 5: 2D: Relative Apoptoseraten (behandelt/unbehandelt) der MK SW480 nach Zugabe von 1, 2 und 3 Millionen PBMC. In die Berechnung der relativen Apoptoseraten (**Kapitel 2.10.7.2**) gingen die Mittelwerte der M30-Konzentrationen der Zellkultur-Überstände der Duplikate von (mit PBMC) behandelten Proben und von unbehandelten Proben (ohne PBMC) von einem Experiment mit einem Duplikat ein. Die Standardabweichungen beziehen sich auf die Duplikate eines Experimentes.

Die Apoptoserate beträgt in 2D-MK SW480 nach Zugabe von 1×10^6 PBMC nach 24 h den 10,94fachen Wert (Standardabweichung: 1,34) der unbehandelten Kontrolle (ohne PBMC), nach 48 h den 19,92fachen Wert (Standardabweichung: 5,35) und nach 72 h den 15,88fachen Wert (Standardabweichung: 8,24) (**blaue Balken in Abb. 5**). Nach Zugabe von 2×10^6 PBMC beträgt die Apoptoserate der behandelten Probe nach 24 h das 26,78fache (Standardabweichung: 9,24), nach 48 h das 41,39fache (Standardabweichung: 3,87) und nach 72 h das 29,00fache (Standardabweichung: 8,85) der Apoptoserate der unbehandelten Kontrolle (**rote Balken in Abb. 5**). Nach Zugabe von 3×10^6 PBMC beträgt die Apoptoserate der behandelten Probe nach 24 h das 19,94fache (Standardabweichung: 11,74), nach 48 h das 23,01fache (Standardabweichung: 0,47) und nach 72 h das 14,05fache (Standardabweichung: 3,56) der Apoptoserate der unbehandelten Kontrolle (**grüne Balken in Abb. 5**).

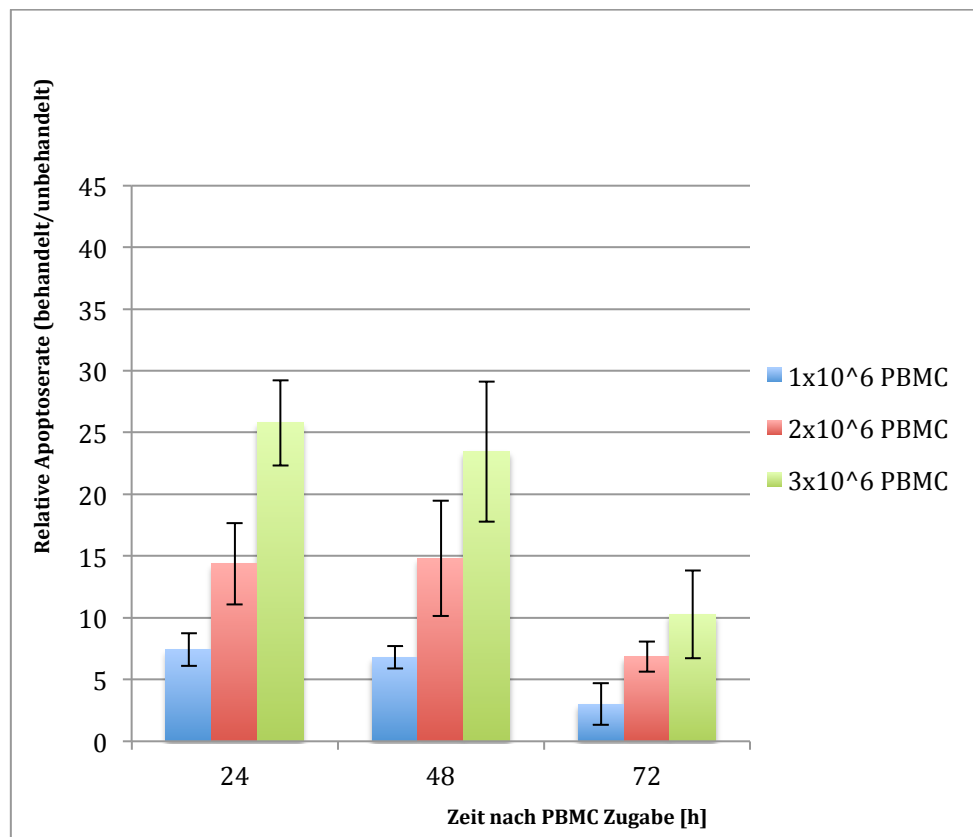


Abb. 6: 2D: Relative Apoptoseraten (behandelt/unbehandelt) der KK SW480/Fibroblasten nach Zugabe von 1, 2 und 3 Millionen PBMC. In die Berechnung der relativen Apoptoseraten (Kapitel 2.10.7.2) gingen die Mittelwerte der M30-Konzentrationen der Zellkultur-Überstände von (mit PBMC) behandelten Proben und von unbehandelten Proben (ohne PBMC) von einem Experiment mit den jeweiligen Duplikat ein. Die Standardabweichungen beziehen sich auf die Duplikate eines Experimentes.

Die Apoptoserate beträgt in 2D-KK SW480/Fibroblasten nach Zugabe von 1×10^6 PBMC nach 24 h den 7,42fachen Wert (Standardabweichung: 1,31) der unbehandelten Kontrolle (ohne PBMC), nach 48 h den 6,80fachen Wert (Standardabweichung: 0,91) und nach 72 h den 3,01fachen Wert (Standardabweichung: 1,68) (**blaue Balken in Abb. 6**). Nach Zugabe von 2×10^6 PBMC beträgt die Apoptoserate der behandelten Probe nach 24 h das 14,37fache (Standardabweichung: 3,31), nach 48 h das 14,81fache (Standardabweichung: 4,68) und nach 72 h das 6,85fache (Standardabweichung: 1,23) der Apoptoserate der unbehandelten Kontrolle (**rote Balken in Abb. 6**). Nach Zugabe von 3×10^6 PBMC beträgt die Apoptoserate der behandelten Probe nach 24 h das 25,78fache (Standardabweichung: 3,46), nach 48 h das 23,46fache (Standardabweichung: 5,68) und nach 72 h das 10,28fache (Standardabweichung: 3,56) der Apoptoserate der unbehandelten Kontrolle (**grüne Balken in Abb. 6**).

Im direkten Vergleich der relativen Apoptoseraten der MK SW480 mit der KK SW480/Fibroblasten sehen die durchschnittlichen relativen Apoptoseraten aller drei PBMC-Populationen der drei Zeitpunkte wie folgt aus: 1) 24 h (MK: 19,22; KK: 15,86), 2) 48 h (MK: 28,11; KK: 15,02) und 3) 72 h (MK: 19,64; KK: 6,71).

3.1.2 Mikroskopische Charakterisierung der Zellmorphologien

Das Ergebnis der mikroskopischen Charakterisierung der Zellkulturen aus Experiment 2.10.8.1 ist in Abbildung 7 dargestellt. SW480-Zellen reagieren in 2D-Zellkulturen stark auf die Anwesenheit der PBMC.

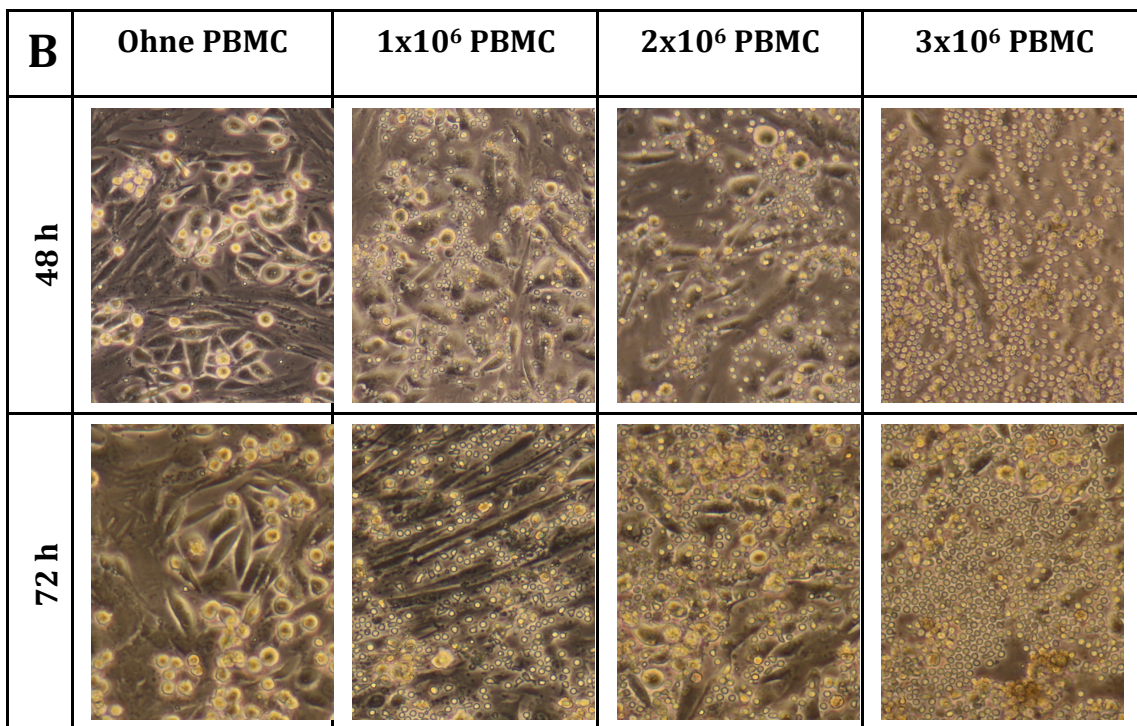
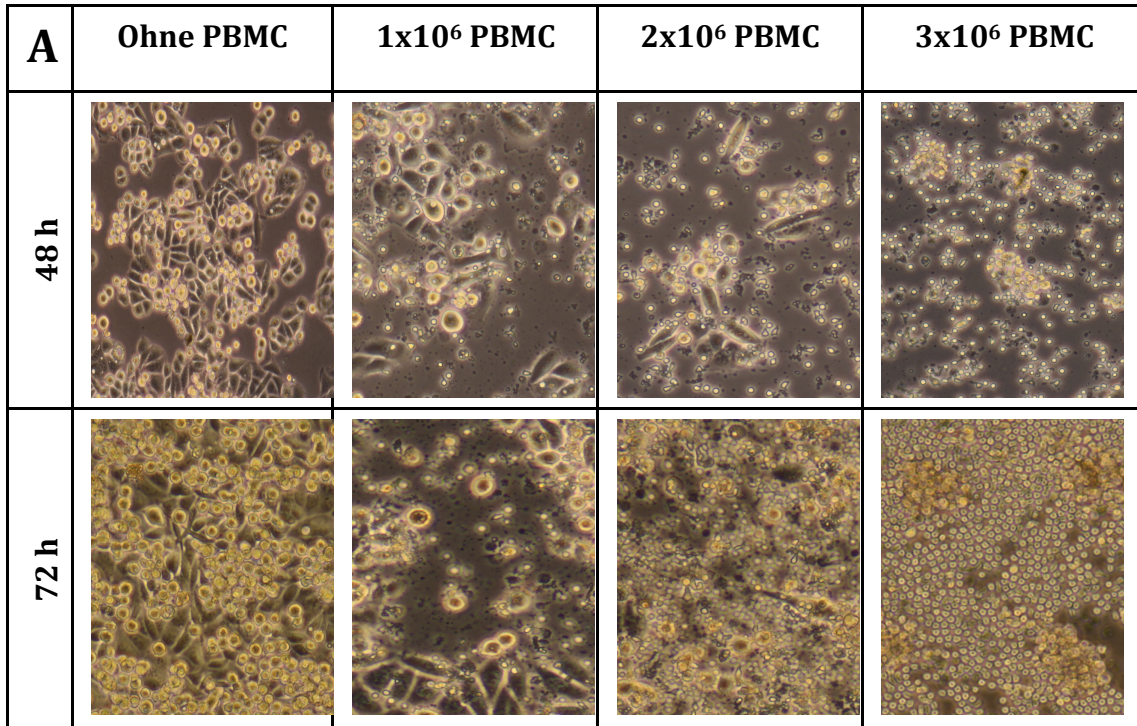


Abb. 7: Mikroskopische Darstellung der Zellzahl und Zellmorphologie der MK SW480 (A) und der KK SW480/Fibroblasten (B) mit unterschiedlichen PBMC-Konzentrationen nach 48 h und 72 h.

Man erkennt im zeitlichen Verlauf sehr deutlich, dass die Zellzahl der SW480-Zellen mit steigender PBMC Konzentration in MK (**Abb. 7A**) und in KK mit

dermalen Fibroblasten (**Abb. 7B**) abnimmt. Dabei sind die verbliebenen SW480-Zellen zellmorphologisch kleiner und abgerundeter als die unbehandelten Zellen.

3.2 3D Kultivierung von SW480-Zellen mit und ohne Fibroblasten mit PBMC: Vergleich der relativen Apoptoserate der SW480-Zellen nach Zugabe von PBMC

Das Ergebnis des M30-ELISAs aus Experiment 2.10.8.2 (Kokultur mit Fibroblasten) ist nachfolgend in der Abbildung 8 und das Ergebnis des M30-ELISAs aus Experiment 2.10.8.3 (Monokultur ohne Fibroblasten) ist nachfolgend in der Abbildung 9 graphisch dargestellt. Die Apoptoserate von SW480 Zellen ändert sich in der 3D-Kultur nicht wesentlich nach Zugabe von 1×10^6 PBMC, sowohl in MK als auch in KK mit Fibroblasten.

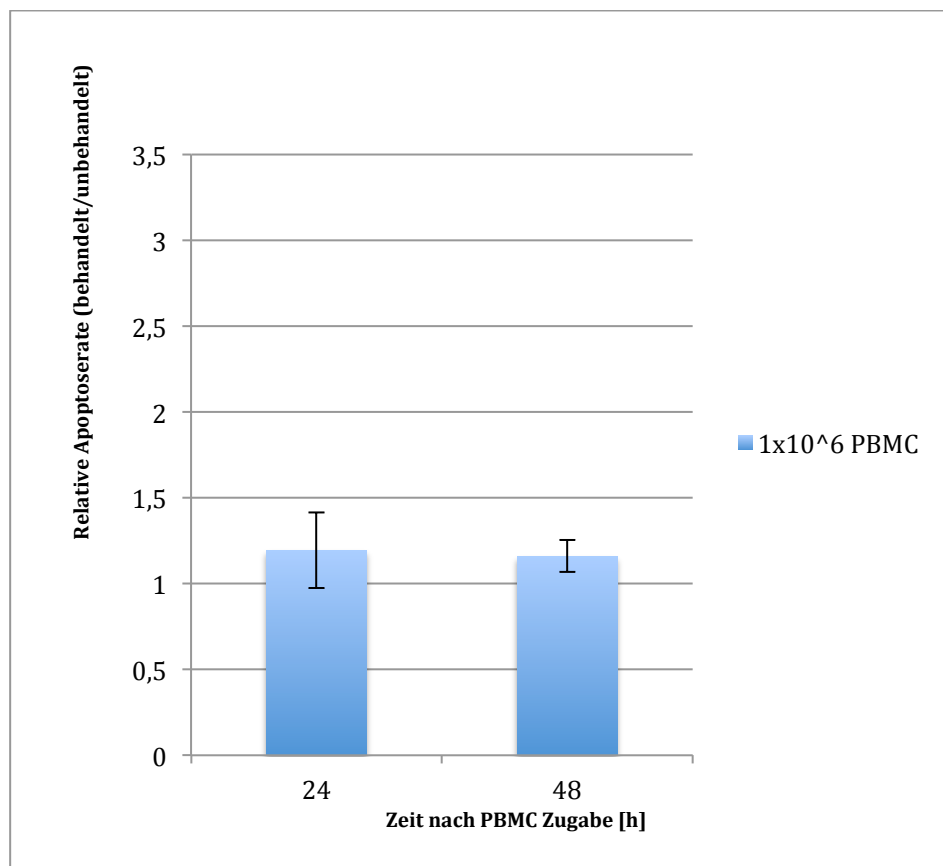


Abb. 8: 3D: Relative Apoptoseraten (behandelt/unbehandelt) der MK SW480 nach Zugabe von 1, 2 und 3 Millionen PBMC. In die Berechnung der relativen Apoptoseraten (**Kapitel 2.10.7.2**) gingen die Mittelwerte der M30-Konzentrationen der Zellkultur-Überstände von (mit PBMC) behandelten Proben und von unbehandelten Proben (ohne PBMC) von zwei Experimenten ein.

Die Apoptoserate beträgt in 3D-MK SW480 nach Zugabe von 1×10^6 PBMC nach 24h den 1,19fachen Wert (Standardabweichung: 0,22) der unbehandelten Kontrolle (ohne PBMC) und nach 48 h den 1,16fachen Wert (Standardabweichung: 0,09).

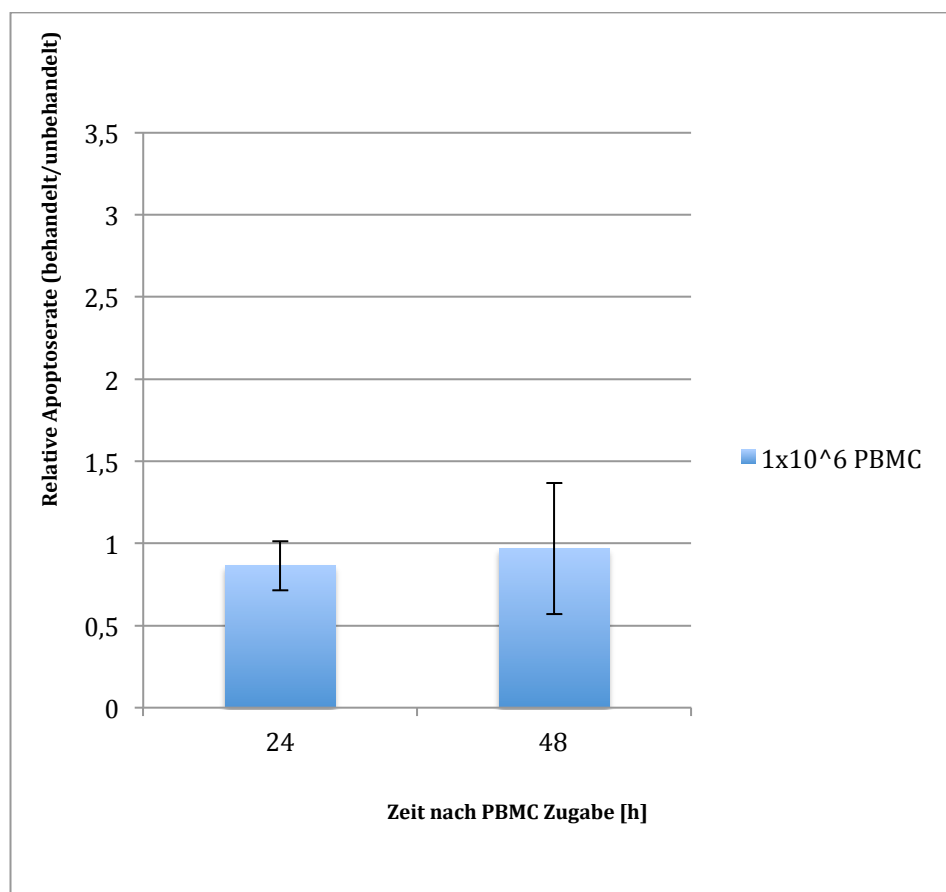


Abb. 9: 3D: Relative Apoptoseraten (behandelt/unbehandelt) der KK SW480/Fibroblasten nach Zugabe von 1 Millionen PBMC. In die Berechnung der relativen Apoptoseraten (Kapitel 2.10.7.2) gingen die Mittelwerte der M30-Konzentrationen der Zellkultur-Überstände von (mit PBMC) behandelten Proben und von unbehandelten Proben (ohne PBMC) von zwei Experimenten ein.

Die Apoptoserate beträgt in 3D-KK SW480/Fibroblasten nach Zugabe von 1×10^6 PBMC nach 24h den 0,86fachen Wert (Standardabweichung: 0,14) der unbehandelten Kontrolle (ohne PBMC) und nach 48 h den 0,97fachen Wert (Standardabweichung: 0,39).

3.3 3D Kokultivierung von SW480-Zellen mit und ohne Fibroblasten mit PBMC: Vergleich der relativen Apoptoserate der SW480-Zellen nach Zugabe unterschiedlich vieler PBMC

3.3.1 Relative Apoptoserate der SW480-Zellen

Das Ergebnis des M30-ELISAs aus dem Experiment 2.10.8.4 ist in der Abbildung 10 und das Ergebnis des M30-ELISAs aus dem Experiment 2.10.8.5 in der Abbildung 11 graphisch dargestellt. Ziel war es herauszufinden, welche Menge an PBMC in 3D die Apoptoseraten der SW480-Zellen in welcher Weise beeinflusst.

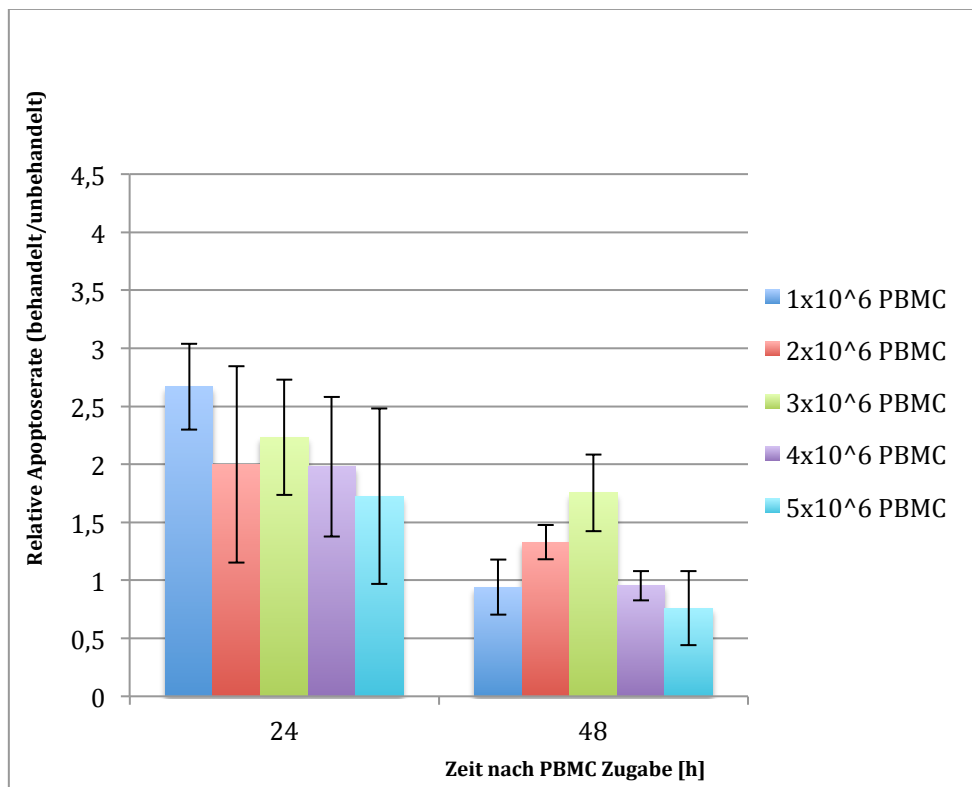


Abb. 10: 3D: Relative Apoptoseraten (behandelt/unbehandelt) der MK SW480 nach Zugabe von 1, 2, 3, 4, und 5 Millionen PBMC. In die Berechnung der relativen Apoptoseraten (Kapitel 2.10.7.2) gingen die Mittelwerte der M30-Konzentrationen der Zellkultur-Überstände von (mit PBMC) behandelten Proben und von unbehandelten Proben (ohne PBMC) von zwei Experimenten ein.

Die Apoptoserate beträgt in 3D-MK SW480 nach Zugabe von 1×10^6 PBMC nach 24 h den 2,67fachen Wert (Standardabweichung: 0,37) der unbehandelten Kontrolle (ohne PBMC) und nach 48 h den 0,94fachen Wert (Standardabweichung: 0,23) **(blaue Balken in Abb. 10)**. Nach der Zugabe von 2×10^6 PBMC beträgt die Apoptoserate der behandelten Probe nach 24 h das 2,00fache (Standardabweichung: 0,85) der unbehandelten Kontrolle und nach 48 h das 1,33fache (Standardabweichung: 0,15) **(rote Balken in Abb. 10)**. Nach der Zugabe von 3×10^6 PBMC beträgt die Apoptoserate der behandelten Probe nach 24 h das 2,23fache (Standardabweichung: 0,50) der unbehandelten Kontrolle und nach 48 h das 1,75fache (Standardabweichung: 0,33) **(grüne Balken in Abb. 10)**. Nach der Zugabe von 4×10^6 PBMC beträgt die Apoptoserate der behandelten Probe nach 24 h das 1,98fache (Standardabweichung: 0,60) der unbehandelten Kontrolle und nach 48 h das 0,95fache (Standardabweichung: 0,12) **(violette Balken in Abb. 10)**. Nach der Zugabe von 5×10^6 PBMC beträgt die Apoptoserate der behandelten Probe nach 24 h das 1,72fache (Standardabweichung: 0,76) der unbehandelten Kontrolle und nach 48 h das 0,76fache (Standardabweichung: 0,32) **(türkise Balken in Abb. 10)**.

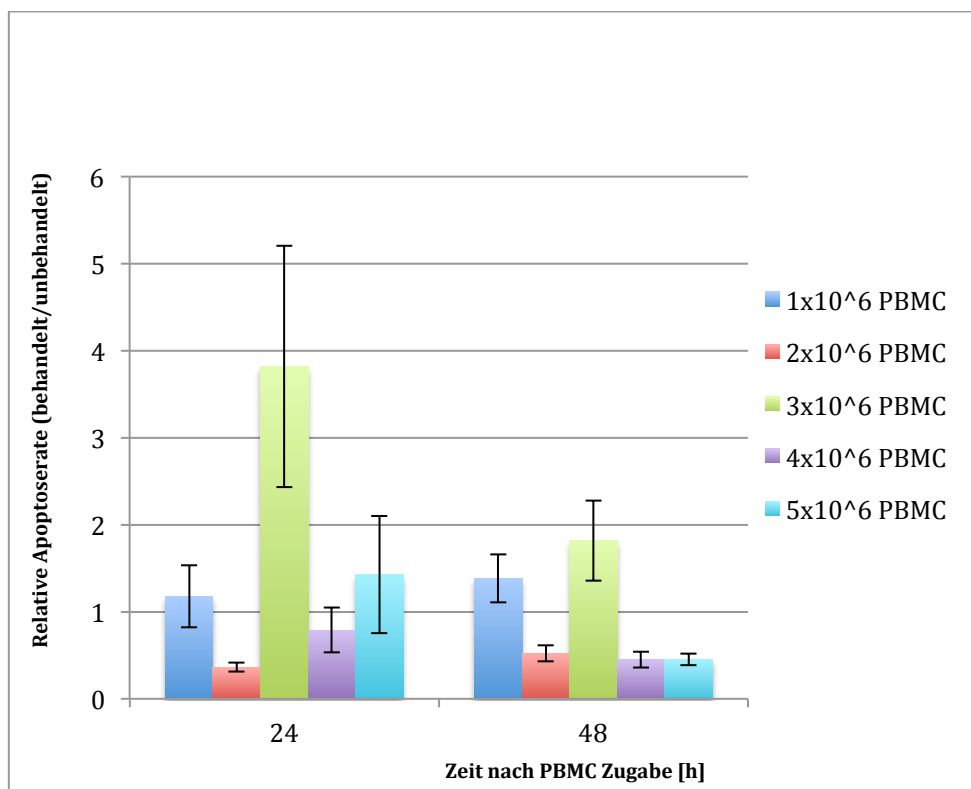


Abb. 11: 3D: Relative Apoptoseraten (behandelt/unbehandelt) der KK SW480/Fibroblasten nach Zugabe von 1, 2, 3, 4, 5 und 6 Millionen PBMC. In die Berechnung der relativen Apoptoseraten (**Kapitel 2.10.7.2**) gingen die Mittelwerte der M30-Konzentrationen der Zellkultur-Überstände von (mit PBMC) behandelten Proben und von unbehandelten Proben (ohne PBMC) von zwei Experimenten ein.

Die Apoptoserate beträgt in 3D-KK SW480/Fibroblasten nach Zugabe von 1×10^6 PBMC nach 24 h den 1,18fachen Wert (Standardabweichung: 0,36) der unbehandelten Kontrolle (ohne PBMC) und nach 48 h den 1,39fachen Wert (Standardabweichung: 0,27) (**blaue Balken in Abb. 11**). Nach der Zugabe von 2×10^6 PBMC beträgt die Apoptoserate der behandelten Probe nach 24 h das 0,36fache (Standardabweichung: 0,05) der unbehandelten Kontrolle und nach 48 h das 0,52fache (Standardabweichung: 0,09) (**rote Balken in Abb. 11**). Nach der Zugabe von 3×10^6 PBMC beträgt die Apoptoserate der behandelten Probe nach 24 h das 3,82fache (Standardabweichung: 1,39) der unbehandelten Kontrolle und nach 48 h das 1,81fache (Standardabweichung: 0,45) (**grüne Balken in Abb. 11**). Nach der Zugabe von 4×10^6 PBMC beträgt die Apoptoserate der behandelten Probe nach 24 h das 0,79fache (Standardabweichung: 0,26) der unbehandelten Kontrolle und nach 48 h das 0,45fache (Standardabweichung: 0,09) (**violette Balken in Abb. 11**). Nach der Zugabe von 5×10^6 PBMC beträgt die Apoptoserate der behandelten Probe nach 24 h das 1,42fache (Standardabweichung: 0,67) der

unbehandelten Kontrolle und nach 48 h das 0,45fache (Standardabweichung: 0,06) **(türkise Balken in Abb. 11)**.

Im direkten Vergleich der relativen Apoptoseraten der SW480-Zellen in der MK SW480 mit der KK SW480/Fibroblasten sehen die durchschnittlichen relativen Apoptoseraten der fünf PBMC-Populationen der zwei Zeitpunkte wie folgt aus: 1) 24 h (MK: 2,12; KK: 1,51) und 2) 48 h (MK: 1,15; KK: 0,92).

3.3.2 Immunhistologische Färbung der 3D-Modelle

Nach 14 Tagen 3D-Kultur der SW480-Zellen und Fibroblasten wurden die Modelle immunhistologisch charakterisiert, um herauszufinden, wie sich die Zellen im dreidimensionalen Raum räumlich und zellmorphologisch über die Zeit entwickelt haben. Das Intermediärfilament Vimentin ist typisch für Zellen mesenchymalen Charakters, wie sie SW480-Subpopulationen oder primäre Fibroblasten aufweisen und Pan-Zytokeratin (engl. *pan cytokeratin*, PCK) ist ein epithelialer Marker. In der dargestellten Abbildung **(Abb. 12)** ist sehr gut zu erkennen, dass die SW480-Zellen Monolayer auf der Matrixoberfläche ausbilden und in die azellularisierte Darmmatrix einwandern. Die Abbildung 13 zeigt die KK mit Fibroblasten. In der KK wird die Kryptenstruktur der Matrix zerstört. Es ist keine Schichtstruktur mehr erkennbar. Es zeigt sich also, wenn hoch maligne kolorektale SW480-Tumorzellen zusammen mit dermalen Fibroblasten kultiviert werden, bilden sich Tumorcluster. Es ist bekannt, dass Subpopulationen der SW480-Zellen in 2D sowohl mesenchymalen als auch epithelialen Charakter aufweisen können, während sie in 3D-Zellkultur hauptsächlich epithelial sind [88]. So sind SW480-Zellen in der MK des 3D-Systems nur schwach Vimentin-positiv im Gegensatz zu Zellen in 2D-Zellkultur [41]. In der KK mit Fibroblasten sind die Fibroblasten stark Vimentin-positiv **(Abb. 13, C, D)**.

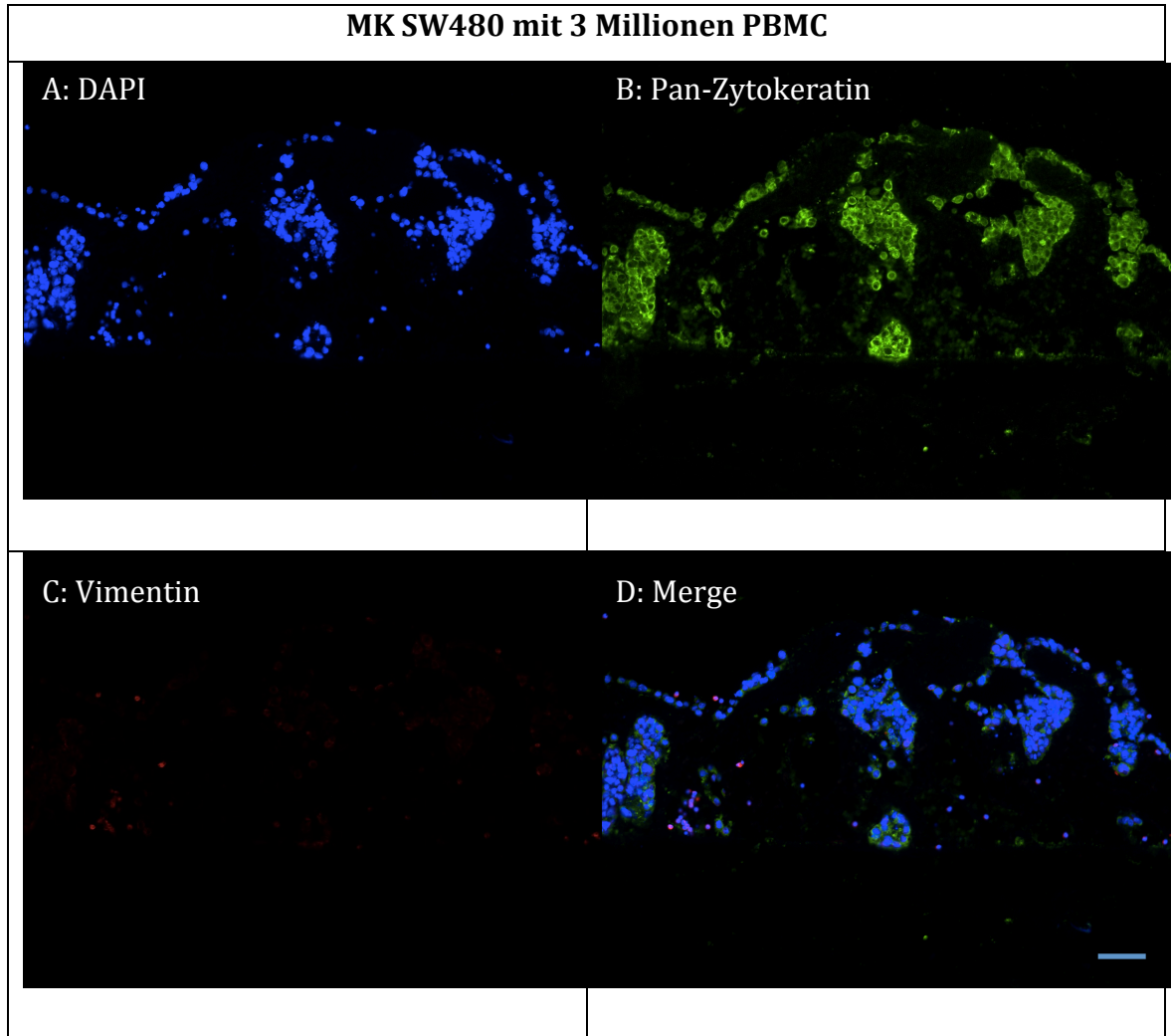


Abb. 12: Immunhistologische Charakterisierung der 3D-MK SW480 stimuliert mit 3 Millionen PBMC. Scale Bar in D: 100 μm für A bis D. Pan-Zytokeratin-positive Zellen (SW480-Zellen; grün) bilden ein Monolayer auf der Oberfläche der Darmmatrix und wandern in die Submukosa ein.

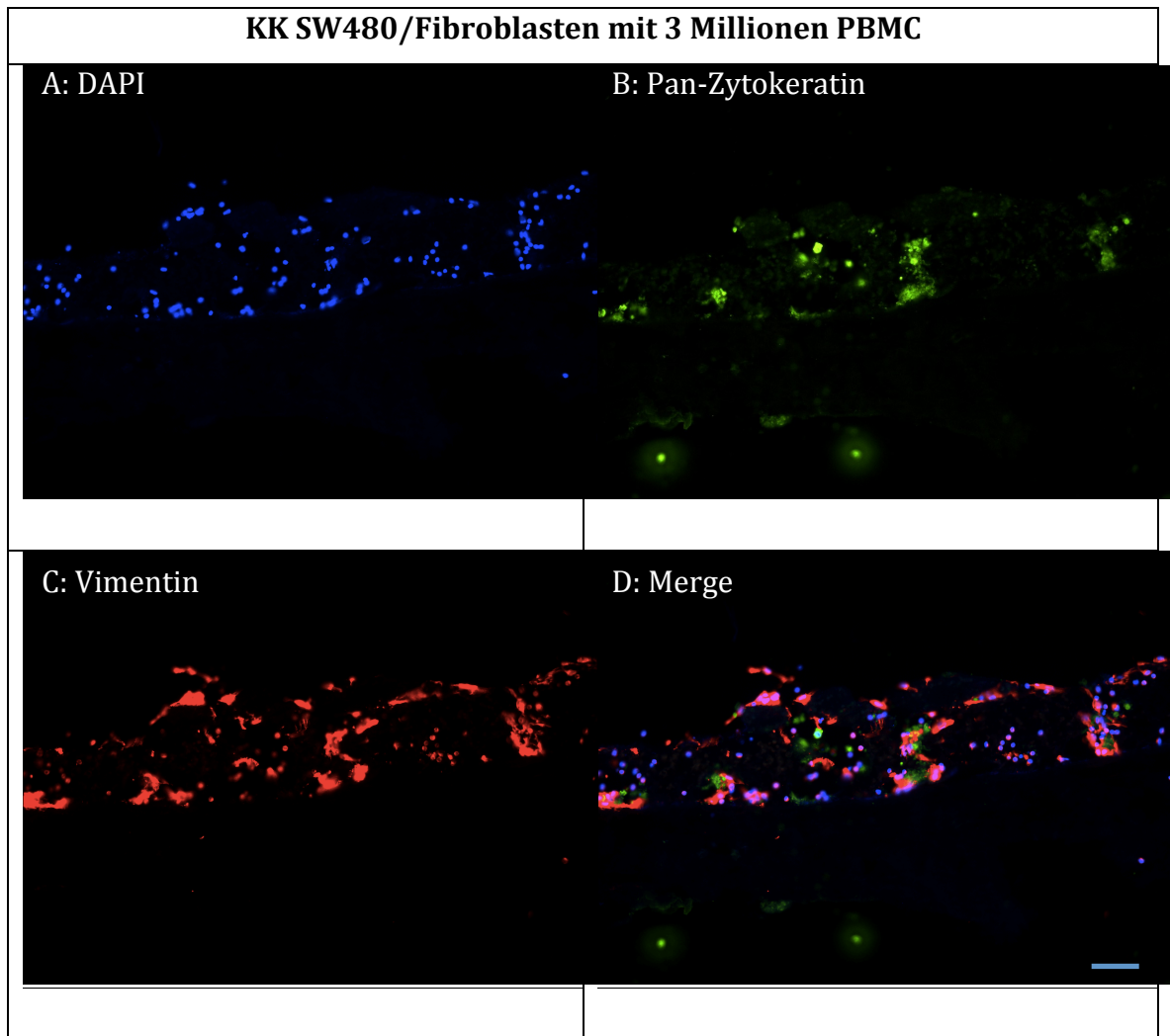


Abb. 13: Immunhistologische Charakterisierung der 3D-KK SW480/Fibroblasten stimuliert mit 3 Millionen PBMC. Scale Bar in D: 100 μm für A bis D. Vimentin- (Fibroblasten; rot) und Pan-Zytokeratin- (SW480-Zellen; grün) positive Zellen sind zu sehen. In der KK wird die Kryptenstruktur der Matrix zerstört. Es ist keine Layerstruktur mehr erkennbar.

3.3.3 Vergleich der relativen Apoptoserate der SW480-Zellen im 2D-System mit derjenigen im 3D-System

Nach Ermittlung der optimalen Konzentration an PBMC (2 Millionen) wurden die relativen Apoptoseraten der 2D- und 3D-Kultur miteinander verglichen.

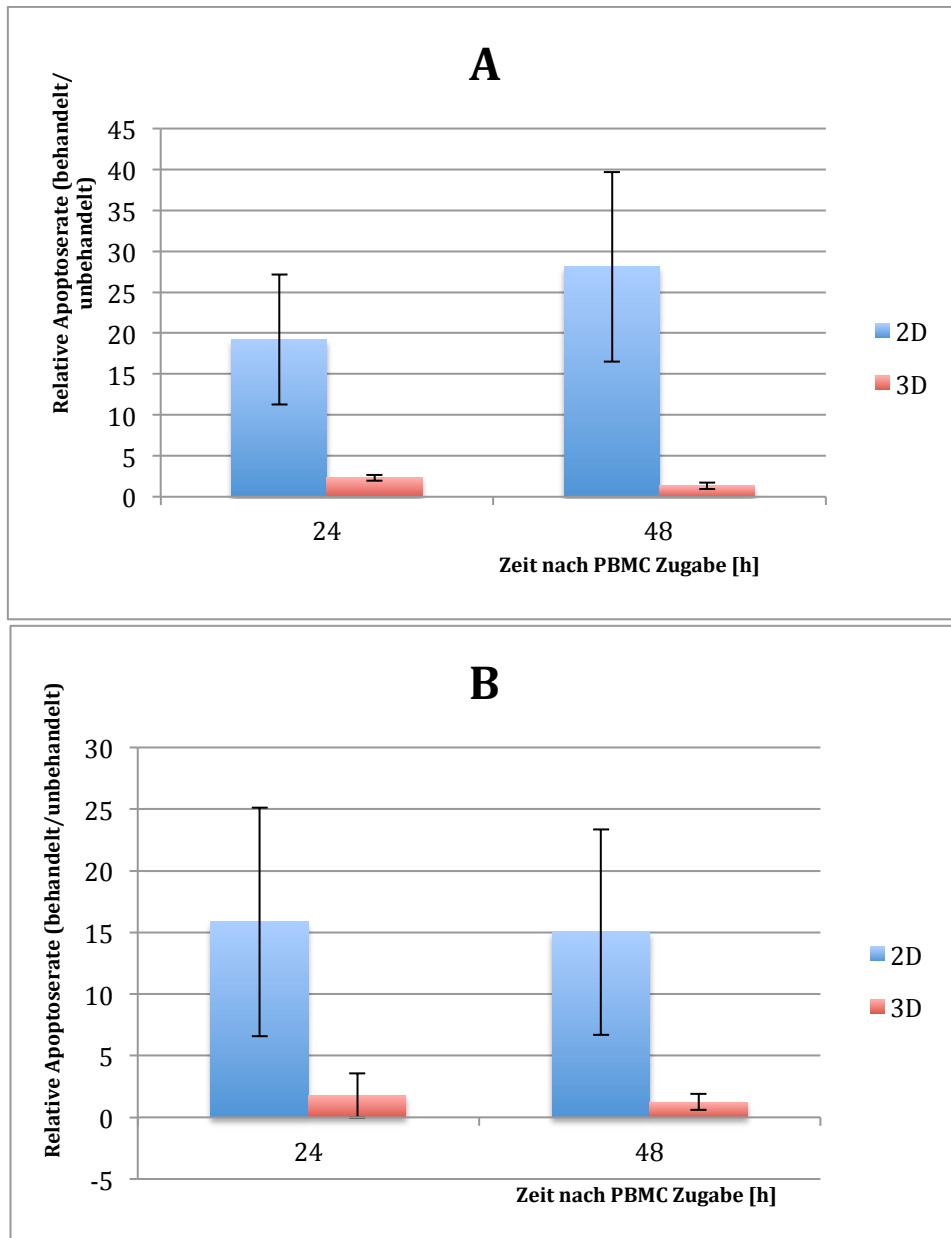


Abb. 14: A) MK: Vergleich der relativen Apoptoseraten (behandelt/unbehandelt) der MK SW480 nach Zugabe von 2 Millionen PBMC im 2D-System mit den korrespondierenden relativen Apoptoseraten im 3D-System. B) KK: Vergleich der relativen Apoptoseraten (behandelt/unbehandelt) der KK SW480/Fibroblasten nach Zugabe von 2 Millionen PBMC im 2D-System mit den korrespondierenden relativen Apoptoseraten im 3D-System. In die Berechnung der relativen Apoptoseraten (Kapitel 2.10.7.2) gingen die Mittelwerte der M30-Konzentrationen der Zellkultur-Überstände von (mit PBMC) behandelten Proben und von unbehandelten Proben (ohne PBMC) von zwei Experimenten ein

Die Apoptoserate der behandelten Probe (mit PBMC) beträgt in MK SW480 nach Zugabe von 2×10^6 PBMC nach 24 h im 2D-System das 19,22fache (Standardabweichung: 7,94) **(linker blauer Balken in Abb. 14A)** der Apoptoserate der unbehandelten Probe (ohne PBMC) und im 3D-System das 2,30fache (Standardabweichung: 0,34) **(linker roter Balken in Abb. 14A)**. Nach Zugabe von 2×10^6 PBMC beträgt die Apoptoserate der behandelten Probe (mit PBMC) nach 48 h im 2D-System das 28,11fache (Standardabweichung: 11,61) **(rechter blauer Balken in Abb. 14A)** der Apoptoserate der unbehandelten Probe (ohne PBMC) und im 3D-System das 1,34fache (Standardabweichung: 0,41) **(rechter roter Balken in Abb. 14A)**.

Die Apoptoserate der behandelten Probe (mit PBMC) beträgt in KK SW480/Fibroblasten nach Zugabe von 2×10^6 PBMC nach 24 h im 2D-System das 15,85fache (Standardabweichung: 9,27) **(linker blauer Balken in Abb. 14B)** der Apoptoserate der unbehandelten Probe (ohne PBMC) und im 3D-System das 1,79fache (Standardabweichung: 1,80) **(linker roter Balken in Abb. 14B)**. Nach Zugabe von 2×10^6 PBMC beträgt die Apoptoserate der behandelten Probe (mit PBMC) nach 48 h im 2D-System das 15,02fache (Standardabweichung: 8,33) **(rechter blauer Balken in Abb. 14B)** der Apoptoserate der unbehandelten Probe (ohne PBMC) und im 3D-System das 1,24fache (Standardabweichung: 0,66) **(rechter roter Balken in Abb. 14B)**.

3.4 2D Kokultivierung von SW480-Zellen mit PBMC: Korrelation der relativen Apoptoserate der SW480-Zellen und der TNF α -Produktion der PBMC

Das Ergebnis des TNF α -ELISAs aus dem Experiment 2.10.8.6 wurde in der Abbildung 17 graphisch dargestellt. Die Korrelation der relativen Apoptoserate der SW480-Zellen mit der TNF α -Produktion der PBMC wurde untersucht, um festzustellen, welche immunologischen Vorgänge bei der Induktion der Apoptose eine Rolle spielen.

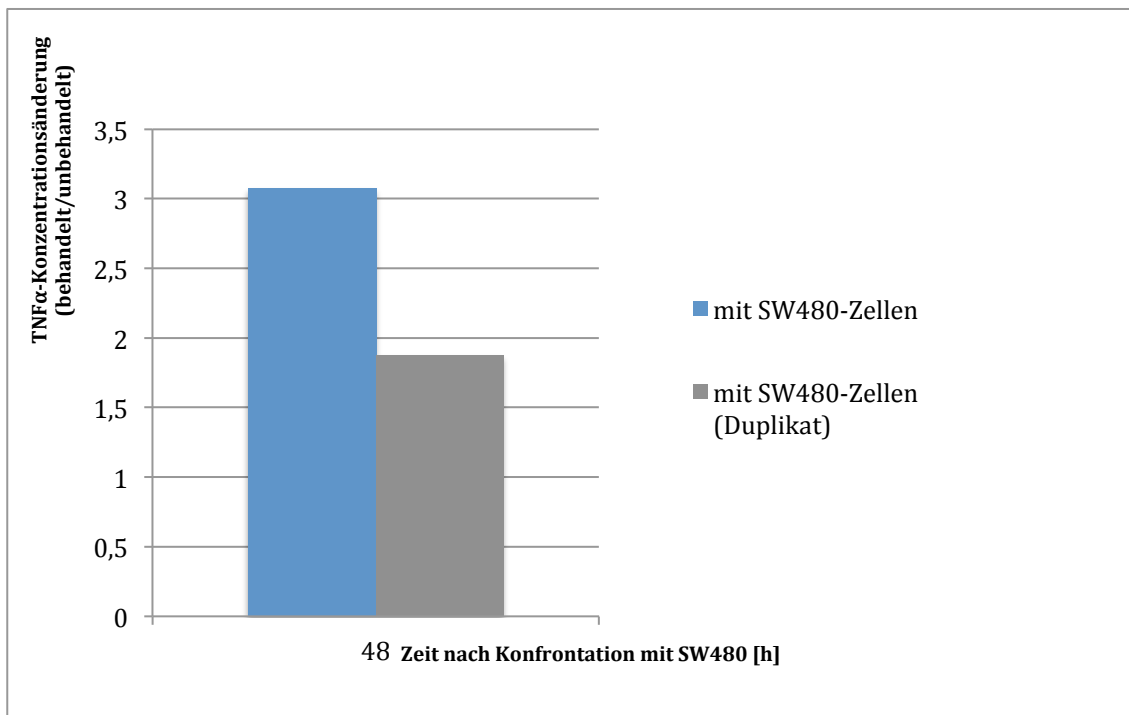


Abb. 15: TNF α -Konzentrationsänderungen im Zellkultur-Überstand von mit SW480-Zellen kultivierten (=behandelten) PBMC im Vergleich zu monokultivierten (=nicht-behandelten) PBMC. In die Berechnung der dargestellten TNF α -Konzentrationsänderungen gingen die Werte der TNF α -Konzentrationen der Zellkultur-Überstände von (mit SW480-Zellen) behandelten Proben und von unbehandelten Proben (ohne SW480-Zellen) von einem Experiment mit einem Duplikat ein.

Die TNF α -Konzentration der MK PBMC der behandelten Probe (mit SW480-Zellen) ist nach 48 h verglichen mit der TNF α -Konzentration der unbehandelten Probe (ohne SW480-Zellen) um das 3,08fache höher im 2D-System (**blauer Balken in Abb. 15**) (Duplikat: 1,8fache (**grauer Balken in Abb. 15**)).

3.5 2D Kokultivierung von SW480-Zellen mit PBMC: Vergleich der relativen Apoptoserate der SW480-Zellen nach Zugabe von konditioniertem Medium

Das Ergebnis des M30-ELISAs aus dem Experiment 2.10.8.7 wurde ausgewertet und nachfolgend in den Abbildungen 18 und 19 graphisch dargestellt und ausführlich erläutert. Es wurde die relative Apoptoserate der SW480-Zellen nach Zugabe von konditioniertem Medium beobachtet und diese mit der relativen Apoptoserate der SW480-Zellen in nicht-konditioniertem Medium verglichen. Bei dem konditionierten Medium handelt es sich um zellfreien „aktivierten“ Überstand

von SW480-Zellen nach Zugabe von PBMC. Das Ziel war es herauszufinden, ob die solublen aktivierten Stoffe im Überstand in der Lage sind eine Apoptose bei den Tumorzellen zu induzieren.

Der zellfreie aktivierte Zellkultur-Überstand des 2D-Systems (=konditioniertes Medium) wird auf das 2D-System gegeben

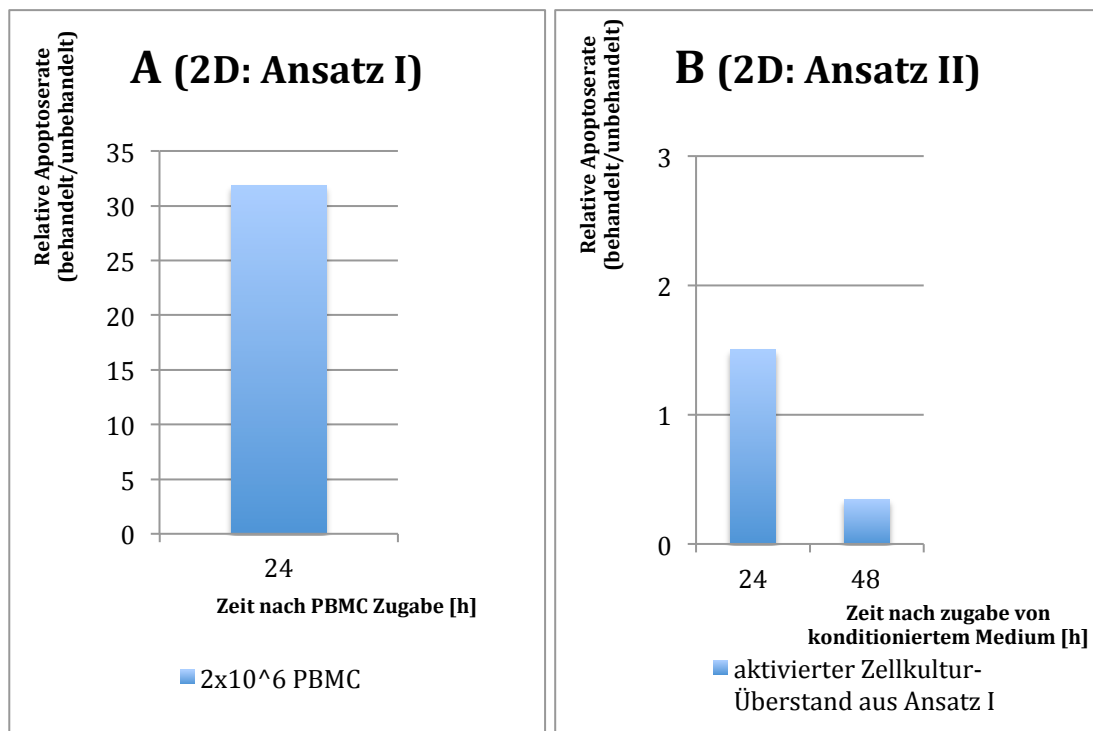


Abb. 16: A) Ansatz I 2D: Relative Apoptoserate (behandelt/unbehandelt) der MK SW480 nach Zugabe von 2 Millionen PBMC. In die Berechnung der relativen Apoptoseraten (Kapitel 2.10.7.2) gingen die Werte der M30-Konzentrationen der Zellkultur-Überstände von (mit PBMC) behandelten Proben und von unbehandelten Proben (ohne PBMC) von einem Experimenten ein.

B) Ansatz II 2D: Vergleich der relativen Apoptoseraten der MK SW480 nach Zugabe von aktiviertem Zellkultur-Überstand aus Ansatz I (behandelt) mit den relativen Apoptoseraten ohne die Zugabe von aktiviertem Zellkultur-Überstand (unbehandelt). In die Berechnung der relativen Apoptoseraten (Kapitel 2.10.7.2) gingen die Mittelwerte der M30-Konzentrationen der Zellkultur-Überstände von (mit aktiviertem Zellkultur-Überstand aus Ansatz I) behandelten Proben und von unbehandelten Proben (nicht-aktivierter Zellkultur-Überstand aus Ansatz I) von einem Experiment ein.

Die Apoptoserate beträgt in 2D-MK SW480 (Ansatz I) nach Zugabe von 2x10⁶ PBMC nach 24 h den 31,83fachen Wert der unbehandelten Kontrolle (ohne PBMC) (blauer Balken in Abb. 16A).

Nach der Zugabe von aktiviertem Zellkultur-Überstand nach 24 h aus Ansatz I zur 2D-MK SW480 des Ansatzes II (behandelt) beträgt die Apoptoserate der 2D-MK SW480-Zellen nach 24 h das 1,50fache der Apoptoserate der MK SW480-Zellen mit nicht-aktiviertem Zellkultur-Überstand aus Ansatz I (unbehandelt) und nach 48 h das 0,35fache (**blaue Balken in Abb. 16B**).

3.6 3D Kokultivierung von SW480-Zellen mit PBMC: Vergleich der relativen Apoptoserate der SW480-Zellen nach Zugabe von konditioniertem Medium und Vergleich der Konzentrationsänderung von $TNF\alpha$ und IFN γ nach Konfrontation mit SW480-Zellen

3.6.1 Relative Apoptoserate der SW480-Zellen

Das Ergebnis des M30-ELISAs aus dem Experiment 2.10.8.8 ist in den Abbildungen 17 A und 17 B graphisch dargestellt. Um zu untersuchen, inwieweit von PBMC sezernierte Faktoren eine Rolle bei der Apoptoseinduktion der SW480-Zellen spielen, wurde konditioniertes Medium als Vergleich zur SW480 KK mit PBMC verwendet.

Der zellfreie aktivierte Zellkultur-
Überstand des 2D Systems
(=konditioniertes Medium) wird auf das
3D System gegeben

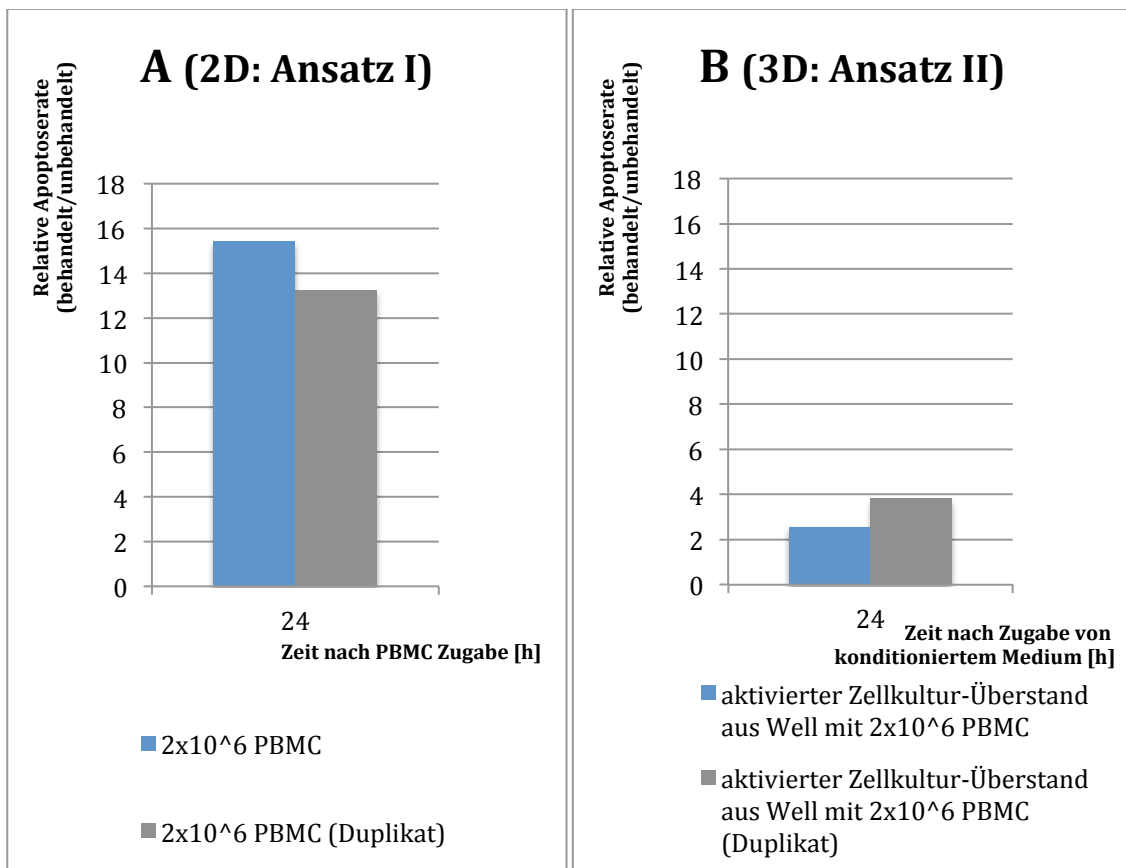


Abb. 17: A) Ansatz I 2D: Relative Apoptoseraten (behandelt/unbehandelt) der MK SW480 nach Zugabe von 2 Millionen PBMC. In die Berechnung der relativen Apoptoseraten (**Kapitel 2.10.7.2**) gingen die Werte der M30-Konzentrationen der Zellkultur-Überstände von (mit PBMC) behandelten Proben und von unbehandelten Proben (ohne PBMC) von einem Experimenten mit jeweils einem Duplikat ein.

B) Ansatz II 3D: Vergleich der relativen Apoptoseraten der MK SW480 nach Zugabe von aktiviertem Zellkultur-Überstand aus Ansatz I (behandelt) mit den relativen Apoptoseraten ohne die Zugabe von aktiviertem Zellkultur-Überstand. In die Berechnung der relativen Apoptoseraten (**Kapitel 2.10.7.2**) gingen die Werte der M30-Konzentrationen der Zellkultur-Überstände von (aktiviertem Zellkultur-Überstand aus Ansatz I) behandelten Proben und von unbehandelten Proben (nicht-aktivierter Zellkultur-Überstand aus Ansatz I) von einem Experimenten mit jeweils einem Duplikat ein.

Die Apoptoserate beträgt in 2D-MK SW480 (Ansatz I) nach Zugabe von 2x10⁶ PBMC nach 24 h den 15,42fachen Wert (Duplikat: 13,22fachen Wert (**grauer Balken in Abb. 17A**)) der unbehandelten Kontrolle (ohne PBMC) (**blauer Balken in Abb. 17A**). Nach der Zugabe von aktiviertem Zellkultur-Überstand nach 24 h aus Ansatz I zur 3D-MK SW480 des Ansatzes II (behandelt) beträgt die Apoptoserate der 3D-MK SW480-Zellen nach 24 h das 2,57fache (Duplikat:

3,84fache (**grauer Balken in Abb. 17B**)) der Apoptoserate der MK SW480-Zellen mit nicht-aktiviertem Zellkultur-Überstand aus Ansatz I (unbehandelt) (**blauer Balken in Abb. 17B**).

3.6.2 TNF α - und IFN γ -Konzentrationsänderungen im 3D-System mit SW480-Zellen nach Zugabe von konditioniertem Medium

Das Ergebnis des TNF α -ELISAs und des IFN γ -ELISAs aus dem Experiment 2.10.8.9 ist in den Abbildungen 18 und 19 graphisch dargestellt. Die Analyse der TNF α - und IFN γ -Konzentrationsänderung der SW480-Zellen im 3D-System nach Zugabe von konditioniertem Medium war wichtig, um festzustellen, welche immunologischen Vorgänge bei der Induktion der Apoptose eine Rolle spielen.

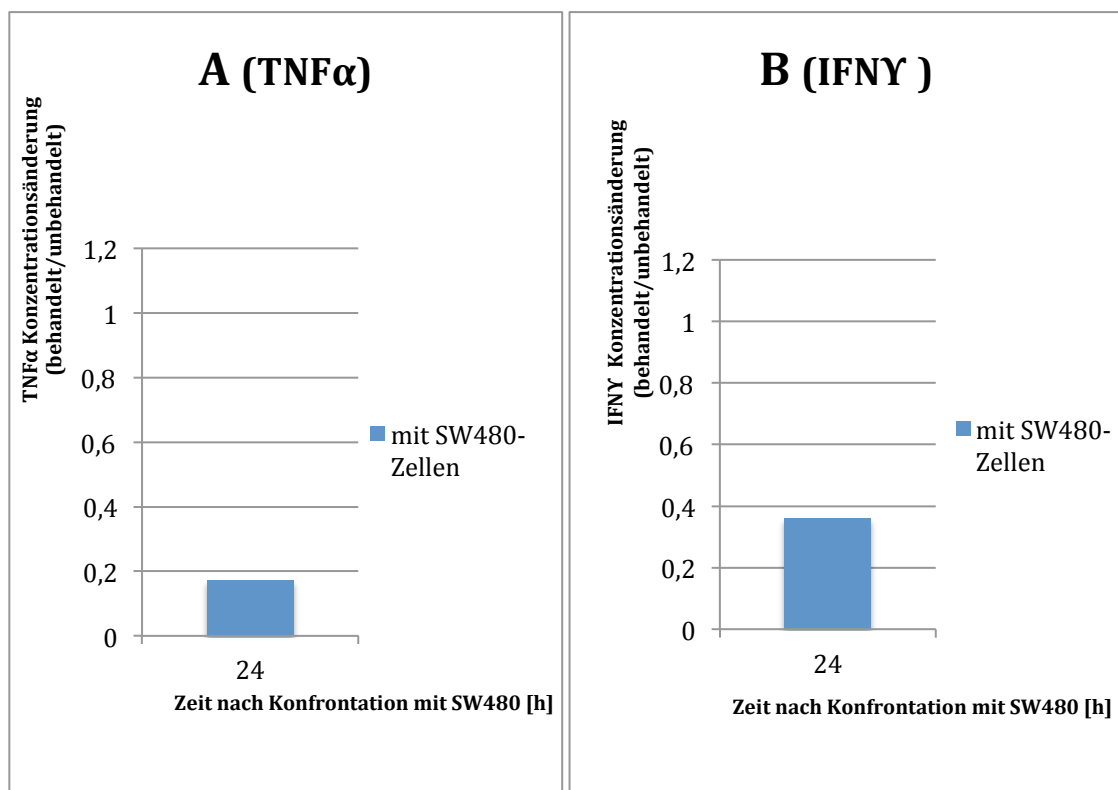


Abb. 18: A) 3D: Vergleich der TNF α -Konzentration der aktivierten zellfreien PBMC-Überstände aus dem 2D-Ansatz I nach 24 h ohne Konfrontation mit SW480-Zellen (unbehandelt) mit den TNF α -Konzentration nach Konfrontation mit SW480-Zellen (behandelt). B) 3D: Vergleich der IFN γ -Konzentration der aktivierten zellfreien PBMC-Überstände aus dem 2D-Ansatz I nach 24 h ohne Konfrontation mit SW480-Zellen (unbehandelt) mit den IFN γ -Konzentration nach Konfrontation mit SW480-Zellen (behandelt). In die Berechnung der IFN γ - und TNF α -Konzentrationsänderungen gingen die Werte der IFN γ - und TNF α -Konzentrationen von (mit SW480-Zellen) behandelten aktivierten zellfreien PBMC-Überständen und von unbehandelten (ohne SW480-Zellen) aktivierten zellfreien PBMC-Überständen von einem Experiment ein.

Die TNF α -Konzentration des aktivierten PBMC-Überstandes aus dem 2D-Ansatz I ist im 3D-System (Ansatz II) nach 24 h Kultivierung mit SW480-Zellen um 83 % (Rechnung: $(1-0,17) \times 100$ %; **blauer Balken in Abb. 18A**) geringer als die TNF α -Konzentration des Überstandes nach 24 h ohne Kultivierung mit SW480-Zellen.

Die IFNY-Konzentration des aktivierten PBMC-Überstandes aus dem 2D-Ansatz I ist im 3D-System (Ansatz II) nach 24 h Kultivierung mit SW480-Zellen um 64 % (Rechnung: $(1-0,36) \times 100$ %; **blauer Balken in Abb. 18B**) geringer als die IFNY-Konzentration des Überstandes nach 24 h ohne Kultivierung mit SW480-Zellen.

4. Diskussion

Die Ergebnisse aus der Promotionsarbeit sind in die Publikation „Johanna Kühnemundt¹, Heidi Leifeld¹, Florian Scherg¹, Matthias Schmitt¹, Lena Nelke¹, Tina Schmitt¹, Florentin Baur^{1,2}, Claudia Göttlich^{1,2}, Maximilian Fuchs³, Meik Kunz^{3,4}, Matthias Peindl¹, Caroline Brähler¹, Corinna Kronenthaler¹, Jörg Wischhusen⁵, Martina Prelog⁶, Heike Walles^{1,2,7}, Thomas Dandekar³, Gudrun Dandekar^{1,2}, Sarah L Nietzer^{1,2} Modular micro-physiological human tumor/tissue models based on decellularized tissue for improved preclinical testing. *Altex* 2020 Dec 11. doi: 10.14573/altex.2008141“ eingeflossen [89].

Im Folgenden werden die Ergebnisse diskutiert:

PBMC induzieren im 2D-System sowohl bei der MK der SW480-Zellen als auch bei der KK mit Fibroblasten im Vergleich zum 3D-System deutlich mehr Apoptose. So beträgt die Apoptoserate der behandelten Probe (mit PBMC) in MK SW480 nach Zugabe von 2×10^6 PBMC nach 24 h im 2D-System das 19,22fache und nach 48 h das 28,11fache und im 3D-System nach 24 h das 2,30fache und nach 48 h das 1,34fache der Apoptoserate der unbehandelten Probe (ohne PBMC). Bei der KK SW480/Fibroblasten beträgt die Apoptoserate im 2D-System nach 24 h das 15,85fache und nach 48 h das 15,02fache und im 3D-System nach 24 h das 1,79fache und nach 48 h das 1,24fache (**Abb. 14**).

Außerdem kann ein im 2D-System aktiviertes konditioniertes Medium der PBMC durch die Konfrontation mit SW480-Zellen im 2D-System keine Apoptose induzieren, dagegen im 3D-System schon. Dabei scheinen die beiden Schlüsselzytokine TNF α und IFN γ zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort eine Rolle zu spielen.

4.1 Vergleich des Ausmaßes der Apoptose der SW480-Zellen durch PBMC im 2D-System mit demjenigen im 3D-System

Die Apoptoserate der Tumorzellen bei der Konfrontation mit PBMC ist im 2D-System höher als im 3D-System. Dies kann vielfältige Gründe haben. Dreidimensionale Zellkulturen auf azellularisierter Darmmatrix, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, bieten den Raum für realitätsnahe extrazelluläre Matrizen und die bereits erwähnten wichtigen 3D-Zell-ECM- und Zell-Zellinteraktionen sowie wiederum Raum für Interaktionen dieser Konstrukte mit solublen Substanzen, wie u.a. Immunmodulatoren. All diese Kriterien haben eine sehr große Bedeutung in der Ausbildung tumorspezifischer Charakteristika wie Karzinogenese, Gewebsdifferenzierung, Proliferationsgeschwindigkeit, Metastasierungspotential, Malignität, Angiogeneseeigenschaften und Mikroumgebungsbedingungen, wie sie im System Mensch vorkommen [21, 47]. Sie besitzen somit durch die sehr viel komplexere histologische Struktur im Vergleich zu den zweidimensionalen Monolayer-Systemen eine höhere Aussagekraft, bieten eine bessere Vergleichbarkeit mit Tumorsystemen in lebenden Organismen und mindern die experimentelle Fehlinterpretationsraten im Vergleich zu 2D-Modellen [41, 42]. Sie erlauben eine differenzierte Untersuchung der molekularen Strukturen in der für die Tumorbiologie so bedeutenden unmittelbaren Tumorumgebung [41, 90].

Dies konnte schon für verschiedene Tumore gezeigt werden, wie z. B. im experimentellen Vergleich der 2D-Zellkultur und der 3D-Zellkultur von Zellen eines Osteosarkoms. Hier konnte herausgefunden werden, dass sich dieselben Zellen je nach Kultivierungsart hinsichtlich ihrer zellmetabolischen und metastasierenden Eigenschaften signifikant unterscheiden [91]. Der nach der Isolation und Kultivierung von humanen oralen Plattenepithelzellkarzinomzellen entstandene Tumor im dreidimensionalen System war größer, aggressiver und resistenter gegenüber Medikamenten als der Tumor im zweidimensionalen System [92]. Bei Zellen des KRK waren die Zellen im 3D-System hinsichtlich der für die Tumorzellbiologie wichtigen Integrinexpression dem Maustumor in vivo viel

ähnlicher als im 2D-System [93]. Außerdem haben Experimente mit SW480-Zellen in 3D-Kulturen gezeigt, dass die Zellen im 3D-System weniger proliferieren und den Tumorzellen in vivo zellbiologisch ähnlicher sind als im 2D-System [41, 47]. So konnte nachgewiesen werden, dass die SW480-Zellen im 2D-System sowohl epitheliale als auch mesenchymale Charakteristika aufweisen und die Tumorzellen im 3D-System hauptsächlich epitheliale Marker exprimieren [41].

Ein weiterer Grund wird deutlich, wenn man die Ergebnisse der immunhistologischen Fluoreszenzfärbung des epithelialen Markes Pan-Zytokeratin und des mesenchymalen Markers Vimentin in Abbildung 12 und Abbildung 13 betrachtet. Dort ist deutlich erkennbar, dass die Pan-Zytokeratin-positiven und Vimentin-negativen SW480-Zellen sowohl in der MK als auch in der KK mit den Vimentin-positiven Fibroblasten nicht nur einen Monolayer auf der Matrixoberfläche bilden, sondern auch in die Darmmatrix einwandern. Somit sind im 3D-System die SW480-Zellen teilweise schlechter erreichbar für die hinzugefügten PBMC als im 2D-System.

4.2 Vergleich der durch PBMC induzierten Apoptose der SW480-Zellen mit und ohne Kokultivierung mit Fibroblasten

In Untersuchungen und Experimenten mit Tumorzellen und Fibroblasten im 3D-System, wie ich sie ebenfalls durchführte, konnte gezeigt werden, dass es einen Unterschied bezüglich des Wachstumsverhalten der Tumorzellen gibt, je nachdem ob die Karzinomzellen monokultiviert oder gemeinsam mit primären Fibroblasten kokultiviert werden [41, 94]. So bildeten sich ausschließlich in der KK von SW480-Zellen und primären Fibroblasten auf der Darmmatrix dichte Zellaggregate aus. In vorherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die SW480 Tumorzellen umgeben von Fibroblasten sensibler auf das Chemotherapeutikum 5-Fluoruracil (5-FU) im Vergleich zur MK aus SW480-Zellen ohne primäre Fibroblasten reagieren [41].

Dies waren alles Gründe für mich, die Experimente im 2D-System und im 3D-

System sowohl mit SW480-Zellen in MK als auch mit SW480-Zellen in KK mit primären Fibroblasten durchzuführen, um auf diesem Wege einen möglichen Unterschied festzustellen.

Zusammenfassend gibt es in den 2D-Experimenten in der vorliegenden Arbeit einen Unterschied bezüglich der relativen Apoptoseraten der SW480-Zellkulturen je nachdem ob sie mit dermalen Fibroblasten kultiviert wurden oder nicht: So sind die durchschnittlichen relativen Apoptoseraten der KK SW480/Fibroblasten mit den drei verschiedenen Zellzahlen der PBMC-Population aller drei Messzeitpunkte kleiner als diejenigen der MK SW480 ohne Fibroblasten (Kapitel 3.1.1). Dagegen ist in den 3D-Experimenten der korrespondierende Unterschied bezüglich der relativen Apoptoseraten der SW480-Zellen, ob sie nun mit oder ohne dermale Fibroblasten kultiviert werden sehr viel kleiner (Kapitel 3.3.1). Das mag dadurch erklärbar sein, dass Fibroblasten ihre physiologische Funktion in einem dreidimensionalen Raum, wie ihn beispielsweise eine azellularisierte Darmmatrix darstellt, besser entfalten können als auf zweidimensionalen Well-Platten.

Bezüglich der Apoptoseinduktion durch PBMC im 3D-System, gemessen mithilfe des M30-ELISAs, lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kultivierung mit oder ohne Fibroblasten feststellen. Dies mag daran liegen, dass wie in Kapitel 3.3.3 dargestellt, im 3D-System gleichermaßen in der MK wie auch in der KK keine Apoptose durch die Zugabe von PBMC induziert werden kann und wir uns somit in einem Bereich bewegen, in dem sich ein möglicher Effekt der Fibroblasten auf die Apoptoseinduktion gar nicht signifikant messen lässt. Durch Veränderung des Zytokinmilieus mittels Zugabe ganz spezieller Immunmodulatoren könnte sich in Zukunft möglicherweise die Apoptose der SW480-Zellen steigern lassen und somit könnte in einem solchen System der Unterschied von Mono- und Kokultur gemessen werden.

4.3 Mögliche Mechanismen der Apoptoseinduktion der SW480-Zellen durch die PBMC im 2D-System

Um zu diskutieren, auf welchem Wege die Immunzellen die Apoptose der SW480-

Zellen induzieren, werden zunächst die Hauptakteure des unspezifischen und spezifischen Systems getrennt voneinander betrachtet, um anschließend mögliche Wege, die in der Krebszelle Apoptose induzieren, aufzuzeigen.

4.3.1 Hauptakteure des unspezifisches Immunsystems im Kampf gegen die Tumorzellen

Durch nekrotische Tumorzellen oder durch Tumorzellen präsentierte Tumorantigene erhalten die Zellen des angeborenen Immunsystems - wie zum Beispiel Makrophagen und NK-Zellen - „Fremd“-Signale. Daraufhin leiten sie eine Entzündung ein und rekrutieren weitere Immunzellen, die Tumorzellreste phagozytieren, soluble zytotoxische Zytokine oder Perforine freisetzen oder die phagozytierten Zellbestandteile dem adaptiven Immunsystem in drainierenden Lymphknoten an ihrer Oberfläche präsentieren. Ein bedeutendes zytotoxisches Zytokin ist dabei IFN γ , dessen Konzentration in den Experimenten vorliegender Arbeit ebenfalls gemessen wurde. Es wird hauptsächlich von zwei Immunzellen produziert: NK-Zellen und T-Lymphozyten [24]. Zuerst sind es von Makrophagen über IL-12 aktivierte NK-Zellen, die IFN γ produzieren und freisetzen. Es wirkt durch die Hemmung des Tumorwachstums durch die Induktion der Apoptose zytotoxisch. Nun werden weitere Immunzellen wie Makrophagen und unspezifische NK-Zellen angelockt, die unter anderem erneut für erhöhte IFN γ , Perforin und IL-12 sorgen. Die überaus wichtige Rolle von IFN γ und Perforine in diesen Prozessen wird auch in verschiedenen Arbeiten belegt, die zeigen, dass, im Gegensatz zur Anwesenheit dieser wichtigen immunologischen Botenstoffe, ihre Abwesenheit für eine erhöhte Sensitivität der Wirtszelle für Tumorzellen bewirken kann [60]. Perforin gehört zur Tötungsstrategie sowohl der NK-Zellen als auch der zytotoxischen CD8 $^{+}$ -T-Zellen und Studien belegen, bei Perforin-Knockout-Mäusen häufiger Tumore des lymphatischen Systems auftreten als bei wildtypischen Mäusen [60].

Speziell im Falle des kolorektalen Karzinoms konnte ebenso gezeigt werden, dass die Anzahl an tumorassoziierten Makrophagen (TAM) und tumorassoziierten

dendritischen Zellen (TADC), in Abhängigkeit der Infiltrationstiefe mit einer höheren Überlebensrate assoziiert ist. Eine Hauptfunktion dieser TADC besteht darin, mit benachbarten infiltrierten Immunzellen des adaptiven Immunsystems zu interagieren, um so die Immunantwort auf die kolorektalen Tumorzellen zu erhöhen [95, 96]. Viele wissenschaftliche Untersuchungen zeigten, dass vor allem das Überleben von aktivierten Makrophagen essentiell für den Erfolg im Kampf gegen entartete Zellen ist. So ist es den aktivierten Makrophagen je nach Phänotyp möglich, nicht nur das Wachstum von transformierten Zellen zu hemmen, sondern sogar sie zu töten [97]. Es gibt viele Tumore, die die hohe Plastizität der klassisch aktivierten Makrophagen nutzen, indem sie die Differenzierung zu sogenannte Tumorassoziierten Makrophagen induzieren. Solche tumorassoziierten Makrophagen sind der Population unserer physiologisch vorkommenden regulatorischen Makrophagen am ähnlichsten und zeigen zum Teil auch Charakteristika der wundheilenden Makrophagen [1]. Welche Strukturen und Substanzen an diesen Vorgängen ausschlaggebend beteiligt sind, ist derzeit noch nicht erforscht. Man vermutet einen entscheidenden Schritt in der Aktivierung des NFκB9 Faktors. Man weiß, dass diese tumorassoziierten Makrophagen auf der einen Seite eine hohe Menge an IL-10 produzieren, welches die Immunantwort auf Neoantigene hemmen kann und andererseits wenig bis kein IL-12 [98]

4.3.2 Hauptakteure des spezifischen Immunsystems im Kampf gegen Tumorzellen

Die verbliebenen Zellreste nach dem Vorgang der angeborenen Abwehr durch Makrophagen und NK-Zellen werden durch die dendritischen Zellen phagozytiert und im Lymphknoten präsentiert, wodurch die adaptive zelluläre Immunabwehr, vertreten durch die tumorinfiltrierende T-Lymphozyten (TIL), eingeleitet wird. Die T-Zellen erkennen das tumorspezifische Antigen auf der Oberfläche der Tumorzellen, welches überwiegend über MHC I + II Moleküle präsentiert wird, über ihren antigenspezifischen TCR. Weil kolorektale Tumorzellen oft MHC I Moleküle, aber keine MHC II Moleküle produzieren, geht man davon aus, dass die überwiegende Teil der Immunabwehr über den adaptiven Zell-vermittelten Weg,

vertreten durch CD8+-CTL, abläuft und weniger über den CD4+-T-Effektorzell-vermittelten Weg [32, 99]. In den vergangenen Jahren haben viele Studien diese Annahme bestätigt durch die Entdeckung, dass es einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Anzahl, Typ, Dichte und Lokalisation dieser tumorspezifischen CD8+-CTL in kolorektalen Tumoren und der Tumorprogression gibt [100, 101]. Es existieren zwei wesentliche Modelle der adaptiven Immunantwort auf Tumorzellen, die postuliert werden: Das Modell des Danger-Signals und das bereits bekannte Modell der Immunsurveillance. Bei dem Danger-Modell spielen spezielle antigenpräsentierende Zellen (APC) die Hauptrolle, welche als Detektoren für Gewebeschaden fungieren. Diese APC wie aktivierte Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen stimulieren die T-Zellantwort [21]. Die Hauptakteure des Immunsurveillance-Modells sind wie bereits erwähnt CD8+ zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen. Wenn man NK-Zellen und CTL bezüglich ihrer Interaktion mit Tumorzellen vergleicht, stellt man fest, dass ein bedeutender Unterschied darin besteht, dass für CTL MHC-I-Moleküle zur Tumorantigenerkennung essentiell sind, während sie für NK-Zellen sogar hinderlich wirken können [102]. Hierfür ist es wichtig zu wissen, dass NK-Zellen die veränderte MHC-I-Expression über die Signalkombination von zwei verschiedenen Oberflächenrezeptortypen detektieren. Der eine Rezeptortyp wirkt aktivierend auf die NK-Zelle und gehört sowohl der Killerzellen-leptinähnlichen Rezeptor (KLAR) -Familie als auch der Killerzellen-immunglobulinähnlichen (KIR)-Familie an. Zum einen wirken sie über die vermehrte Ausschüttung von Zytokinen wie IFN γ , das (wie bei den CTL) durch die Freisetzung von zytotoxischer Granula mit Granzymen und Perforinen auf die Zielzelle tödlich wirkt und zum anderen über Rezeptoren, die bestimmte Immunglobuline erkennen und auf diese Weise aktiviert werden. Diese Fähigkeit des adaptiven Teils der NK-Zellpopulationen bezeichnet man als die antikörperabhängige (spezifische) zelluläre Zytotoxizität. Der andere Rezeptortyp wirkt inhibitorisch auf die Tötungsaktivität der NK-Zellen von körpereigenen Zellen. Sie gehören ebenfalls zur KIR Familie.

NK-Zellen können nicht nur unspezifisch auf bestimmte Signale reagieren, sondern können durch vorherige Sensibilisierung bestimmte Tumorzellen myeloiden oder

lymphoiden Ursprungs töten [24]. NK-Zellen und CD8+-CTL benutzen hauptsächlich zwei Tötungsmechanismen: über die Todesrezeptoren oder über den „granule Exozytosis Pathway“.

Die Lymphozyten tragen CD95L auf ihrer Oberfläche mit dem sie an CD95-Rezeptoren auf der Tumorzelle binden und die Apoptose induzieren. Die NK-Zellen benutzen den Todesliganden TRAIL (engl. *tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand*), welcher Apoptose über den Todesrezeptor TRAIL-R1 oder TRAIL-R2 induziert [21].

Beim kolorektalen Karzinom gibt es sehr viele Untersuchungen, die belegen, dass neben CD8+-Lymphozyten auch CD4+-Lymphozyten eine bedeutende Rolle im Kampf gegen die entarteten Zellen spielen. So besteht die Gruppe von tumorspezifischen T-Zellen nicht nur aus CD8+-CTL, sondern auch aus CD45Ro+, CCR7-Effektor-Memory-T-Zellen, CD4+CD25+TGF β +FOXP3+-TREGs und CD4+T-Helferzellen (TH1, TH2, TH17). Es gibt womöglich auch eine Assoziation zwischen dem Auftreten dieser Zellen und genetischen Ursachen von KRK wie Mikrosatelliteninstabilität, CIMP, BRAF Mutation sowie eine Assoziation dieser Faktoren mit dem klinischen Outcome der Patienten [103, 104]. In der Gruppe der Tumorantigen-spezifischen CD4+T-Zellen zählen CD45Ro+CCR7-TEM zu den effektivsten Zellen der Immunsurveillance eines Tumors. Dies bestätigten auch Noshu und Coll mithilfe einer Datenbank von 768 Kolonkarzinompatienten. Sie demonstrierten, dass die Dichte von CD45R0+ mit hoher Signifikanz positiv mit dem Überleben der Patienten korreliert. Dabei war die Dichte von CD45R0+ Zellen und die damit positiv korrelierende mittlere Überlebensrate der Patienten von genetischen Veränderungen der Tumorzellen wie Mikrosatelliten-instabilitäten oder LINE-1 Methylation unabhängig [105]. Die CD45R0+ Effektor-Memory-T-Zellen können noch weiter in die Gruppe der peripheren Effektor T-Gedächtniszellen (TEM), welche CCR7- sind und die Gruppe der zentralen T-Gedächtniszellen (TCM), welche CCR7+ sind, aufgeteilt werden [106].

Eine weitere wichtige Subpopulation der TIL in der Interaktion zwischen Tumor und adaptiven Immunsystem sind TREGs. Sie gelten als Untergruppe der CD4+ T-Zellen und haben regulatorischen Einfluss auf Immunantworten, um die Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen zu gewährleisten. Weitere wichtige

Zellmarker sind der charakteristische IL-2-Rezeptor (CD25) auf ihrer Oberfläche zur Identifikation und der Transkriptionsfaktor Forkhead box P3 (FoxP3) zur Aktivitätsbestimmung [102]. Ihre bereits beschriebene immunsupprimierende Funktion könnte zur Annahme führen, FOXP3 Zellen hätten eine schlechte Prognose bezüglich der Tumorprogression. Für viele Tumorentitäten trifft dies auch zu, nicht aber für das kolorektale Karzinom, für das ein insgesamt ein positiver Einfluss der TREGs postuliert wird [107]. Das bestätigen auch Experimente mit TREGs, isoliert aus PBMC, die vorher durch ein Kolonkarzinom spezifisches Antigen (CEA) stimuliert wurden. Sie erhöhten in vitro massiv die IFN γ - und TNF α -Produktion der tumorspezifischen T-Zellen von Kolonkarzinompatienten. Später hat man die entscheidenden Oberflächenproteine der TREGs Subpopulationen identifiziert. Zusätzlich zu CD4⁺-TREGs konnten sowohl im peripheren Blut, Tumorgewebe und in Metastasen-befallenen Lymphknoten CD8⁺CD28⁻-TREGs isoliert werden. Diese hemmen IL-10 abhängig T-Zellen [108]. Außerdem wurden auch CD8⁺CD28⁺-TREGs mit dem folgenden Phänotyp isoliert: CD25⁺, FOXP3⁺, CD152⁺, CD194⁺, TGF β ⁺ und CD127⁻ [109]. Dieser Phänotyp tritt in 90 Prozent der Fälle in kolorektalem Tumorgewebe auf, ohne im umliegenden normalen physiologischen Kolongewebe präsent zu sein. CD152, auch bekannt als CTLA4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte associated Protein 4*) ist ein Protein, welches speziell an der Zelloberfläche von T-Zellen exprimiert wird und welche die Immunantwort auf Antigene anführen. T-Zellen werden, wie bereits angesprochen durch bestimmte Rezeptoren (wie z. B. CD28) stimuliert. Durch CTLA4 kann andererseits eine Überreaktion des Immunsystems herunterreguliert und so verhindert werden. Über den CTLA4-Komplex wird eine Proteinkinase aktiviert, die das Proliferationssignal herunter reguliert. Folglich werden APC weniger stimuliert und die Intensität einer möglichen Immunantwort sinkt. Das Protein CTLA4 stellt somit ein mögliches klinisches Ziel dar. CTLA4-Agonisten verstärken die Wirkung von CTLA4 und CTLA4-Antagonisten schwächen sie. Der antitumorale Effekt in der frühen Phase der T-Zellaktivierung wie z.B. bei der Bekämpfung von malignen Melanomen durch das Immunsystem, ist beispielsweise auf den klinisch eingesetzten monoklonalen Antikörper Ipilimumab (CTLA4-Antagonist) zurückzuführen [110, 111]. CD194 (=CCL17 oder

CCL22) – Liganden sind im Vergleich zu gesundem Gewebe im Tumorgewebe im Gegensatz zu IL-6 oder TGF β nicht höher exprimiert. Man nimmt an, dass von CD68+ Immunzellen produziertes CXCL11-TREGs anlockt [32, 109]. Unterschieden werden können TREGs von TEM durch die Abwesenheit von CD45RO+ [8].

4.3.3 Apoptoseinduktion durch konditioniertes, aktiviertes Medium in 2D und 3D

In vorliegender Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob es von den PBMC sezernierte soluble Substanzen gibt, die bei den SW480-Zellen im 2D-System Apoptose induzieren. Deshalb wurden SW480-Zellen in Monokultur im 3D-System mit zellfreiem Zellkultur-Überstand von PBMC/SW480 Kokulturen aus dem 2D-System behandelt. Nach Betrachtung der im Kapitel 3.5 (2D) und im Kapitel 3.6 (3D) aufgeführten Ergebnisse der Experimente 2.10.8.7 (2D) und 2.10.8.8 (3D) muss man schlussfolgern, dass im 2D System keine Apoptose durch soluble Stoffe induziert wird im Gegensatz zum 3D-System. Hier konnte das konditionierte Medium mit seinen Inhaltsstoffen die Apoptose induzieren.

Wir wählten die Zytokine TNF α und IFN γ als Schlüsselzytokine zwischen adaptiver und angeborener Immunabwehr aus, da IFN γ auch das Schlüsselzytokin von TH1-Zellen und CTL als auch von NK-Zellen darstellt. TNF α ist in vielen tumorapoptose-induzierten Prozessen involviert.

Es stellte sich also die Frage ob sich die Konzentrationen dieser beiden Zytokine in den PBMCs im konditioniertem Medium ändern wenn die PBMC mit Tumorzellen konfrontiert werden. Das Experiment 2.10.8.9 zeigt, dass die Konzentrationen von TNF α und IFN γ der aktivierten PBMC-Überstände aus dem 2D-System nach 24 h Kultivierung mit SW480-Zellen geringer sind als die Konzentrationen des Überstandes nach 24 h ohne Kultivierung mit SW480-Zellen. Dies bestätigte also unsere Annahme, dass diese beiden Schlüsselzytokine eine bedeutende Rolle in dem Prozess der Apoptoseinduktion im 3D-System mit dem konditionierten Medium spielen könnten. Beide Zytokine sind ganz entscheidend für die Funktionen sowohl der Makrophagen als auch der CTL und NK-Zellen. Ein

bedeutendes Indiz dafür, dass es überwiegend CD8+-CTL und weniger NK-Zellen sind, ist die vermehrte Expression von MHC I im Gegensatz zu MHC II der SW480-Zellen [112, 113], da die NK-Zellen eher Zellen angreifen, die kein MHC I exprimieren. Dies ist charakteristisch für die meisten Tumorzellen [32, 99].

NK-Zellen detektieren die veränderte MHC-I-Expression über die Signalkombination von zwei verschiedenen Oberflächenrezeptortypen. Die nähere Betrachtung des inhibitorischen Rezeptortyps erklärt, warum NK-Zellen gerade diejenigen Zellen selektiv töten, die keine oder nur wenige MHC-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche präsentieren, während Körperzellen mit normaler MHC-I-Expression nicht angegriffen werden. Auf diese Weise wirken Interferone schützend auf Körperzellen, weil sie einerseits die MHC-I-Expression der gesunden Körperzellen hochregulieren, während sie bei virusinfizierten Zellen (durch die gehemmte Proteinsynthese) nicht mehr hoch zu regulieren ist, und andererseits die Interferone die NK-Zellen aktivieren, um bei virusinfizierten Zellen oder bei Tumorzellen mit verringerter MHC-I-Expression den programmierten Zelltod einzuleiten [4, 102].

So ist es gewährleistet, dass infizierte Zellen oder Tumorzellen, die die Expression von MHC-I-Molekülen herabgesetzt haben und somit nicht von Zellen der adaptiven Immunabwehr wie zytotoxischen T-Zellen oder T-Helferzellen über den T-Zell-Rezeptor erkannt werden können, trotzdem über den unspezifischen Immunweg durch NK-Zellen getötet werden können. Viele NK-Zellsubpopulationen benötigen somit weder ein tumorassoziiertes Antigen noch MHC I Moleküle, durch die sie präsentiert werden [3].

Ein Grund, warum durch die PBMC keine Apoptose – entspricht der Erhöhung der Apoptoserate um das mindeste 2fache - der SW480-Zellen im 3D-System sowohl in MK als auch in KK induziert wird, könnte der in Kapitel 1.4 erläuterte Mechanismus des Immunescape von Tumorzellen durch die Herunterregulation von MHC I über den Zeitraum der Kultivierung in 3D sein. Um dies zu überprüfen, könnte beispielsweise eine MHC I Färbung der 3D-Darmmatrix nach 14 Tagen durchgeführt werden und das Ergebnis anschließend mit dem 2D-System verglichen werden. Wäre MHC I herunterreguliert, müsste man sich die Frage stellen, ob jetzt die NK-Zellen die Aufgabe der Immunabwehr übernehmen. Das könnte man nach

14 Tagen ebenfalls mithilfe der Färbung mit CD56-Antikörpern (NK-Zellen) testen. Eine Doppelfärbung mit Ki67 würde helfen zu erkennen, ob die entscheidenden Zellen wirklich in nahen Kontakt mit Tumorzellen treten. Außerdem könnte man die NK-Zellen mithilfe von Flowzytometrie quantifizieren.

Um die TIL näher zu klassifizieren könnte ebenfalls eine FACS Analyse durchgeführt werden, um herauszufinden, welche Zellen die Hauptakteure sind. Um die Apoptose im 3D-System zu steigern und somit eine Untersuchung der immunologischen Vorgänge zu ermöglichen, könnte man zukünftig Zytokine oder sortierte Zellen dem System zuführen.

Oft werden tumorspezifische T-Zellen erst nach mehrtägiger Stimulation in vitro nachgewiesen. Dies bestätigt Tatsache, dass sich die Tumorzellen in vivo durch die Herunterregulation von TAA dem Immunsystem entziehen. Dies könnte durch die Anwesenheit von aktivierungshemmenden Faktoren, wie beispielsweise TGF β 1 hervorgerufen werden. Somit würde die Aktivierung der Ausdifferenzierung von tumorspezifischen CTL unterdrückt werden. Dieser Aspekt bietet die Möglichkeit, die Apoptoserate im 3D-System durch die Zugabe von Anti-TGF β 1 zu steigern. Eine weitere Möglichkeit, die Apoptose im 3D-System zu steigern und ihren Mechanismus näher zu beleuchten, wäre es, einen inflammatorischen Cocktail aus IL1b, IL6, IL23 und anti-IFNY dem System zuzuführen oder sortierte Immunzellen wie beispielsweise TH17-Zellen zu verwenden [23]. Außerdem wäre es sinnvoll, eine Entzündung im Tumorbereich durch die Zugabe von beispielsweise CCL20+-T-Zellen zu induzieren. Aus der Literatur ist bekannt, dass die SW480-Zellen CCL20 exprimieren [114]. Man könnte zukünftig auch testen, ob sie im 3D-System weiterhin CCR6-Rezeptoren (CCL20) oder CXCR3-Rezeptoren (CCL9-11) exprimieren oder nicht.

Wie bereits in Kapitel 1.2 erläutert, ist die alleinige Präsentation von TAA für eine effektive Tumorabwehr nicht ausreichend und es bedarf die Anwesenheit von Kostimulantien, deren Sezernierung durch die Interaktion von B7.1 (CD80) und CD 28 verursacht wird. Da die Tumorzellen diese B7.1-Expression unterdrücken, wäre es sinnvoll, durch die Zugabe von Kostimulantien diesen immunhemmenden Effekt zu kompensieren. Um die Auswirkung dieser Kostimulantien zu testen, würde sich das hier gezeigte 3D-Zellkultursystem anbieten [115].

4.4 Immunhistologische Färbung der 3D-Modelle

In der Literatur finden sich keine Daten bezüglich des Apoptoseverhaltens von SW480-Zellen mit und ohne Fibroblasten nach Konfrontation mit PBMC auf einer SISmuc, aber über das Wachstumsverhalten von SW480-Zellen mit und ohne Fibroblasten [41]. Wir konnten zeigen, dass im Gegensatz zu anderen Tumorzelllinien die SW480-Zellen in Co-Kulturen mit primären dermalen Fibroblasten Anzeichen einer kollektiven Invasion zeigen [89]. Wichtig für die Sensibilität von Tumorzellen gegenüber Immunzellen sind unbestritten das Wachstumsverhalten der Tumorzellen, sowie die ausgebildeten kanzerinogenen Eigenschaften wie beispielsweise das Metastasierungspotential. Dieses beruht unter anderem auf der EMT (engl. *epithelial-to-mesenchymal transition*), bei der epitheliale Zellen mesenchymale Eigenschaften erwerben und in umliegende Gewebe migrieren. Zur Charakterisierung der epithelialen bzw. mesenchymalen Eigenschaften der Zellen wurden die Marker Pan-Zytokeratin und Vimentin untersucht.

Zusammenfassend konnte in der Fluoreszenzfärbung bestätigt werden, dass die MK aus SW480-Zellen in der 3D-Monokultur (**Abb. 12**) epithelial ist, also hauptsächlich Pan-Zytokeratin-Signale aufweist, während die 2D-MK aus SW480-Zellen typischerweise nur partiell epithelialen Charakter zeigen [41]. In der Literatur [41, 116] werden zwei Wege beschrieben, wie epitheliale Tumorzellen wie SW480-Zellen ins Gewebe migrieren und invasiv wachsen können: Entweder migrieren die Zellen i) einzeln über den Mechanismus der EMT, wodurch sie mit der Zeit ihren epithelialen Charakter mehr und mehr zugunsten eines mesenchymalen Charakters verlieren oder ii) im Zellverband [117], womöglich getriggert durch tumorassoziierte Fibroblasten und unabhängig von EMT [94, 118]. Hier sind die Fibroblasten räumlich eng mit den Tumorzellen assoziiert und üben nicht nur eine dirigierende Funktion auf sie aus, sondern sezernieren auch Substanzen, die für die Bildung einer ECM und somit des Tumorstromas essentiell sind.

Im Gegensatz zu anderen häufig verwendeten endothelialen 3D-Zellkulturmodellen wie Transwell-Platten ermöglicht unser Modell den direkten und engen Kontakt von Tumorzellen mit dem ECM. Dies ist wichtig, da ECM-Hinweise die Signalübertragung in Endothelzellen ändern (Fukuhara et al., 2009). Darüber hinaus können wir durch die Veränderung des Endothels die Transmigration von Immunzellen über die Endothelbarriere untersuchen. Dies ist ein wichtiges Merkmal für die Verbesserung von Immuntherapien, da das Vorhandensein von Immunzellen im Tumor derzeit der beste Prädiktor für ein Ansprechen der Behandlung auf die Hemmung des Immun-Checkpoints ist [119, 120].

Fibroblasten sind ein weiterer wichtiger Teil des Tumorstroms, der zu physischen und immunologischen Barrieren beiträgt [121]. Diese Stromazellen können auch in die 3D-Modelle aufgenommen werden. Insbesondere mit oder ohne Tumorzellen durchqueren Fibroblasten die Basalmembran unserer Matrix und wachsen in der gesamten Matrix. Ihre Relevanz für die Morphologie des Tumorgewebes wird in unserem 3D-Modell gezeigt, in dem SW480-Zellen Anzeichen einer kollektiven Invasion in Co-Kulturen mit primären dermalen Fibroblasten zeigen, welche die Ergebnisse von Nietzer et al. bestätigen [41]. Die Rolle von Fibroblasten bei der Tumormetastasierung wurde auch in Tiermodellen bestätigt [122] und sie sind wichtige Determinanten der Krebstherapie [123]. Unsere neuen und verfeinerten In-vitro-Modelle spiegeln somit das Verhalten nicht-invasiver Tumorzellen sowie die Invasion einzelner Zellen, aber auch die vom Tumorstroma unterstützte kollektive Invasion wider [89].

4.5 Standardisierung der Methode und der verwendeten Zellen

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, bedarf es zum einen standardisierter Methoden, wodurch möglichst viele systematische Fehler minimiert werden, und zum anderen müssen die bestimmten Parameter über einen möglichst großen Zeitraum konstant gemessen werden können. In der vorliegenden Arbeit wurden einerseits primäre Fibroblasten sowie eine permanente Tumorzelllinie (SW480) verwendet. Permanente Zellkulturen sind am besten standardisierbar und lassen

sich in Tumorzellen, transformierte Zellen und durch Transfektion immortalisierte Zellen unterteilen. Die entscheidende Gemeinsamkeit aller permanenten Zellen ist ihre potentielle Unsterblichkeit. Dagegen besitzen primäre Zellen wie primäre Fibroblasten unter in vitro Laborbedingungen nur eine begrenzte Lebensdauer. Die hier verwendeten primären Fibroblasten wurden direkt aus gesunder Haut gewonnen und nicht länger als Passage 6 verwendet. Ein weiteres Charakteristikum der primären Zellen im Gegensatz zu einer permanenten Zelllinie ist die Verringerung der Zellteilungsrate im zeitlichen Verlauf der Kultivierung und das Eintreten der Seneszenz. Leonard Hayflick hatte diese These bei primären Fibroblasten erstmals im Jahre 1963 postuliert. Somit können sich die Zellen bezüglich ihres morphologischen Phänotyps und ihres Zellstoffwechsels nach einer Zeit in Kultur erheblich von frisch isolierten Zellen unterscheiden und somit die Aussagekraft und die Reproduzierbarkeit von experimentellen Untersuchungen erschwert werden [49]. Eine etablierte (sehr teure) Strategie um diesen Nachteil zu minimieren, wäre die Immortalisierung der Zellen durch die Induktion einer stabilen Telomerase Produktion durch hTERT (engl. *human telomerase reverse transcriptase*). Der entscheidende Vorteil von primären Zellkulturen, im Gegensatz zu permanenten Zelllinien, ist ihre zellmorphologische und zellmetabolische Ähnlichkeit zu natürlich vorkommende Zellen. Somit sind die Ergebnisse eines durchgeführten Arzneistoff-Screenings meist besser bei primären Zellkulturen auf den Tumor im Patienten übertragbar als bei permanenten Zellkulturen [124]. Ganz besonders wenn Differenzierungsvorgänge bei Immunzellen oder Tumorzellen untersucht werden sollen, verwendet man Primärkulturen. Primäre Zellen stellen somit die Verbindung zwischen artifiziellem System und in vivo Tierversuchen dar. Für die Aussagekraft der Ergebnisse aus Versuchen mit primären Zellen ist die standardisierte Zellgewinnung ganz entscheidend [49]. Die Zellen werden durch eine Gewebebiopsie aus einem Tumor oder Bindegewebe gewonnen, zerkleinert und anschließend durch Dispasen oder Kollagenasen enzymatisch verdaut. Die Zellsuspension wird zentrifugiert, gewaschen und anschließend ausgesät. So erhält man eine Zelllinie der gewünschten Zellen, die man nach Bedarf weiter kultivieren kann [125]. Vor 60 Jahren begannen Forscher tumorbiologische Vorgänge mithilfe

von Zellkulturen näher zu untersuchen. Dazu etablierten sie eine Reihe von Zelllinien. Zwei Jahrzehnte später wurden erstmals zahlreiche tumoröse Zelllinien etabliert, die die NCI (National Cancer Institute) veröffentlichte. Sie beinhaltete neun verschiedene Tumorentitäten, wie beispielsweise Kolontumore, Lungentumore, Prostatakarzinom und Brustkarzinome. Heute gibt es Zellkulturbanken wie DSMZ und ATCC, bei denen man nahezu jede Zelllinie mit den gewünschten Merkmalen beziehen kann. Es ist dennoch sehr wichtig, weitere Tumortestsysteme zu entwickeln, die die klinische Situation besser widerspiegeln als die bisherigen 2D-Testsysteme. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Wahl der Zellkulturumgebung. Sie kann zu unterschiedlich stark variierenden Forschungsergebnissen mit den gleichen Zellen führen [126]. Viele Tumorzellen verlieren *in vitro* die Fähigkeit zum unabhängigen Wachstum oder zeigen ein reduziertes Haftungsvermögen an die extrazelluläre Matrix oder an andere Zellen im Vergleich zum Originaltumor. Während der Zellkultur können sie eine Abhängigkeit von bestimmten Supplementen oder dem Plastikuntergrund ausbilden [127]. Diese Probleme können durch die Verwendung von serumfreien Medium und biosynthetischen Materialien weitestgehend umgangen werden [126]. Der konstante Mangel an Gefäßsystemen, an immunologischen Abwehrmechanismen oder an Transportmöglichkeiten von Zellmetaboliten ist ein großer Nachteil von *in vitro* Systemen [41]. Das Problem der fehlenden Vaskularisation kann durch die Verwendung von Trägersystemen im Bioreaktor mit azellularisierten Gefäßstrukturen, die mit endothelialen Zellen besiedelt werden, umgangen werden. Auch ein unterschiedliches Wachstum der Tumorzellen *in vitro* im Vergleich zu *in vivo*, wie sie im 2D-System oft vorkommt, könnte leicht dazu führen, den Effekt von beispielsweise wachstumshemmenden Substanzen zu überschätzen. Nur Tumorzellen in weit fortgeschrittenen Stadien haben diese Fähigkeit zum schnellen und unkontrollierten Wachstum *in vitro* weitestgehend verloren, sodass eine solche Untersuchung bisher nicht in frühen Phasen des Tumors durchgeführt werden kann [128]. Eine weitere Limitation des *in vitro* Zellkultursystems ist die Imitation eines statischen Systems, welches im Gegensatz zur *in vivo* Situation keinen Progress aufweist [47].

4.6 Ausblick

Es gibt viele Gründe, warum das Entwickeln von 3D-Systemen mit humanen Tumorzellen entscheidend dazu beiträgt, die Übertragbarkeit der in vitro Ergebnisse auf die in vivo Situation zu erhöhen, die Anzahl an Tierversuchen zu verringern [129] und die Effizienz von der Entwicklung von Therapiestrategien in präklinischen Untersuchungen zu erhöhen [69]. In der Zellkultur kann der Einfluss einzelner Faktoren auf das Zellverhalten präziser untersucht werden als in Tierversuchen, da im Tier ein ganzer komplexer Organismus das Zellverhalten beeinflusst. Um die wissenschaftlichen Erkenntnisse der Tumorgrundlagenforschung auf den Menschen zu übertragen, bedarf es also zellbasierter Testsysteme, die den dreidimensionalen Aufbau eines Gewebetyps oder Organs imitieren. Dabei können beispielsweise verschiedene Zelltypen miteinander kultiviert, deren Interaktion untereinander oder der Einfluss von Chemotherapeutika auf Tumorzellen experimentell untersucht werden [69]. Dieses Tissue Engineering mit dem Aufbau von bioartifziellen dreidimensionalen und gewebsspezifischen Zellkultur-Modellen bietet somit, im Gegensatz zur begrenzten Einsicht der üblichen 2D-Zellkultursysteme, nicht nur die Möglichkeit, die komplexen Zusammenhänge des Tumorgeschehens in lebenden Organismen besser zu verstehen, sondern auch die Entwicklung neuer individueller Tumorthérapien zu beschleunigen [47, 49]. So konnten beispielsweise durch multizelluläre 3D-Modelle in vitro wichtige Daten über den prognostischen zellmorphologischen Fingerabdruck des Brustkrebs gewonnen werden [130] und wichtige Faktoren für die Ausbildung invasiver und metastasierender Eigenschaften identifiziert werden [131]. Wenn man die Interaktionen zwischen spezifischem und unspezifischem Immunsystem und Tumorzellen mithilfe der Etablierung dieser 3D-Tumorzellmodelle besser versteht, wird es zukünftig möglich sein, das Immunsystem mithilfe von endogenen Faktoren oder Immunzellen so zu modifizieren, dass es erfolgreicher im Kampf gegen Tumorzellen ist als bisher, ähnlich wie wir das mit unserem konditioniertem Medium in 3D durchgeführt haben. Das Experiment 2.10.8.9 zeigt, dass die Konzentrationen von TNF α und IFN γ der aktivierten PBMC-Überstände aus dem

2D-System nach 24 h Kultivierung mit SW480-Zellen geringer sind als die Konzentrationen des Überstandes nach 24 h ohne Kultivierung mit SW480-Zellen. Dies bekräftigte also unsere Annahme, dass diese beiden Schlüsselzytokine eine bedeutende Rolle in dem Prozess der Apoptoseinduktion im 3D-System spielen könnten. Wobei hier noch zu klären gilt, ob es im konditioniertem Medium außer TNF α und IFNY, andere Schlüssel-moleküle wie z.B. Granzym B oder Perforine gibt, welche von NK-zellen ausgeschüttet werden im Rahmen der angeborenen zellvermittelten Immunantwort welche wiederum die Apoptose im 3D-System induzieren. Beispielsweise könnte man Inhibitionsexperimente mit neutralisierenden monoklonalen Antikörpern gegen TNF α bzw. IFNY zur Abklärung, ob TNF α und/oder IFNY alleinige Faktoren für die Unterschiede zwischen 2D und 3D sind, durchführen. Andersherum könnte man untersuchen, ob im 2D-System konditionierte PBMC in der Lage sind, Apoptose im 3D-System zu induzieren und die relativen Apoptoseraten der SW480-Zellen durch konditioniertes zellfreies PBMC Medium mit den relativen Apoptoseraten der konditionierten PBMC im 3D-System vergleichen.

Im Folgenden werde ich auf weitläufigere zukünftige Forschungsansätze eingehen, bei denen das 3D-Zellkulturmodell entscheidend dazu beitragen könnte, neue und effektivere Therapien gegen Tumorzellen zu entwickeln.

Verschiedenste Untersuchungen haben gezeigt, dass der autologe Transfer von tumorspezifischen T-Zellen, die aus TIL gewonnen wurden, einen positiven Effekt auf die Regression von Tumorzellen hat. So sprachen etwa 51 % der Tumorzellen von 35 Patienten mit einem metastasierenden Melanom auf diese Therapieform an [132]. Weitere Erkenntnisse über die Bedeutung der TIL und deren Phänotypisierung führten dazu, dass von vielen bedeutenden Wissenschaftlern die Einführung eines Immunscores des kolorektalen Karzinoms neben dem klinisch etablierten TNM System gefordert wird, der den immunologischen Status der adaptiven Immunabwehr gegen die Tumorzellen des Patienten quantifiziert, um die Evidenz der Aussagekraft bezüglich Prognose und Therapie des Tumors zu erhöhen. Dieser Immunscore basiert auf der unterschiedlichen Dichte und Lokalisation der einzelnen TIL-Subpopulationen (CD8, CD4, CD45R0) [133-135], welche in einem geeigneten realitätsnahen dreidimensionalen Zellkultursystem

ausgiebig über einen längeren Zeitraum untersucht werden könnten.

Die T-Zell basierte Immuntherapie (TCI) bei Patienten mit kolorektalem Karzinom wurde erstmalig im Jahre 1998 beschrieben [136], bevor sie 2002 mit der Etablierung der Immunodepletion mehr und mehr an Effektivität erlangte [137]. Eine Voraussetzung für den Erfolg von Krebsimmuntherapien wie die der TCI, ist das Aufspüren von tumorspezifischen Antigenen (TSA). Diese Antigene sind, wie der Name schon sagt, tumorspezifisch, werden also von humanen Zellen nicht exprimiert und idealerweise von allen Krebszellen im gesamten Zellzyklus in hoher Menge an MHC I Klasse Molekülen präsentiert. In der Realität handelt es sich aber meistens um TAA, die nur von wenigen Tumorzellen und nur in ganz bestimmten Zellzyklen exprimiert werden. So ist die Identifizierung dieser Tumorantigene mit hoher Immunogenität eine der größten Herausforderungen in der Tumormimmunologie [138]. Dabei unterscheidet man die reverse Immunologie von der klassischen Immunologie. Die klassische Immunologie versucht, ausgehend von Antikörpern oder spezifischen T-Zellen, auf das zugehörige Antigen zu schließen. In der reversen Immunologie sucht man ausgehend von Antigenen passende Antikörper. Sie startet mit der theoretischen Vorhersage relevanter MHC-I- und MHC-II-Liganden aus Aminosäuresequenzen, welche nachfolgend über die Erkennung durch die Zugabe von T-Zellen getestet werden. Dieses Verfahren ist voll automatisiert und arbeitet als Hochdurchsatz-Screening. Für den klinischen Erfolg dieser vielversprechenden Methode und der daraus resultierenden Möglichkeit eines adaptiven Immunzelltransfer von beispielsweise T-Zellen, TIL oder antigenbeladenen DC [139] durchzuführen, ist es sehr wichtig, Antigene in vitro zu generieren, die der in vivo-Situation möglichst ähnlich sind [132]. Deshalb ist es essentiell, reproduzierbare, realitätsnahe 3D-Tumorzellmodelle zu etablieren, die nicht nur zur Grundlagenforschung verwendet werden können, sondern auch für die personalisierte Medizin. So ist es vorstellbar, nach Entnahme einer Gewebebiopsie aus dem Tumorzellverband des Patienten, Tumorzellen und Stromazellen [47] in vitro zu kultivieren, um später eine individuelle Epitopkartierung zu erstellen und somit patientenspezifische Immunmodulatoren im Kampf gegen den Krebs zu entwickeln [138]. Zudem könnten Aktivatoren des unspezifischen Immunsystems ausfindig gemacht

werden, ähnlich der systematischen Gabe von IFN α beim Nierenzellkarzinom. Zusammenfassend zeigt das in dieser Arbeit verwendete KRK-3D-Zellkulturmodell eine drastisch reduzierte Induktion der Tumorzellapoptose im Vergleich zum 2D-Zellkulturmodell, die durch allogene mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) in Monokulturen und auch in mit Fibroblasten angereicherten Co-Kulturmodellen induziert wird. Dies weist darauf hin, dass komplexe 3D-Modelle mit allopathen Zellen in Zukunft ein therapeutisches Fenster zum Testen von Antigen-unabhängigen immunstimulierenden oder -inhibitorischen Mitteln bieten.

5. Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom zählt zu den häufigsten Tumoren in den westlichen Nationen [62]. Für die Heilung ist neben der frühen Diagnose und der korrekten Klassifikation in UICC-Stadien, die Auswahl einer effektiven individuellen Therapiestrategie von Bedeutung. Der Schlüssel für die erfolgreiche Verbesserung dieser und weiterer Schritte in der Behandlung eines kolorektalen Karzinom ist die Analyse der Interaktion zwischen kolorektalen Karzinomzellen und Immunzellen in einem 3D-Zellkulturmodell, das es ermöglicht, die in vivo Situation möglichst realitätsnah zu imitieren.

Im Vergleich zwischen einem 2D- und 3D-Zellkulturmodell konnten in dieser Arbeit bedeutende und reproduzierbare Unterschiede sowohl im Wachstumsverhalten und in der Zellmorphologie von Kolonkarzinomzellen (SW480-Zellen), Fibroblasten und Immunzellen (PBMC) als auch in deren Interaktion untereinander aufgezeigt werden.

PBMC induzieren im 2D-System sowohl bei der MK der SW480-Zellen als auch bei der KK mit Fibroblasten im Vergleich zum 3D-System deutlich mehr Apoptose. So gibt es bei der MK mit 1, 2 und 3 Millionen PBMC eine durchschnittliche Apoptosezunahme von 88 % nach 24 h und von 95 % nach 48 h. Bei der KK mit ebenfalls 1, 2 und 3 Millionen PBMC gibt es mit durchschnittlich 89 % nach 24 h und 92 % nach 48 h vergleichbare Apoptosezunahmen.

Zellkulturen auf azellularisierter Darmmatrix bieten den Raum für die bereits erwähnten wichtigen 3D-Zell-ECM- und Zell-Zellinteraktionen, realitätsnahe extrazelluläre Matrizen und soluble Substanzen, die eine sehr große Bedeutung für die Ausbildung tumorspezifischer Charakteristika haben wie z. B. Karzinogenese, Gewebsdifferenzierung Proliferationsgeschwindigkeit, Metastasierungspotential, Malignität, Angiogeneseeigenschaften und Mikroumgebungsbedingungen wie sie im System Mensch vorkommen [21, 47].

Sie besitzen durch ihre viel komplexere histologische Struktur im Vergleich zu den zweidimensionalen Monolayer-Systemen eine höhere Aussagekraft, bieten eine bessere Vergleichbarkeit mit Tumorsystemen in lebenden Organismen und

mindern die experimentelle Fehlinterpretationsraten im Vergleich zu 2D-Modellen [41, 42]. So ist es auch nicht verwunderlich, dass die Ergebnisse bezüglich der Apoptoserate der SW480-Zellen in beiden Zellkulturmodellen so unterschiedlich ausfallen. Durch eine gute strategische Planung der Durchführung weiterer Experimente und der Quantifizierung von weiteren möglichen Zytokinen könnte der Pool an möglichen Wegen hin zur Apoptose der SW480-Zelle eingeengt werden.

Unsere Ergebnisse zeigen, wie wichtig es ist, auch zukünftig weiter an dieser Thematik zu forschen, um so die Therapie des kolorektalen Karzinoms entscheidend zu verbessern. So wäre es durchaus vorstellbar, innerhalb dieses 3D-Modells durch Experimente, die beispielsweise die Tumorzellumgebung oder die Immunzeleigenschaften verändern, dem tumorzellbiologischen Verhalten und der immunologischen Tumor-Wirtsbeziehung in vivo entscheidend näher zu kommen.

Abstract

Colorectal carcinoma (CRC) is one of the most common tumors in the western nations [62]. In addition to the early diagnosis and the correct classification in UICC stages, the selection of an effective individual therapy strategy is important for the healing. The key to successfully improving this and other steps in the treatment of CRC is the analysis of the interaction between colorectal carcinoma cells and immune cells in a three-dimensional cell culture model that allows the in vivo situation to be as realistic as possible. In a comparison between a two-dimensional and three-dimensional cell culture model, significant and reproducible differences in the growth behavior and cell morphology of colon carcinoma cells (SW480 cells), fibroblasts and immune cells (PBMC) as well as their interaction with each other could be demonstrated. In the 2D-system, PBMC induce markedly more apoptosis in the monoculture of SW480 cells as well as in co-culture with fibroblasts compared to the 3D-system. For example, in monoculture with 1, 2 and 3 million PBMC, there is an average increase in apoptosis of 88 % after 24 h and of 95 % after 48 h. In coculture with likewise 1, 2 and 3 million PBMC, there are comparable apoptosis increases with an average of 89 % after 24 h and 92 % after 48 h.

Cell cultures on acellularized intestinal matrix, as I have used them, provide the space for the already mentioned important 3D-cell-ECM and cell-cell interactions, realistic extracellular matrices and soluble substances that are very important in the formation of tumor-specific characteristics such as carcinogenesis, tissue differentiation Proliferation rate, metastatic potential, malignancy, angiogenic properties and microenvironmental conditions as found in the human system [21, 47].

They have a higher informative value due to their much more complex histological structure compared to the two-dimensional monolayer systems, offer better comparability with tumor systems in living organisms and reduce the experimental misinterpretation rates compared to 2D-models [41, 42]. Thus, it is not surprising that the results regarding the apoptosis rates of the SW480 cells are

so different in both cell culture models. Good strategic planning of further experiments and quantification of cytokines such as $\text{TNF}\alpha$ and IFN γ narrowed the pool of possible pathways to apoptosis of the SW480 cell induced by the immune cell. Therefore, it is very probable that no soluble substances are causally involved in the induction of apoptosis, but it is cell-mediated.

These results will hopefully motivate the scientists to continue researching this topic in the future in order to decisively improve the therapy of the CRC. Thus, it would be conceivable within this 3D-model by experiments that change, for example, the tumor cell environment or the immune cell properties, the tumor cell biological behavior and the immunological tumor-host relationship in vivo to come significantly closer.

6. Literaturverzeichnis

1. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. 8(12): p. 958-69.
2. Delves, P.J., et al., *Roitt's essential immunology*. Thirteenth edition ed. 2017, New York: Wiley Blackwell. XV, 556 Seiten.
3. Murphy, K.M., et al., *Janeway - Immunologie*. 7. Aufl., korr. Nachdr. ed. Springer Lehrbuch. 2014, Berlin Heidelberg: Springer Spektrum. XXVI, 1093 S.
4. Scharrtl, M. and M. Arand, *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen mit über 1000 Abbildungen; große Falttafel mit Stoffwechselübersicht*. 1. Aufl. ed. 2009, München: Elsevier Urban & Fischer. XXII, 1034 S.
5. Hashimoto, D., J. Miller, and M. Merad, *Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo*. Immunity, 2011. 35(3): p. 323-35.
6. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. Nat Rev Immunol, 2005. 5(12): p. 953-64.
7. H.W., E.R.H.F., *The extravascular development of the monocyte observed in vivo*, U.o.O. Sir William Dunn School of Pathology, Editor. 1939.
8. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and molecular immunology*. 6. ed. ed. 2007, Philadelphia [S.l.]: Saunders Elsevier. VIII, 566 S.
9. Stout, R.D., et al., *Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences*. J Immunol, 2005. 175(1): p. 342-9.
10. Gordon, S., *The macrophage: past, present and future*. Eur J Immunol, 2007. 37 Suppl 1: p. S9-17.
11. Fridman, W.H., et al., *The immune microenvironment of human tumors: general significance and clinical impact*. Cancer Microenviron, 2013. 6(2): p. 117-22.
12. Edwards, J.P., et al., *Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations*. J Leukoc Biol, 2006. 80(6): p. 1298-307.
13. Biron, C.A., et al., *Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines*. Annu Rev Immunol, 1999. 17: p. 189-220.
14. Carnaud, C., et al., *Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells*. J Immunol, 1999. 163(9): p. 4647-50.
15. Acuto, O. and F. Michel, *CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling*. Nat Rev Immunol, 2003. 3(12): p. 939-51.
16. Michie, C.A., et al., *Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms*. Nature, 1992. 360(6401): p. 264-5.
17. *Cytometry the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2003, Hoboken, NJ: Wiley-Liss.
18. Tseng, S.Y. and M.L. Dustin, *T-cell activation: a multidimensional signaling network*. Curr Opin Cell Biol, 2002. 14(5): p. 575-80.
19. Barry, M. and R.C. Bleackley, *Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death*. Nat Rev Immunol, 2002. 2(6): p. 401-9.

20. Raja, S.M., et al., *Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis. Characterization of the macromolecular complex of granzyme B with serglycin*. J Biol Chem, 2002. 277(51): p. 49523-30.
21. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. 144(5): p. 646-74.
22. Zhang, L., et al., *Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer*. N Engl J Med, 2003. 348(3): p. 203-13.
23. Igney, F.H. and P.H. Krammer, *Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack*. J Leukoc Biol, 2002. 71(6): p. 907-20.
24. Ikeda, H., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. 13(2): p. 95-109.
25. Gajewski, T.F., H. Schreiber, and Y.X. Fu, *Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment*. Nat Immunol, 2013. 14(10): p. 1014-22.
26. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. Cell, 2010. 140(6): p. 883-99.
27. Jaffee, E.M. and D.M. Pardoll, *Murine tumor antigens: is it worth the search?* Curr Opin Immunol, 1996. 8(5): p. 622-7.
28. Burnet, F.M., *The concept of immunological surveillance*. Prog Exp Tumor Res, 1970. 13: p. 1-27.
29. Thomas, L., *On immunosurveillance in human cancer*. Yale J Biol Med, 1982. 55(3-4): p. 329-33.
30. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. Science, 2011. 331(6024): p. 1565-70.
31. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. Immunity, 2004. 21(2): p. 137-48.
32. Amedei, A., E. Niccolai, and M.M. D'Elia, *T cells and adoptive immunotherapy: recent developments and future prospects in gastrointestinal oncology*. Clin Dev Immunol, 2011. 2011: p. 320571.
33. Hicklin, D.J., F.M. Marincola, and S. Ferrone, *HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story*. Mol Med Today, 1999. 5(4): p. 178-86.
34. Erdman, S.E. and T. Poutahidis, *Roles for inflammation and regulatory T cells in colon cancer*. Toxicol Pathol, 2010. 38(1): p. 76-87.
35. Karin, M., *Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression*. Nature, 2006. 441(7092): p. 431-6.
36. Rao, V.P., et al., *Innate immune inflammatory response against enteric bacteria Helicobacter hepaticus induces mammary adenocarcinoma in mice*. Cancer Res, 2006. 66(15): p. 7395-400.
37. Marnett, L.J. and R.N. DuBois, *COX-2: a target for colon cancer prevention*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002. 42: p. 55-80.
38. Thurnher, M., et al., *Bacillus Calmette-Guerin mycobacteria stimulate human blood dendritic cells*. Int J Cancer, 1997. 70(1): p. 128-34.
39. Leonhartsberger, N., et al., *Antigen-independent immune responses after dendritic cell vaccination*. Cancer Immunol Immunother, 2007. 56(6): p. 897-903.

40. Pichler, R., et al., *Tumor-infiltrating immune cell subpopulations influence the oncologic outcome after intravesical Bacillus Calmette-Guerin therapy in bladder cancer*. *Oncotarget*, 2016. 7(26): p. 39916-39930.
41. Nietzer, S., et al., *Mimicking Metastases Including Tumor Stroma: A New Technique to Generate a Three-Dimensional Colorectal Cancer Model Based on a Biological Decellularized Intestinal Scaffold*. *Tissue Eng Part C Methods*, 2016. 22(7): p. 621-35.
42. Ghajar, C.M. and M.J. Bissell, *Tumor engineering: the other face of tissue engineering*. *Tissue Eng Part A*, 2010. 16(7): p. 2153-6.
43. Bhattacharjee, Y., *Pharma Firms Push for Sharing of Cancer Trial Data*. *Science*, 2012. Vol. 338, Issue 6103, pp. 29.
44. Cree, I.A., Glaysher, S. and Harvey, A. L., *Efficacy of anti-cancer agents in cell lines versus human primary tumour tissue*. *Curr Opin Pharmacol*, 2010. 10, 375-379.
45. Vacanti, C.A., *The history of tissue engineering*. *J Cell Mol Med*, 2006. 10(3): p. 569-76.
46. Macchiarini, P., et al., *First human transplantation of a bioengineered airway tissue*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2004. 128(4): p. 638-41.
47. Moll, C., et al., *Tissue engineering of a human 3D in vitro tumor test system*. *J Vis Exp*, 2013(78).
48. Desmouliere, A., C. Guyot, and G. Gabbiani, *The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior*. *Int J Dev Biol*, 2004. 48(5-6): p. 509-17.
49. Stratmann, A.T.D., G. Nietzer, S., *Three-dimensional in vitro Tumor Models as an Alternative for Animal Models in Preclinical Studies*. *Pharm. Ind.*, 2013. 75(3): p. 485-489.
50. Lu, P., et al., *Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011. 3(12).
51. Friedrich, J., R. Ebner, and L.A. Kunz-Schughart, *Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge?* *Int J Radiat Biol*, 2007. 83(11-12): p. 849-71.
52. Nath, S.a.D., G. R., *Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model*. *Pharmacol Ther* 2016. 163, 94-108.
53. Kelm, J.M., et al., *Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types*. *Biotechnol Bioeng*, 2003. 83(2): p. 173-80.
54. Wu, L.Y., D. Di Carlo, and L.P. Lee, *Microfluidic self-assembly of tumor spheroids for anticancer drug discovery*. *Biomed Microdevices*, 2008. 10(2): p. 197-202.
55. Yuhas, J.M., et al., *A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids*. *Cancer Res*, 1977. 37(10): p. 3639-43.
56. Elson, D.A., et al., *Coordinate up-regulation of hypoxia inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-1 target genes during multi-stage epidermal carcinogenesis and wound healing*. *Cancer Res*, 2000. 60(21): p. 6189-95.
57. Murata, Y., et al., *IFN-gamma and pro-inflammatory cytokine production by antigen-presenting cells is dictated by intracellular thiol redox status regulated by oxygen tension*. *Eur J Immunol*, 2002. 32(10): p. 2866-73.

58. Bernard, M.P., et al., *Nucleotide sequences of complementary deoxyribonucleic acids for the pro alpha 1 chain of human type I procollagen. Statistical evaluation of structures that are conserved during evolution.* *Biochemistry*, 1983. 22(22): p. 5213-23.
59. Hubbell, J.A., *Biomaterials in tissue engineering.* *Biotechnology (N Y)*, 1995. 13(6): p. 565-76.
60. Street, S.E., E. Cretney, and M.J. Smyth, *Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis.* *Blood*, 2001. 97(1): p. 192-7.
61. Shin, H., S. Jo, and A.G. Mikos, *Biomimetic materials for tissue engineering.* *Biomaterials*, 2003. 24(24): p. 4353-64.
62. Jehle, E.C. and I.r. Tumorzentrum, *Kolonkarzinom, Rektumkarzinom, Analkarzinom [Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge]. 2., überarb. Aufl. ed. Schriftenreihe Therapieempfehlungen des ITZ Tübingen.* 2003, Tübingen: Interdisziplinäres Tumorzentrum ITZ. 76 S.
63. Robert-Koch-Institut and G.d.E.K.i. Deutschland, *Krebs in Deutschland ... Elektronische Ressource Häufigkeiten und Trends; eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V, in Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes.* 2008, Robert Koch-Inst.: Berlin. p. Online-Ressource.
64. Friedenreich, C.M. and M.R. Orenstein, *Physical activity and cancer prevention: etiologic evidence and biological mechanisms.* *J Nutr*, 2002. 132(11 Suppl): p. 3456S-3464S.
65. Tezcan, G., et al., *Molecular approach to genetic and epigenetic pathogenesis of early-onset colorectal cancer.* *World J Gastrointest Oncol*, 2016. 8(1): p. 83-98.
66. Brierley, J., M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, *TNM classification of malignant tumours.* Eighth edition ed. 2017, Chichester, West Sussex, UK Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc. XVIII, 253 Seiten.
67. Pox, C.P., et al., *S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom Version 1.0 Elektronische Ressource = S3-guideline colorectal cancer version 1.0 Juni 2013; AWMF-Registernummer: 021/0070L.* 2013. p. Online-Ressource.
68. Pusch, J., et al., *The physiological performance of a three-dimensional model that mimics the microenvironment of the small intestine.* *Biomaterials*, 2011. 32(30): p. 7469-78.
69. Stratmann, A.T.D., G.; Nietzer, S., *Three-dimensional in vitro Tumor Models as an Alternative for Animal Models in Preclinical Studies,* in *Researchgate.* 2013.
70. Schanz, J., et al., *Vascularised human tissue models: a new approach for the refinement of biomedical research.* *J Biotechnol*, 2010. 148(1): p. 56-63.
71. Rongvaux, A., Willinger, T., Martinek, J. et al., *Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model.* *Nat Biotechnol*, 2014. 32, 364-372.
72. D Friberg, J.B., W Shannon, T L Whiteside, *In vitro cytokine production by normal human peripheral blood mononuclear cells as a measure of*

- immunocompetence or the state of activation.* Diagn Lab Immunol, 1994. 1(3):261-8.
73. ATCC. *Product Sheet of SW480 [SW-480] (ATCC® CCL-228™).* 2013; Product Sheet].
 74. Filiz, B., et al., *Anticancer Effect of Ferulago Mughlea Pesmen (Apiaceae) on Cancer Cell Proliferation.* Iran J Pharm Res, 2016. 15(3): p. 501-504.
 75. de la Mare, J.A., T. Jurgens, and A.L. Edkins, *Extracellular Hsp90 and TGFbeta regulate adhesion, migration and anchorage independent growth in a paired colon cancer cell line model.* BMC Cancer, 2017. 17(1): p. 202.
 76. Boyum, A., *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g.* Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1968. 97: p. 77-89.
 77. Ferrante, A. and Y.H. Thong, *Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the Hypaque-Ficoll method.* J Immunol Methods, 1980. 36(2): p. 109-17.
 78. Luttmann, W., *Der Experimentator: Immunologie.* 4., vollst. überarb. und korr. Aufl. ed. Der Experimentator. 2014, Berlin Heidelberg: Springer Spektrum. XVIII, 299 S.
 79. Yang, J., et al., *The effects of storage temperature on PBMC gene expression.* BMC Immunol, 2016. 17: p. 6.
 80. Stratmann, A.T., Fecher, D., Wangorsch, G. et al., *Establishment of a human 3d lung cancer model based on a biological tissue matrix combined with a boolean in silico model.* Mol Oncol, 2014. 8, 351-365.
 81. Gottlich, C., Kunz, M., Zapp, C. et al., *A combined tissue-engineered/in silico signature tool patient stratification in lung cancer.* Mol Oncol, 2018. 12, 1264-1285.
 82. Stratmann, A.T., et al., *Establishment of a human 3D lung cancer model based on a biological tissue matrix combined with a Boolean in silico model.* Mol Oncol, 2014. 8(2): p. 351-65.
 83. Yamada, K.M. and E. Cukierman, *Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D.* Cell, 2007. 130(4): p. 601-10.
 84. Moll, C., *Grundlagen zur Entwicklung eines in vitro Tumortestsystems für Nervenscheidentumore.* Diplomarbeit, 2011.
 85. Schürlein, S., *Entwicklung von Technologien zur Optimierung von Tissue Engineering Prozessen am Beispiel der Herstellung von kardialem Gewebe,* J.-M.-U.t. Würzburg, Editor. 2016.
 86. Peviva, *M30 CytoDeath™ ELISA - Instructions for use.* 2014.
 87. Kramer, G., et al., *Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18.* Cancer Res, 2004. 64(5): p. 1751-6.
 88. Thomas Brabletz*†, A.J., Simone Reu*, Marc Porzner*, Falk Hlubek*, Leoni A. Kunz-Schughart‡, Ruth Knuechel‡, and Thomas Kirchner*, PNAS, 2001. 98 No.18 10356–10361.
 89. Johanna Kühnemundt¹, Heidi Leifeld^{1,*}, Florian Scherg^{1,*}, Matthias Schmitt^{1,*}, Lena Nelke¹, Tina Schmitt¹, Florentin Baur^{1,2}, Claudia Göttlich^{1,2}, Maximilian Fuchs³, Meik Kunz^{3,4}, Matthias Peindl¹, Caroline

- Brähler¹, Corinna Kronenthaler¹, Jörg Wischhusen⁵, Martina Prelog⁶, Heike Walles^{1,2,7}, Thomas Dandekar³, Gudrun Dandekar^{1,2,§} and Sarah L. Nietzer^{1,2,§}, *Modular Micro-Physiological Human Tumor/Tissue Models Based on Decellularized Tissue for Improved Preclinical Testing*. Altex, 2020.
90. Kimlin, L.C., G. Casagrande, and V.M. Virador, *In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research: an update*. *Mol Carcinog*, 2013. 52(3): p. 167-82.
 91. Santini, M.T., et al., *MG-63 human osteosarcoma cells grown in monolayer and as three-dimensional tumor spheroids present a different metabolic profile: a (1)H NMR study*. *FEBS Lett*, 2004. 557(1-3): p. 148-54.
 92. Fischbach, C., et al., *Engineering tumors with 3D scaffolds*. *Nat Methods*, 2007. 4(10): p. 855-60.
 93. Hauptmann, S., et al., *Integrin expression on colorectal tumor cells growing as monolayers, as multicellular tumor spheroids, or in nude mice*. *Int J Cancer*, 1995. 61(6): p. 819-25.
 94. Kalluri, R. and M. Zeisberg, *Fibroblasts in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(5): p. 392-401.
 95. Nagorsen, D., et al., *Tumor-infiltrating macrophages and dendritic cells in human colorectal cancer: relation to local regulatory T cells, systemic T-cell response against tumor-associated antigens and survival*. *J Transl Med*, 2007. 5: p. 62.
 96. Dadabayev, A.R., et al., *Dendritic cells in colorectal cancer correlate with other tumor-infiltrating immune cells*. *Cancer Immunol Immunother*, 2004. 53(11): p. 978-86.
 97. Klimp, A.H., et al., *A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2002. 44(2): p. 143-61.
 98. Hagemann, T., et al., *"Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB*. *J Exp Med*, 2008. 205(6): p. 1261-8.
 99. Ossendorp, F., et al., *Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors*. *J Exp Med*, 1998. 187(5): p. 693-702.
 100. Galon, J., et al., *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome*. *Science*, 2006. 313(5795): p. 1960-4.
 101. Galon, J., W.H. Fridman, and F. Pages, *The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective*. *Cancer Res*, 2007. 67(5): p. 1883-6.
 102. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. *Nat Immunol*, 2003. 4(4): p. 330-6.
 103. Ogino, S., et al., *CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer*. *Gut*, 2009. 58(1): p. 90-6.
 104. Popat, S., R. Hubner, and R.S. Houlston, *Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis*. *J Clin Oncol*, 2005. 23(3): p. 609-18.

105. Nosho, K., et al., *Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review*. J Pathol, 2010. 222(4): p. 350-66.
106. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. 401(6754): p. 708-12.
107. Salama, P., et al., *Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2009. 27(2): p. 186-92.
108. Chaput, N., et al., *Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue*. Gut, 2009. 58(4): p. 520-9.
109. Yang, S., et al., *Foxp3+IL-17+ T cells promote development of cancer-initiating cells in colorectal cancer*. J Leukoc Biol, 2011. 89(1): p. 85-91.
110. Hodi FS, O.D.S., McDermott DF et al., *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. N Engl J Med, 2010. 363:711-723.
111. Kathy, M., *The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses*. Immunology and Cell Biology, 1999. 77: p. P. 1-10.
112. Zhang, Y.T., et al., *Identification of proteins of human colorectal carcinoma cell line SW480 by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry*. World J Gastroenterol, 2005. 11(30): p. 4679-84.
113. Lopez-Soto, A., et al., *HDAC3 represses the expression of NKG2D ligands ULBPs in epithelial tumour cells: potential implications for the immunosurveillance of cancer*. Oncogene, 2009. 28(25): p. 2370-82.
114. Vicinus, B., et al., *miR-21 functionally interacts with the 3'UTR of chemokine CCL20 and down-regulates CCL20 expression in miR-21 transfected colorectal cancer cells*. Cancer Lett, 2012. 316(1): p. 105-12.
115. Gemsa, D., E. Albert, and K.-O. Vorlaender, *Immunologie Grundlagen, Klinik, Praxis; 224 Tabellen*. 4., neubearb. und erw. Aufl. ed. 1997, Stuttgart New York: Thieme. XXI, 697 S.
116. Friedl, P., et al., *Classifying collective cancer cell invasion*. Nat Cell Biol, 2012. 14(8): p. 777-83.
117. Gaggioli, C., et al., *Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells*. Nat Cell Biol, 2007. 9(12): p. 1392-400.
118. Banyard, J. and D.R. Bielenberg, *The role of EMT and MET in cancer dissemination*. Connect Tissue Res, 2015. 56(5): p. 403-13.
119. Lu, S., Wang, H. and Taube, J. M., *Different biomarker modalities and response to anti-pd-1/pd-l1 therapies-reply*. JAMA Oncol, 2019.
120. Tumeh, P.C., Harview, C. L., Yearley, J. H. et al., *Pd-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance*. Nature, 2014. 515, 568-571.
121. Kalluri, R., *The biology and function of fibroblasts in cancer*. Nat Rev Cancer, 2016. 16, 582-598.
122. Gao, Q., Yang, Z., Xu, S. et al., *Heterotypic caf-tumor spheroids promote early peritoneal metastasis of ovarian cancer*. J Exp Med, 2019. 216, 688-703.
123. Valkenburg, K.C., de Groot, A. E. and Pienta, K. J., *Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy*. Nat Rev Clin Oncol, 2018. 15, 366-381.

124. Voskoglou-Nomikos, T., J.L. Pater, and L. Seymour, *Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models*. Clin Cancer Res, 2003. 9(11): p. 4227-39.
125. Schmitz, S., *Der Experimentator: Zellkultur*. 3. Aufl. ed. Der Experimentator. 2011, Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. XVI, 272 S.
126. Fernando, A., et al., *Effect of culture conditions on the chemosensitivity of ovarian cancer cell lines*. Anticancer Drugs, 2006. 17(8): p. 913-9.
127. Cree, I.A., S. Glaysher, and A.L. Harvey, *Efficacy of anti-cancer agents in cell lines versus human primary tumour tissue*. Curr Opin Pharmacol, 2010. 10(4): p. 375-9.
128. Masters, J.R., *Human cancer cell lines: fact and fantasy*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. 1(3): p. 233-6.
129. Schenke-Layland, K. and R.M. Nerem, *In vitro human tissue models--moving towards personalized regenerative medicine*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. 63(4-5): p. 195-6.
130. Martin, K.J., et al., *Prognostic breast cancer signature identified from 3D culture model accurately predicts clinical outcome across independent datasets*. PLoS One, 2008. 3(8): p. e2994.
131. Kenny, H.A. and E. Lengyel, *MMP-2 functions as an early response protein in ovarian cancer metastasis*. Cell Cycle, 2009. 8(5): p. 683-8.
132. Dudley, M.E., et al., *Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma*. J Clin Oncol, 2005. 23(10): p. 2346-57.
133. Galon, J., et al., *The immune score as a new possible approach for the classification of cancer*. J Transl Med, 2012. 10: p. 1.
134. Wolmark, N., et al., *The prognostic significance of tumor location and bowel obstruction in Dukes B and C colorectal cancer. Findings from the NSABP clinical trials*. Ann Surg, 1983. 198(6): p. 743-52.
135. Naito, Y., et al., *CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer*. Cancer Res, 1998. 58(16): p. 3491-4.
136. Rosenberg, S.A., et al., *Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report*. N Engl J Med, 1988. 319(25): p. 1676-80.
137. Dudley, M.E., et al., *Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes*. Science, 2002. 298(5594): p. 850-4.
138. Viatte, S., P.M. Alves, and P. Romero, *Reverse immunology approach for the identification of CD8 T-cell-defined antigens: advantages and hurdles*. Immunol Cell Biol, 2006. 84(3): p. 318-30.
139. Bhargava, A., et al., *Dendritic cell engineering for tumor immunotherapy: from biology to clinical translation*. Immunotherapy, 2012. 4(7): p. 703-18.

7. Anhang

7.1 Eigenleistung

Mitarbeit bei der Planung der Experimente. Alleinige Durchführung der Experimente: Anfertigung der Ficoll-Lymphozytenisolierung, regelmäßiges Passagieren und Kultivieren der SW480-Zellen und der Fibroblasten, Vorbereiten der Tumormodelle, Durchführung der Zellfixierung, Paraffineinbettung und Schnitt der Darmmatrix, histologische und immunhistologische Färbungen, Auswertung mittels M30-Elisa und Darstellung, Interpretation und Diskussion der Ergebnisse, wie sie in der Promotionsarbeit und zum Teil in der Publikation [89] beschrieben sind.

7.2 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Martina Prelog für die Möglichkeit der Promotion in der Kinderklinik des Universitätsklinikums Würzburg bedanken. Ich danke Ihnen für die stetige zuverlässige Unterstützung und für Ihre liebenswerte und begeisternde Art mich zu motivieren, zu fördern und kompetent zu betreuen. Weiterhin danke ich Ihnen für das entgegengebrachte Vertrauen, Ideen und Experimente selbstständig zu planen und umzusetzen.

Dr. Gudrun Dandekar und Dr. Sarah Nietzer danke ich für die ausgesprochen bereichernde Kooperation und der Möglichkeit im Labor am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin der Universität Würzburg experimentell arbeiten zu dürfen. Ihr habt mich bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit außerordentlich unterstützt.

Besonderer Dank gilt Heide Häfner (Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin) und Dr. Giovanni Almanzar Reina (Kinderklinik). Ihr habt durch Eure immer freundliche und uneingeschränkt geduldige Bereitschaft, mir

jederzeit Hilfestellungen im Labor zu geben, in hohem Maße zum Erfolg meiner Arbeit beigetragen.

Bei meinen Mitdoktoranden sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der beiden Labore möchte ich mich für die tolle Arbeitsatmosphäre und die anregenden und hilfreichen Gespräche bedanken.

Großen Dank gebührt auch meinen Eltern Anja und Andreas Scherg für das mehrmalige und sehr hilfreiche Korrekturlesen.

Von ganzem Herzen danke ich Antonia Auchter für ihre Ausdauer, Ruhe und Geduld mit der sie mir immer wieder Mut zugesprochen hat.

7.3 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

geboren am 31. August 1985 in Würzburg

SCHULBESUCH

1996-2005

Franz-Ludwig-von-Erthal Gymnasium in Lohr
Juni 2005 Abitur

STUDIUM

2006-2010

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Studium der Pharmazie

mit Erhalt der Approbation für Apotheker

04/2008

1. Staatsexamen Pharmazie

04/2010

2. Staatsexamen Pharmazie

06/2011

3. Staatsexamen Pharmazie

2011-2017

Studium der Humanmedizin

mit Erhalt der Approbation für Ärzte

07/2012

1. Staatsexamen Humanmedizin

04/2016

2. Staatsexamen Humanmedizin

07/2017

3. Staatsexamen Humanmedizin

BERUFSERFAHRUNG

04/2010-10/2010

1. Hälfte Praktisches Jahr: City-Apotheke in
Hamburg

10/2010-04/2011

2. Hälfte Praktisches Jahr: Engel-Apotheke in
Würzburg

06/2011-12/2015

Engel-Apotheke in Würzburg

08/2011-10/2011

Bienen-Apotheke in München

08/2011-10/2011

Pflegepraktikum am Max-Planck-Institut für
Psychiatrie in München

03/2012-04/2012

Pflegepraktikum in der Chirurgie

Missionsärztliches Klinikum in Würzburg

08/2012-12/2015

Adler-Apotheke in Würzburg

09/2013-10/2013

Famulatur in der Kardiologischen Praxis Dr.
Zwerenz in Würzburg

08/2014-10/2014

Famulatur in der Herz/Thoraxchirurgie im
Uniklinikum Würzburg

04/2016-08/2016

1. Terial Praktisches Jahr: Chirurgie im Kantonspital
Luzern

08/2016-12/2016

2. Terial Praktisches Jahr: Innere Medizin an der
Universitätsklinik Würzburg

01/2017-04/2017

3. Terial Praktisches Jahr: Neurochirurgie an der
Universitätsklinik Würzburg

01/2017-12/2017

Bären-Apotheke in Würzburg

03/2018-04/2019

Assistenzarzt für Neurochirurgie im Klinikum
Leopoldina in Schweinfurt

Seit 04/2019

Assistenzarzt für Neurochirurgie in der München
Klinik in München

8. Appendix

Im Folgenden ist meine vollständige Veröffentlichung als Erstautor abgebildet [89].

Research Article

Modular Micro-Physiological Human Tumor/Tissue Models Based on Decellularized Tissue for Improved Preclinical Testing

Johanna Kühnemundt^{1,*}, Heidi Leifeld^{1,*}, Florian Scherg^{1,*}, Matthias Schmitt^{1,*}, Lena Nelke¹, Tina Schmitt¹, Florentin Baur^{1,2}, Claudia Göttlich^{1,2}, Maximilian Fuchs³, Meik Kunz^{3,4}, Matthias Peindl¹, Caroline Brähler¹, Corinna Kronenthaler¹, Jörg Wischhusen⁵, Martina Prelog⁶, Heike Walles^{1,2,7}, Thomas Dandekar³, Gudrun Dandekar^{1,2,§} and Sarah L. Nietzer^{1,2,§}

¹Department Tissue Engineering and Regenerative Medicine, University Hospital Würzburg, Würzburg, Germany; ²Translational Center Regenerative Therapies, Fraunhofer Institute for Silicate Research ISC, Würzburg, Germany; ³Bioinformatics, Biocenter, University of Würzburg, Würzburg, Germany; ⁴Chair of Medical Informatics, Friedrich-Alexander University (FAU) of Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany; ⁵University Hospital Würzburg, Department for Obstetrics & Gynecology, Section for Experimental Tumor Immunology, University of Würzburg, Würzburg, Germany; ⁶Children's University Hospital, Pediatric Rheumatology/Special Immunology, University of Würzburg, Würzburg, Germany; ⁷FVST, Core Facility Tissue Engineering, Otto-von Guericke University Magdeburg, Germany

Abstract

High attrition-rates entailed by drug testing in 2D cell culture and animal models stress the need for improved modeling of human tumor tissues. In previous studies our 3D models on a decellularized tissue matrix have shown better predictivity and higher chemoresistance. A single porcine intestine yields material for 150 3D models of breast, lung, colorectal cancer (CRC) or leukemia. The uniquely preserved structure of the basement membrane enables physiological anchorage of endothelial cells and epithelial-derived carcinoma cells. The matrix provides different niches for cell growth: on top as monolayer, in crypts as aggregates and within deeper layers. Dynamic culture in bioreactors enhances cell growth. Comparing gene expression between 2D and 3D cultures, we observed changes related to proliferation, apoptosis and stemness. For drug target predictions, we utilize tumor-specific sequencing data in our *in silico* model finding an additive effect of metformin and gefitinib treatment for lung cancer *in silico*, validated *in vitro*. To analyze mode-of-action, immune therapies such as trispecific T-cell engagers in leukemia, as well as toxicity on non-cancer cells, the model can be modularly enriched with human endothelial cells (hECs), immune cells and fibroblasts. Upon addition of hECs, transmigration of immune cells through the endothelial barrier can be investigated. In an allogenic CRC model we observe a lower basic apoptosis rate after applying PBMCs in 3D compared to 2D, which offers new options to mirror antigen-specific immunotherapies *in vitro*. In conclusion, we present modular human 3D tumor models with tissue-like features for preclinical testing to reduce animal experiments.

1 Introduction

1.1 Preclinical test systems in oncology

Preclinical models in oncology still rely mostly on two-dimensional (2D) culture and on animal experiments. Translatability of such results into the clinic is, however, limited (Bhattacharjee, 2012). About 30 % of failures in cancer-related drug testing are related to safety and toxicity issues. In addition, more than 50 % of preclinical models fail to predict efficacy in patients. The need for improvements in this area is thus obvious (Arrowsmith and Miller, 2013). Improved *in vitro* models could drastically reduce the number of animals used for basic, preclinical as well as translational research. From a total of about 9.6 million animals used in basic (45 %) and translational/applied research (23 %) in the EU in 2017, cancer was the third-leading or even the most common field of application, respectively (EC, 2020). Innovative three-dimensional (3D) approaches reflecting relevant aspects of the *in vivo* situation reach from trans-well cultures, spheroids, synthetic or biological matrices, 3D printed models and organoids to whole organ-on-the-chip models (Albritton and Miller, 2017; Katt et al., 2016; Nath and Devi, 2016; Santo et al., 2017; van Duinen et al., 2015; Weeber et al., 2017; Xu et al., 2014). As so far no “magic bullet” exists for all cancer types, stages and patients, no single test system can be expected to meet the testing requirements of all different therapeutic approaches. Depending on the respective questions and the therapeutic strategies to be assessed, the required test

*authors contributed equally; § shared senior authors

Received August 14, 2020; Accepted December 9, 2020;
Epub December 11, 2020; © The Authors, 2021.

ALTEX 38(##), ###-###. doi:10.14573/altex.2008141

Correspondence: Sarah L. Nietzer, PhD
Department Tissue Engineering and Regenerative Medicine
University Hospital Würzburg
Röntgenring 11, 97070 Würzburg, Germany
(sarah.nietzer@uni-wuerzburg.de)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is appropriately cited.

systems have to be specifically adapted. More advanced therapeutic options including targeted and immune therapies and their combinations with more conventional chemotherapeutics or radiation approaches require suitable complex models. Optimized *in vitro* models could also reduce the large number of animals required to analyze different combinations of compounds. There are, however, defined features that are commonly advantageous for reliable models. A fully human setting avoids extrapolations across species boundaries. A gradual 3D growth of cancer cells is more likely to result in structures similar to those found in tumors *in vivo*. Due to their unphysiologically high proliferation index (often 80 to 90 %) 2D models generally lead to an overestimation of cytostatic effects (Cree et al., 2010). General tissue architecture, which includes response-modulating accessory cells as found in the tumor microenvironment, can only be replicated in complex 3D models. Moreover, a loss of tumor stroma over time which is frequently observed in transplantable *in vivo* tumor models as well as in organoids (Yada et al., 2018; Kim et al., 2019) may render these test systems insensitive to important contributions from the stromal compartment. Serious limitations also apply for the testing of immunotherapeutic agents in humanized animal models: Apart from the enormous cost and effort, species-specific differences of cytokines typically result in an impaired maturation and differentiation of certain human immune cell subsets in a murine microenvironment (Rongvaux et al., 2013, 2014; Song et al., 2019; Walsh et al., 2017; Anselmi et al., 2020). Being able to monitor immune-mediated tumor control in a predictive, fully human *in vitro* system will thus significantly advance preclinical research.

1.2 3D tumor tissue models

Therefore, the present study aims to establish high-output modular 3D tissue drug test systems that model tissue niches sufficiently well to enable a reliable testing of drug responses. While investigations of homophilic cell-cell-interactions, cell migration, invasion and changes of signaling pathways may also yield reasonably reliable results in 2D tumor cell culture models, interactions of tumor cells with different other cell types such as fibroblasts, hECs and immune cells are challenging to explore in such 2D systems. In this study we present modular human 3D tumor models for lung, colorectal, and breast cancer as well as leukemia. Their complexity can be adapted according to the therapeutic question. All models are based on the patented BioVaSc-TERM[®] (Biological Vascularized Scaffold – Tissue Engineering Regenerative Medicine (Jannasch et al., 2015; Linke et al., 2007; Schanz et al., 2010) (Ref, DE 30 2014 008, Int.: 1 255 634, US: 79168704)) that is derived from an intestinal porcine tissue matrix. When seeded with tumor cells, it is referred to as OncoVaSc-TERM[®]. The BioVaSc-technology and its derivatives are already being used for vascularized skin equivalents as well as for intestinal and airway models (Groeber et al., 2016; Schweinlin et al., 2017). As the decellularized and sterilized intestine of one single pig is sufficient to generate about 150 3D tumor models, the approach minimizes the use of animals for research. The extremely versatile biological matrix “Small intestinal Submucosa with mucosa” (SISmuc) is produced by removing all vessel structures and offers different tissue niches: i) on the surface of villi, ii) within former crypts, iii) within deeper layers of the collagen matrix. As a unique feature of the matrix, structures of the basement membrane are preserved after decellularization which enables a physiological anchorage-dependent growth of epithelial cells (Stratmann et al., 2014). Furthermore, this structure enables the testing of substances which are supposed to eliminate invasive tumor cells once they cross this natural border. Early steps in metastasis formation can also be studied in order to understand underlying mechanisms and to identify possible points of action. Our matrix-based lung cancer models were already shown to accurately reflect drug responses upon targeted therapies observed in the clinic – not just better than 2D, but partly also more reliably than animal models (Gottlich et al., 2018; Stratmann et al., 2014).

1.3 Applications of 3D tumor tissue models

Building on these previous findings, we now characterized our modular micro-physiological 3D tissue models using microarrays and immunohistochemical stainings for stem cell markers to analyze differences between 2D and 3D conditions in more detail. Supported by *in silico* analyses, our 3D test system offers a time-efficient possibility to test effects of drug combinations on complex tissues, to analyze effects on signaling pathways, and to identify interdependencies. As an example, we present a new combination therapy for lung cancer treatment combining metformin and gefitinib. Our 3D tissue culture test system not only validates the prediction. It also allows functional tests to identify requirements for a synergistic response. The modular approach further enables the addition of hECs to 3D tissue models. These hECs were seeded onto the former serosal side of the decellularized intestine so that toxic effects on the vasculature and the diapedesis behavior of immune cells can be addressed. To include the stromal compartment, we established different co-culture models with primary fibroblasts, and found that dynamic cell culture within flow bioreactors overcomes problems with poor stroma development *in vitro* (Nietzer et al., 2016). In the context of immune therapeutic approaches, we observed in a 3D leukemia model with artificial endothelium an enhanced efficacy of MHC I independently acting trispesific T-cell engagers compared to 2D culture. Moreover, CRC 3D models show a drastically reduced induction of tumor cell apoptosis induced by allogeneic peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in mono-cultures and also in fibroblast-enriched co-culture models. This indicates that complex 3D models with allogeneic cells offer a therapeutic window for testing antigen-independent immune-stimulatory or -inhibitory agents. These promising advantages of our modular 3D culture approach should reduce attrition-rates and save animal experiments by its more physiologic tissue features which are examined in detail in the following.

1.4 Animals

The matrices SISmuc and SISser (used for the leukemia mode with the endothelial barrier) were prepared from porcine jejunal segments of young pigs (German landrace, local supplier). The animals used for organ removal were not bred specifically for research purposes but obtained from a local supplier that is breeding animals for slaughter. SISmuc consists of small intestine submucosa (SIS) and mucosa (muc). SISser consists of SIS and serosa (ser). All explantations were in compliance with the German Animal Protection Laws (§4 Abs. 3) and all animals received humane care in compliance with the guidelines by the FELASA, WHO and FDA (WHO-TRS978 Annex3 und FDA-OCTGT Preclinical Guidance) after approval from our institutional animal protection board (registration reference number #2532-2-12, Ethics Committee of the District of Unterfranken, Würzburg, Germany). Pigs became first anesthetized and immediately euthanized prior to surgery, therefore not

suffering from any pain or distress. To keep the number of sacrificed animals small, many different organs were removed for various research projects.

2 Materials and methods

Matrix preparation

Chemical decellularization of jejunal segments was performed according to standardized protocols (Jannasch et al., 2015; Linke et al., 2007; Schanz et al., 2010): The jejunum was explanted, rinsed and chemically decellularized with a sodium deoxycholate monohydrate solution. Afterwards the vascular tree was manually removed and the whole product was sterilized (gamma sterilization).

Primary cells and cell lines

Primary cells were obtained under informed consent according to ethical approval granted by the Institutional Ethics Committee of the University Hospital Würzburg (approval number 182/10).

All cells were cultured under standard culture conditions (37 °C, 5 % CO₂). We used HROC24 and HROC87 cells (kindly provided by Dr Michael Linnebacher, university hospital Rostock) (Mullins et al., 2019) cultured in DMEM/F12 medium with GlutaMAX™ (Gibco/life technologies, USA) supplemented with 10 % FCS. HCC827, MCF7 (both purchased from DSMZ), MDA-MB-231 cells (purchased from ATCC), THP-1 (purchased from DSMZ) and SW480 (purchased from DSMZ) were cultured in RPMI 1640 medium with GlutaMAX™ (Gibco/life technologies, USA) supplemented with 10% FCS, except for HCC827 cells which were cultured with 20 % FCS. Human dermal fibroblasts were isolated from the dermis of foreskin biopsies and cultured in DMEM with GlutaMAX™ (Gibco/life technologies, USA) supplemented with 10 % FCS and 100 mM sodium pyruvate. Primary microvascular hECs were isolated from the dermis of foreskin biopsies and cultured in Vasculife Media (Lifeline Cell Technology, USA). Endothelial cell cultures were morphologically checked for containing no fibroblasts after the isolation from a skin biopsy. If fibroblasts were found in the cultures, the cells were sorted using magnetic associated cell sorting beads directed against the endothelial marker CD31 (Miltenyi, GER). Fibroblasts and hECs were cultured supplied with 1 % P/S after the isolation until the first passaging was performed. PBMC for trispecific antibody treatment (delivered from PD G. Stuhler, HLA-A2 negative, CMV positive) were frozen at -80°C and prior to use thawed overnight in RPMI with 10 % FCS and 1 % P/S. PBMC were generated from buffy coats via Ficoll gradient isolation and cultured in RPMI 1640 medium with GlutaMAX™ (Gibco/life technologies, USA) with 10 % FCS. We applied the recommended culture conditions as stated from the supplier to the respective cell lines and used the lowest quantity of FCS that is feasible for the different cell types to reduce FCS consumption. So far, the used cells did not grow with defined FCS-free media. In case of co-culture models, equal parts of cell-specific media were mixed. Cell lines were used in passages up to 20, while primary cells were only used until passage 6. Tumor cell lines were passaged 2 times a week and medium was changed every 2 to 3 days. Cells were checked for mycoplasma contaminations every 8 to 10 weeks via PCR (Minerva Biolabs, GER).

Preparation of tumor models

Single pieces of the SIS muc or SIS ser matrix were fixed between two metal rings (i.e., cell crowns) and seeded with 100,000 tumor cells on the mucosal side or with 300,000 hECs on the submucosal side. To create a tight endothelial barrier, hECs were seeded 3 to 5 days prior to seeding with tumor cells. Tumor models were placed in 12-well plates with 1 ml media in the inner compartment and 1.5 ml in the outer compartment of the cell crown. For static cell culture, the models were cultured for 11 days and afterwards treated with the test substance. During static cell culture, medium was changed every 2 to 3 days. For the dynamic culture, the models were placed in the bioreactor chambers after 3 days of static pre-culture. The customized bioreactors used (Nietzer et al., 2016) were connected to a peristaltic pump and a medium reservoir containing 45 ml cell-specific medium. The pump ensured a constant medium flow with 3-4 ml/min avoiding additional shear stress to the cells. After 14 days of dynamic culture, the models were treated for 3-5 days with the test substance. During dynamic cell culture medium was changed every 7 days. All test substances were administered via the cell culture medium.

Treatment of cells in 2D and 3D

For 2D cell culture, cells were cultured in 12-well plates. Tipifarnib (Selleck Chemicals, USA) in DMSO was applied in different concentrations to the cell culture medium for 5 days with a medium change on the third day. For 3D cell culture, hECs were seeded on the matrix SIS ser and cultured for 14 days prior to adding THP-1 cells to the medium on day 14 - with or without tipifarnib - and cultured for the next 5 days (with a complete medium change on day 17). In case of the trispecific antibodies treatment (AB1: V α CD3-scFv α HLA-A2; AB2: V α CD3-scFv α CD45; antibodies provided by PD G. Stuhler), antibody 1 or/and 2 (each 30 nM) and 200,000 PBMC as apoptosis inducers in THP-1 cells via trispecific antibodies were added to 200,000 THP-1 cells in each well of the 12-well plate (in Vasculife® medium with 1 % P/S) and incubated for 24 hours. The setting in the 3D model was the same as in the 2D model with the difference that, where indicated, the cell + DMSO/trispecific antibodies mixture was added to each cell crown onto the surface of the 3D endothelial monolayer. Treatment with 10 mM Metformin (Merck, Germany) and 1 μ M gefitinib (Absource Diagnostics, Germany) of 3D models started on day 11 for 3 days until day 14 of 3D cell culture.

Flow cytometry

Cells from the supernatant were resuspended and transferred to a reaction tube. For cell death quantification, cells were centrifuged (4 °C, 300 x g, 5 min) and washed in sterile PBS with 0.5 % BSA. Cells were resuspended in 500 μ l PBS with 0.5 % BSA and 5 μ l 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) (Biozol, GER) were added per sample. 7-AAD intercalates into the DNA and is used to distinguish apoptotic cells (7-AAD+) from viable cells (7-AAD-). After incubation in the dark on ice for 10 min,

FACS measurements were performed (FACSCalibur, BD, GER). Data analysis was performed with the software FlowJo 6.0. For the treatment with trispecific antibodies, we confirmed prior to reseeding the scaffold that the primary hECs we used for the model reacted to the anti-HLA-A2 antibody (BD Pharmingen, GER) in flow cytometry.

TUNEL Assay

To detect DNA damage in hECs, the *in situ* Cell Death Detection Kit, POD (Roche, CH) was used according to the manufacturer's instructions. Stainings were visualized using a BZ-9000 microscope (Keyence; Japan).

Apoptosis measurements using M30 ELISA

For quantification of epithelial apoptosis, the M30 CytoDeath™ (PEVIVA®, TECOmedical, GER) assay was used to measure the caspase 9-cleaved product of cytokeratin 18 in the cell culture supernatant every 24 h during treatment. This neo-epitope is specifically expressed by apoptotic epithelial cells. The M30 CytoDeath™ assay was performed according to the manufacturer's protocol. Supernatants of static cell cultures were obtained from the inside of the cell crowns. Supernatants of dynamic cell cultures were obtained via a sampling port integrated into the tubing of a flow bioreactor.

Quantification of proliferation

Ki-67 stainings were quantified as follows: at least 6 images of each sample were taken with a fluorescence microscope (BZ-9000, Keyence). DAPI was counted automatically using the software BZ Analyzer (Keyence) to get the total cell number. Ki-67-positive cells were counted manually. For each image, the number of Ki-67-positive cells in percent of total cell number was calculated and the mean of each sample was used for statistical analysis.

Statistical analysis

All pairwise comparisons were assessed using a Student's t test for unpaired samples. Results were corrected for multiple testing using Bonferroni's adjustment. P values < 0.05 were considered significant. Presentation of the flow cytometry data in the coordinate system was realized by SigmaPlot Version 10.0 (Systat Software, Inc.). M30 and Ki-67 quantifications were analyzed and presented with R¹.

Histological and immunohistochemical stainings

As an endpoint measurement, the tumor models were fixed in a 4 % PFA solution for 2 hours, embedded in paraffin and cut in a microtome at 3-5 µm. Hematoxylin and Eosin (H&E) staining (Morphisto, GER) was performed according to the manufacturer's protocol. Non-immunofluorescent immunohistochemical stainings were performed using the 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) system (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, GER) according to the manufacturer's protocol. Here, DAB is oxidized in the presence of a Horseradish-peroxidase and hydrogen peroxide resulting in the formation of a brown dye at areas of antibody binding.

The following primary antibodies were used: rabbit anti-CD44 (Abcam, Cat# ab51037, RRID: AB_868936), mouse anti-CD133 (R&D systems, Cat# MAB 4399 RRID: AB_2100194), mouse anti-CD166 (Abcam, Cat# ab49496, RRID: AB_868825), mouse anti-EpCAM (Abcam, Cat# ab8601, RRID: AB_306663). For immunofluorescent stainings primary antibodies were used against Col IV (Abcam Cat# ab6586, RRID: AB_305584), vimentin (Abcam Cat# ab92547, RRID: AB_10562134), Ki-67 (Abcam Cat# ab16667, RRID: AB_302459), CD45 (Dako Cat# M0701, RRID: AB_2314143) and pan-cytokeratin (Sigma-Aldrich Cat# C2562, RRID: AB_476839, this antibody was the only one derived from ascites fluid). Primary antibodies were diluted 1:100 in antibody diluent (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Germany) and incubated over night at 4 °C. As secondary antibodies donkey anti-mouse IgG (Thermo Fisher Scientific Cat# A-31571, RRID: AB_162542) conjugated to Alexa-647 or donkey anti-rabbit IgG (Thermo Fisher Scientific Cat# A-31572, RRID: AB_162543) conjugated to Alexa-555 were diluted 1:400 in antibody diluent and incubated for 1 hour at room temperature (RT). Cell nuclei were counterstained using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), which binds to the DNA. DAPI was diluted in the embedding medium Fluoromount-G (ThermoFisher Scientific, USA). Images were taken using a digital microscope (BZ-9000, Keyence, Japan).

Ultrastructural analysis

Samples were washed with pre-warmed PBS + calcium and magnesium and cell-free edges were removed with a scalpel prior to fixation in a 6.25 % or 2.5 % solution of glutaraldehyde overnight at 4 °C. Further sample preparation was performed at the Imaging Core Facility, Biocenter, University of Würzburg. For ultrastructural analysis of the unseeded scaffold as well as the 3D tumor models, scanning (SEM) electron microscopy images were also taken at the Imaging Core Facility, Biocenter, University of Würzburg. To analyze changes in scaffold structure after cell culture, the tumor models were decellularized after 14 days of cell culture. To this aim, the samples were incubated twice in sodium deoxycholate (1 hour at RT), washed twice in PBS- for 10 min, incubated in DNase I solution for 2 hours at 37 °C and rinsed PBS- prior to fixation.

Microarray data

For RNA isolation with the RNeasy Micro Kit (Qiagen, D) from cells in 3D experiments, frozen SISmuc stored at -80 °C was used. Isolation was carried out according to the manufacturer's protocol. While still frozen, tissue was cut into small pieces with a scalpel and transferred into 350 µl Buffer RLT in a 2 ml reaction tube. Heat-sterilized steel beads were added to the tubes and the tissue was lysed at 50 Hz for 5 min with a Tissue Lyser device. Samples were centrifuged at full speed for 3 min and supernatants were transferred to a new 1.5 ml tube. One volume of RNase free 70 % ethanol was added and samples were mixed by pipetting. Following transfer, complete contents were centrifuged in RNeasy MinElute spin columns for 15 s at 8,000 x g. Further steps were carried out according to the manufacturer's protocol. Isolation of RNA from cells from 2D experiments

¹ <https://cran.r-project.org/>

was done according to the RNeasy Mini Kit protocol. RNA concentrations were determined by absorbance measurements at 260 and 280 nm using the NanoQuant Plate for the Infinite M200 plate reader (Tecan, CH). Quality control of RNA samples using the Agilent 2100 Bioanalyzer and related reagents as well as all microarray experiments and data analysis were performed by Claus-Jürgen Scholz and colleagues from the Core Unit Systems Medicine at the Interdisciplinary Centre for Clinical Research (IZKF), University of Würzburg. In brief, 100 ng of RNA was first reverse-transcribed to cDNA, before cDNA was re-transcribed into labeled cRNA using Affymetrix IVT Plus Kit. Subsequently 130 µl hybridization mix prepared from labeled cRNA fragments was hybridized for 16 hours at 45 °C and 60 rpm to GeneChip PrimeView arrays. Microarrays were washed and stained in the Affymetrix Fluidics Station 450. Microarrays were scanned using a GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix, USA). The data were deposited with GEO database, the accession number is GSE79078.

Bioinformatics and in silico modeling

Module 3D tissue simulations: Signaling network reconstruction was based on available literature and on biochemical and human interactome database sources such as KEGG and IMEx. To model individual drug actions as well as effects of combinations, dynamic simulations of cellular pathways also considered known impacts of different drugs. For data-driven modeling, signaling network reconstruction was combined with dynamic simulations of cellular pathways: First, the network topology was created and edited in CellDesigner (version 3.5.1) (Matsuoka et al., 2014) and exported as xml-file. Importantly, the Boolean logic of the network was considered, i.e. activating and inhibitory interactions between receptors, proteins and protein cascades. Modifying crosstalk was also implemented. Next, dynamic simulations were conducted applying the SQUAD tool (Di Cara et al., 2007). SQUAD reads the topology of the network using the xml file generated from CellDesigner. The ON- and OFF-states of the network were also considered for dynamic modeling. SQUAD automatically interpolates between the different network states using exponential functions. To model signal propagation in the network, SQUAD further considers the Boolean network topology, concatenating the exponential functions accordingly. The trajectories of full or partial activation down to no inhibition were calculated for the whole network and for all included proteins. Different mutational profiles and treatment were integrated into the dynamic simulation via the SQUAD perturbation function. Protocols were saved in prt file format. Outcomes were assessed by readouts proliferation and apoptosis as basic markers and considering all available data (in particular phosphorylation status of involved proteins and protein cascades).

Module omics data analysis: Data from microarray experiments was preprocessed in the R v3.2.1 environment with Bioconductor packages *affy* and *vsr*; VSN normalization and RMA probeset summary were performed with the *vsrma* command using default parameter settings. Fold change values of treated (test dataset) vs. untreated (reference dataset) were calculated and log₂-transformed for 2D and 3D samples individually. Cut-off values for significance were set to ±1.0 log₂ fold change. Gene transcripts that showed differential expression upon treatment in HCC827 but not in A549 cells were selected for further analysis. Differentially expressed genes that showed up- or downregulation in HCC827 in 3D but not in 2D in response to gefitinib were clustered into gene lists, respectively. The functional enrichment analysis using the DEGS was performed using *g:Profiler* web tool (Raudvere et al., 2019) and relevant enriched terms (adj. p value < 0.05) shown as table and plotted using *ggplot2* package version 3.3.2 (Wickham, 2009) in R version 4.0.2 (according to (Fuchs et al., 2020)).

3 Results

3.1 Generation of micro-physiological human tumor models on a porcine tissue matrix

In order to generate human tumor models representing the *in vivo* situation more closely than 2D cell cultures or simple spheroids, we use pieces of the porcine intestinal jejunum deriving from the BioVaSc-TERM[®]. These comprise an intestinal loop (Fig. 1 A) with an arterial entrance (red arrow), a venous outward flow (blue arrow) and enable reseeding of the whole vascular tree with hECs. For the 3D tumor tissue models only the former gut wall without the vessel system is used after decellularization. The porcine matrix consists of three different main layers (Fig. 1 B): (i) the mucosa, (ii) the small intestinal submucosa (SIS) and (iii) the serosa. Subsequently, two different tissue matrices can be derived: the SIS_{SMUC} is composed of the former SIS and the mucosa, while the SIS_{SER} contains the former SIS and the serosa. As a unique feature, structures of the basement membrane are preserved on top of the mucosa after the chemical decellularization process. Both matrices can be fixed between two rings called “cell crowns” resulting in inserts for 12-well plates similar to a transwell system (Fig. 1 C, D, E). They can also be fixed in flow bioreactors for dynamic cell culture (Fig. 1 E). Different designs of cell crowns are possible: either it can be used upside down for two-sided cell culture (white cell crown in Fig. 1 C) or upright for one-sided cell culture (brown cell crown in Fig. 1 C). Dynamic culture in bioreactors enhances cell growth on the matrix (blue in Fig. 1 F) compared to static cell culture (Fig. 1 F). Cells grown in static cell culture reach a state similar to tissue-homeostasis after about 11 days of culture. In the absence of major changes in proliferation and apoptosis, cells can then be used for drug tests over a period of approximately 7 days (Fig. S1²). While dynamic models in bioreactors have a lower through-put, they display a better nutrient supply and waste disposal via the medium flow, thus mimicking *in vivo* conditions more closely. As dynamic culture improves cell growth and maintenance, the duration of drug application can be extended for up to several weeks.

3.2 The tissue matrix

After the decellularization process as described before (Jannasch et al., 2015; Linke et al., 2007; Schanz et al., 2010), the main part of the SIS_{SMUC} matrix is composed of collagen fibers covered with the structurally preserved basal lamina on the mucosal side of the matrix (Fig. 2 A). The villi structures are still intact (Fig. 2 B). Within the basal membrane pores ranging from 1 to 2 µm are visible (Fig. 2 C). These pores in the basement membrane have a sharp border and overall rounded shape suggesting that they are naturally occurring pores rather than damages deriving from the decellularization process. In contrast, the former

² doi:10.14573/altex.2008141s1

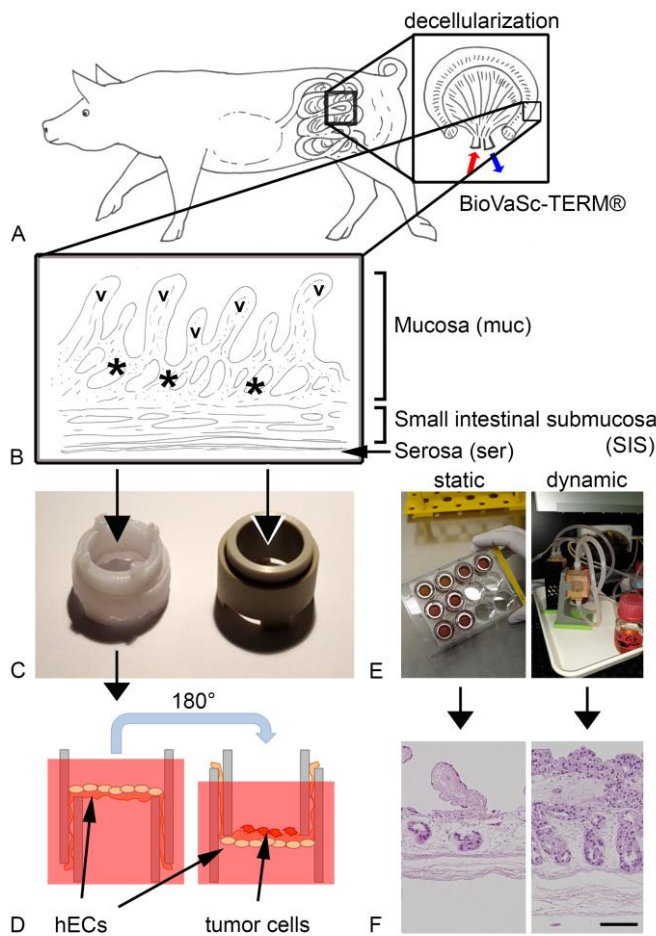


Fig. 1: Generation of 3D tumor models by seeding a decellularized porcine jejunum with tumor cells

A: The collagen-rich matrix derives from porcine jejunum as a *biological vascularized scaffold for tissue engineering and regenerative medicine* (BioVaSc-TERM®). B: The wall of the former gut consists of extracellular matrix (ECM) components and maintains the tissue architecture of the intestine with villi (v) and crypt structures (*). Different layers are preserved: mucosa, small intestinal submucosa and serosa. Two different matrices can be prepared: (i) the SISmuc consists of the former small intestinal submucosa (SIS) and the mucosa (muc), while (ii) the SISser consists of the former SIS and the serosa (ser). C: The matrix is fixed within two rings (termed "cell crowns") designed for the seeding with cells either on both sides of the matrix (right, white crown in C) or for the seeding with cells only on one side of the matrix (left, in brown). D: Different cell types like human endothelial cells (hECs) and tumor cells can be seeded on the matrix. E: Generated matrix-inserts can be placed in 12-well plates similar to transwells or in custom-made bioreactors for dynamic culture. F: Cells (blue in the H&E staining) can be seeded on the surface of the collagen matrix and cell growth is enhanced in bioreactor cultures. Scale bar in F (bottom right): 100 μm .

serosal side of the matrix shows no intact basement membrane structure: Only single collagen fibers can clearly be observed at higher magnification (Fig. 2 D, E).

3.3 Differentiation between invasive and non-invasive tumor cells

The invasive behavior of cells can be classified by investigating cell growth morphology when seeded on the surface of the SISmuc. Different stages of cancer cell invasion can be mimicked depending on culture condition and cell line. MCF7 breast cancer cells grow clearly on top of the matrix and inside the former crypt structures under static (Fig. 3 A) and dynamic culture conditions (Fig. 3 C). In contrast, MDA-MB-231 breast cancer cells invade into the whole matrix under static (Fig. 3 B) and dynamic culture conditions (Fig. 3 D) as shown before (Wallstabe et al., 2019). Immunohistochemical stainings of pan-cytokeratin (PCK, green in Fig. 3 E and F) and vimentin (Vim, red in Fig. 3 E and F) reveal their different *epithelial-to-mesenchymal-transition* (EMT) status. Dynamic conditions promote the invasive character of MDA-MB-231 cells leading to an increased tumor cell mass within the mucosal part of the SISmuc (Fig. 3 D) as well as increased Vim expression (red in Fig. 3 F), whereas non-invasive MCF7 cells only show strong PCK expression (green in Fig. 3 E).

3.4 Enhanced tumor stem cell marker expression under 3D conditions

Cancer stem cells are discussed to present the important subpopulation which should efficiently be targeted for long-term therapeutic success. For CRC model generation, we used two early passage cell lines recently isolated from patients with different tumor stages (HROC24: low grade, HROC87: high grade). HROC24 cells grow mostly as monolayers on top of the matrix and within crypt structures, whereas more malignant HROC87 form aggregates on top and in former crypt structures of the intestinal matrix. In order to compare stem cell characteristics between 2D and 3D culture conditions, we investigated the expression of the tumor stem cell markers CD44, CD133, CD166 and EpCAM (Willis et al., 2008). In both cell lines, expression of all stem cell markers is only found in 3D conditions, whereas in 2D conditions CD44 and CD166 cannot be detected in either cell line (Fig. 4).

3.5 Differences in gene expression upon targeted therapy under 2D conditions and in 3D tissue models

In previous studies we have shown an improved correlation of drug responses to clinical observations in 3D lung cancer models based on the tissue matrix technology (Gottlich et al., 2018; Stratmann et al., 2014). In order to reveal involved pathways and biological functions, we now performed microarray-based gene expression analyses of the two lung cancer cell lines A549 and HCC827 in 2D and 3D and compared the respective differences. To adjust for qualitative difference in RNA isolated from either 2D or 3D culture, and to focus on genes relevant for drug response, we compared the ratios of treated to untreated samples

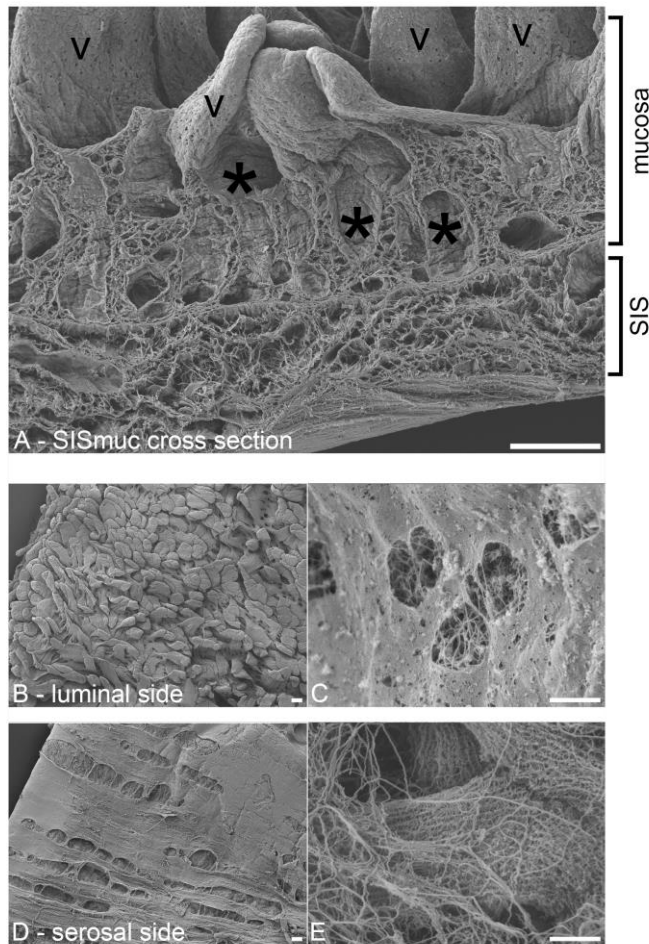


Fig. 2: The mucosal, but not the serosal side of SIS mucin-matrix shows a complete preserved basal lamina structure after the decellularization process

A: Ultrastructural raster electron microscopy analysis of the SIS mucin matrix illustrates villi (v) and crypt structures (*), mucosa and small intestinal submucosa (SIS) in a cross section, B: top view with low magnification on former mucosa with preserved villi structures covered with a layer of basement membrane (BM), in higher magnification in C displaying the presence of small holes with collagen fibers lying underneath. D: the serosal side of the submucosa consists primarily of fibrillar collagen fibers seen in higher magnification in E. scale bars in A, B, D: 100 μ m, scale bars in C, E: 1 μ m, representative images of n=1 experiment.

cultured either under 2D or 3D culture conditions for treatment with gefitinib – an EGFR tyrosine kinase inhibitor (TKI). As HCC827 cells harbor an activating mutation in the *EGFR* gene, while A549 cells do not, only HCC827 are expected to respond to this drug. Gene transcripts with differential expression upon gefitinib treatment in HCC827 but not in A549 cells were selected for further gene ontology (GO) analysis (Table 1; pathway enrichment with bubble-plots for pathways upregulated in 3D compared to 2D in Fig. S3² and downregulated pathways in Fig. S4²).

Gene lists that showed down- and upregulation in 3D models compared to 2D conditions were subjected to an enrichment analysis. A high number of downregulated genes in 3D culture suggests more stringent cell cycle control (cell division, cell cycle checkpoint, G1/S phase transition, cell proliferation), less cancer-like metabolic processes (less pronounced expression of pathways such as canonical glycolysis, pyruvate metabolism, and ADP metabolism which are all linked to the Warburg effect) and downregulation of DNA replication (replication initiation, strand elongation, mitotic spindle organization, chromosome condensation). These highly significant observations go in line with the previously mentioned reduced cell proliferation under 3D conditions. Upregulated genes are, in contrast, linked to positive regulation of apoptotic processes, to the ECM (epithelium development, ECM organization, tissue morphogenesis), to cell differentiation, migration and signal transduction. An increase of transcripts related to inhibition of cell proliferation was observed. All differentially expressed genes with fold-change-values are listed in the supplement (Tab. S1³, raw data, and Table S2⁴, GO-term analysis results).

3.6 Simulation module: *in silico* synergistic effect of gefitinib and metformin validated including mutation constellation in 3D tissue lung cancer models

To demonstrate the potential of our 3D model to support exploratory pre-clinical research, bioinformatical simulations were used to discover new targets and promising treatment combinations for CRC and NSCLC (Baur et al., 2019; Gottlich et al., 2018). Gottlich et al.'s work (2018) pointed towards 5' AMP-activated protein kinase (AMPK) activation as a potential treatment strategy for lung cancer (Gottlich et al., 2018). As metformin acts (among other effects) also as an AMPK activator, we tested the combination of gefitinib and metformin on HCC827 cells. In line with our bioinformatics prediction, we observed a significant increased effect on apoptosis induction for the combination (Fig. 5 A). In contrast, proliferation is only affected by gefitinib, but not by metformin, and no enhanced effect on the inhibition of proliferation could be measured for the combination (Fig. 5 B). These data were integrated into a signaling network topology of HCC827 cells (Fig. 5 C). We then simulated (Fig. 5 D) the dynamics of the signaling network. All proteins and their activity changes over time and effector nodes

³ doi:10.14573/altex.2008141s2

⁴ doi:10.14573/altex.2008141s3

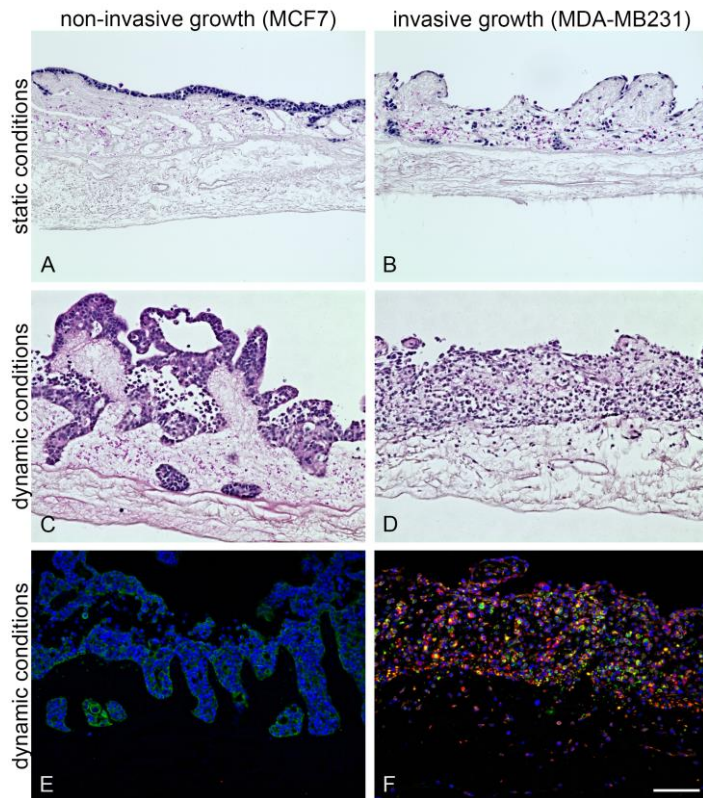


Fig. 3: Breast cancer cell lines invade the matrix differently. A and B: While MCF7 cells (A) grow on top of the scaffold and in some former crypts, MDA-MB-231 cells (B) invade the whole collagen structure when cultured in a static 3D cell culture in cell crowns. C and D: This effect becomes more pronounced in dynamic cell culture in bioreactors. A-D: HE-staining of paraffin sections. E and F: Immunohistochemical stainings of pan-cytokeratin (green) and vimentin (red) on paraffin sections reveal the epithelial character of the MCF7 cells (E) and the more mesenchymal character of MDA-MB-231 cells (F). Nuclei are stained with DAPI (blue) in E and F. Scale bar in F: 100 μm (same scale for A to F), representative images of $n=3$.

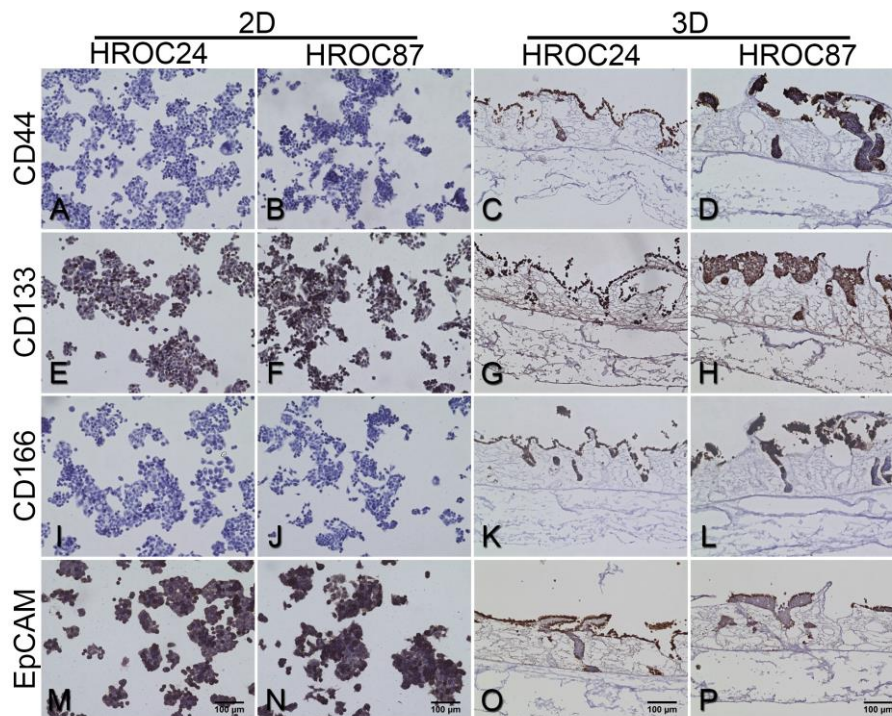


Fig. 4: 3D cell culture of colorectal cancer (CRC) cells on the SIS muc-matrix increases the expression of cancer stem cell (CSC) markers. Glass slides from 2D and paraffin-embedded section from 3D cultures were immunohistochemically stained for the stem cell markers CD44 (A to D), CD133 (E to H), CD166 (I to L) and EpCAM (M to P). While the CRC cell lines HROC24 and HROC87 are negative for CD44 (A, B) and CD166 (I, J) under conventional 2D conditions, both cell lines express these markers when cultured on SIS muc (C, D, K, L). Scale bars given in M to P: 100 μm (same scale for A to P), representative images of $n=3$.

for key cellular responses are calculated in this simulation. The change over time for key cellular responses (proliferation, apoptosis) and central proteins (p53, mTOR, AMPK etc.) are shown in Fig. 5D. This allows to estimate cellular responses, for instance enhanced induction of the node "apoptosis" by the combination therapy compared to gefitinib monotherapy, whereas proliferation shows a similar profile in both treatment scenarios (Fig. 5 D). Thus, comparing the pharmacological effects in our *in vitro* 3D cell culture model (Fig. 5 A, B) with the *in silico* prediction shows concordant results. The combination of *in vitro* and *in silico* modeling allows to accurately relate the tumor mutation constellation with the most appropriate drug combination. Moreover, as the modular *in vitro* test system as well as the *in silico* simulation module are generic, the approach can also be used for testing many other defined drug targets, drugs or drug combinations beyond the example shown in this manuscript.

Tab. 1: Functional overrepresentation analysis of genes showing significant deregulation upon treatment with gefitinib in HCC827 cells not shared with A549 cells^a

	No. of genes changed	Adj. p-value
Downregulated in 3D but not in 2D		
<i>Cell cycle</i>		
Cell division	44	1.46·10 ⁻⁸
Cell cycle checkpoint	15	2.64·10 ⁻⁷
Regulation of cell cycle	33	6.33·10 ⁻⁷
G1/S phase transition	11	2.46·10 ⁻⁵
<i>Metabolic process</i>		
Canonical glycolysis	8	3.75·10 ⁻⁸
ADP metabolic process	14	1.78·10 ⁻⁹
Pyruvate metabolic process	15	1.81·10 ⁻⁹
<i>DNA replication</i>		
Mitotic spindle organization	9	3.33·10 ⁻⁴
Chromosome condensation	6	2.29·10 ⁻³
Upregulated in 3D but not in 2D		
<i>Regulation of apoptosis</i>		
Positive regulation of apoptotic process	9	2.22·10 ⁻³
<i>Cell proliferation</i>		
Negative regulation of cell proliferation	9	5.72·10 ⁻³

^a The table shows selected biological processes and pathways that are deregulated in 3D but not in 2D. Proliferative processes and associated metabolism are down-regulated under 3D conditions. The number of deregulated genes that are involved in each process is shown. Adjusted (multiple testing corrected) p-values are given on the right. Analyses are based on the microarray data from 1 experiment in each condition (n=1).

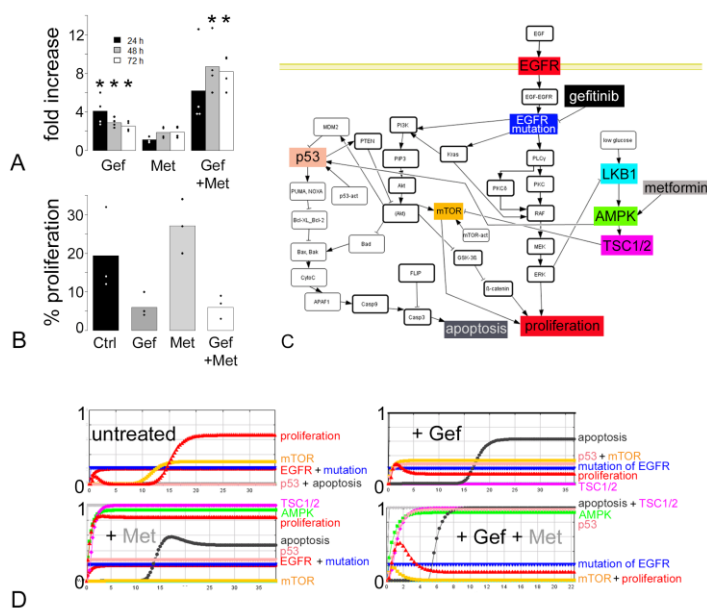


Fig. 5: Enhanced effects of gefitinib (Gef) and metformin (Met) are predicted and validated by a combined *in silico* and *in vitro* model. A (*in vitro*): Gefitinib (Gef) and metformin (Met) improves induction of apoptosis in HCC827 cells cultured in 3D. M30 ELISA measurements were performed after 24 hours (black bars), 48 hours (grey bars) and 72 hours (white bars) incubation with either single drugs or the combination (n=4). B: Gefitinib alone (Gef) decreases proliferation in HCC827 cells (% of Ki-67-positive cells of total cell numbers) as well as the combination with metformin (Gef + Met) compared to the untreated control (Ctrl) (clear trend, n = 3). C: An *in silico* topology of HCC827 cells which harbor an activating mutation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) (blue node "mutation of EGFR") was computed in order to simulate treatment responses *in silico*. D: Simulations by the software SQUAD mirror the response of HCC827 cells to different treatments and reflect *in vitro* results. * in A: p < 0.05, Student's t-test. Bars in A and B: mean values, Dots in A and B: values of single experiments (n=2 for A (2 technical replicates/experiment) and n=3 (1 technical replicate/experiment) for B).

3.7 Modular refinement of the 3D tissue models by adding different cell types of the tumor microenvironment

Further cellular components such as the tumor stroma impact drug responses. Given the strong immunosuppressive effects exerted by the tumor stroma, a targeting of tumor-stroma interactions is of considerable interest. We thus generated models including cell types from the tumor microenvironment such as hECs, immune cells, and fibroblasts. This enables the analysis of new substances and immune therapies. Toxic side effects on non-cancerous cells can also be investigated.

In order to test recently published trispecific hemibodies which target CD45 positive tumor cells in HLA-A2 positive leukemia patients, we seeded HLA-A2 positive hECs on the serosal side of our biological matrix and co-cultured this artificial endothelium with the human HLA-A2 and CD45 dual-positive leukemia cell line THP-1 (Bersi, 2017). In order to proof efficacy and specificity of these hemibodies as an antigen-specific immunotherapeutic approach (Banaszek et al., 2019) in a tissue-like context, we analyzed the induction of apoptosis in THP-1 cells by flow cytometry and compared results from 3D to conventional 2D cell culture. In addition, we compared the efficacy to the treatment with the clinically investigated farnesyltransferase inhibitor tipifarnib (Stieglitz et al., 2015). Hemibodies can only recruit T cells towards dual-positive CD45 and HLA-A2 positive leukemic cells when both antibody parts (AB1 and AB2) bind their respective targets in close proximity. They then assemble to form a functional antibody that also binds to CD3 on T-cells. After addition of HLA-A2 negative PBMCs as effector cells, tumor cell lysis was induced (Fig.6 E and F). Importantly, after 5 days of tipifarnib treatment we observed the induction of apoptosis in a dose-dependent manner in THP-1 cells in the 3D model and a severe damage of the endothelial monolayer confirmed by CD31 staining (Fig. 6 D) which - in contrast - was not affected by trispecific hemibody treatment

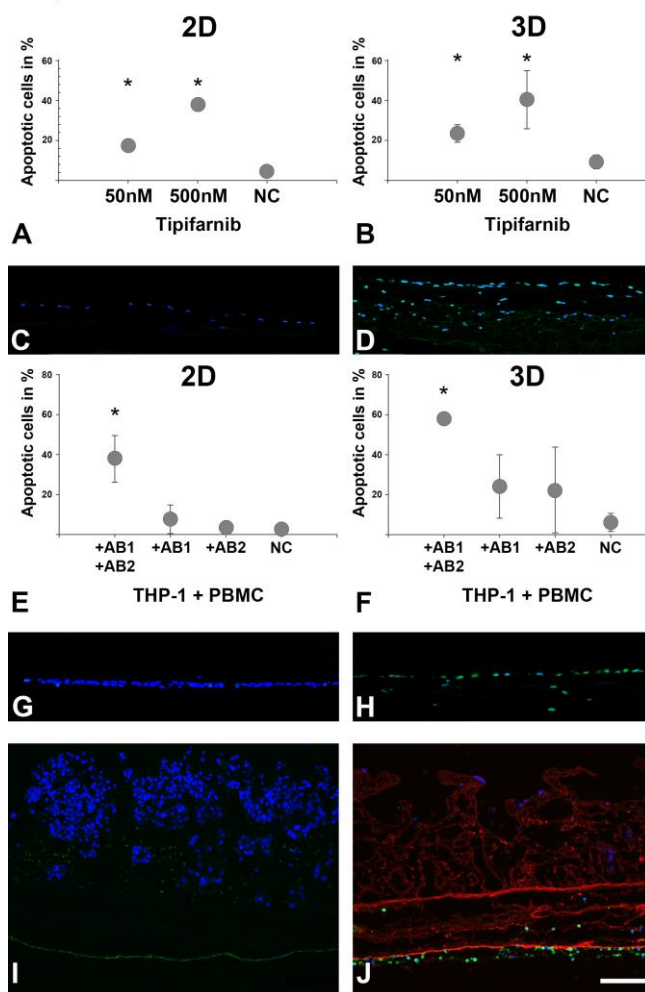


Fig. 6: Endothelial cells grown on the serosal side of the matrix allow drug efficacy and toxicity testing on THP-1 leukemia cells as well as diapedesis studies with primary immune cells. A, B: In flow cytometry analysis of THP-1 cells, the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib shows similar induction of apoptosis in conventional 2D cell culture (A) as in the 3D model (B). C: Untreated DAPI-stained endothelial cells show no DNA damage by TUNEL assay. D: tipifarnib-treated (500 nM) cells show a destroyed endothelial layer structure and apoptotic cells (green). E: In 2D cell culture, the 2 hemibodies - denoted as antibody (AB) 1 and 2 - reveal a similar induction of apoptosis in THP-1 cells compared to a treatment with 500 nM tipifarnib when given together (A). F: increased apoptosis can be seen in the 3D model with no evident damage of the endothelium as demonstrated by TUNEL assay (G). H: Technical positive control of the TUNEL assay (n = 3, unpaired t-test, Bonferroni corrected). I: hECs seeded on the former serosal side forming an endothelial layer on the SISmuc. On the mucosal side the breast cancer cells MCF7 were added. hECs are shown in green in I by a CD31 immunohistochemical staining. J: A co-culture of hECs with immune cells enables the investigation of immune cell diapedesis as shown in green by a CD45 immunohistochemical staining. Red in J: Collagen IV is stained as a marker of basal membrane structures within the matrix. Scale bar in I: 100 μ m. *: $p < 0.05$ in comparison to negative control (NC). All PBMCs used for the experiments derived from the same donor: n=4 for 2D and n=3 for 3D.

(Fig. 6 H). Furthermore, the hemibody treatment yielded a higher efficacy in the 3D model (60 % apoptotic THP-1 cells after only 24 hours of treatment compared to 40 % apoptotic THP-1 cells in 2D) as shown in Fig. 6 E and F.

Moreover, the endothelium can be investigated as barrier for immune cells about to enter the tumor, which is an important issue in immune therapies (Galon et al., 2006). While the endothelial monolayer is shown in green by CD31 staining, tumor cells are stained only with DAPI (Fig. 6 I). With the help of flow bioreactors, the diapedesis of immune cells, in this case PBMCs (shown in green) was investigated under dynamic medium flow conditions (Fig. 6 J).

Finally, by adding human dermal fibroblasts to different tumor cell lines cultured in our 3D models, we observed different effects on tissue morphology. HCC827 lung tumor cells and A549 cells (Fig. 7 A, B in green) showed largely unaltered cell growth patterns compared to mono-cultured tumor cells. The added fibroblasts simply migrated to deeper matrix areas while the tumor cells stayed on top of the matrix (Fig. 7 C, D in red). Astonishingly, in co-culture with colorectal SW480 cancer cells, non-cancerous fibroblasts induced tumor cell invasion into deeper matrix layers which was accompanied by formation of tumor cell aggregates and by a partial destruction of former crypt structures indicating the generation of a desmoplastic reaction (Fig. 7 E, F). To explore whether this model can be applied for testing of immunotherapies, we added immune cells (PBMCs) and measured the induction of apoptosis in mono- and co-cultures with the allogenic immune cell populations. Under 3D culture conditions the PBMC-mediated apoptosis in SW480 mono-cultures was reduced in all samples compared to 2D cultures (Fig. 7 G) where variation was very high compared to 3D data. The same effects could be seen in SW480 co-cultures with fibroblasts (Fig. S2).

4 Discussion

We report here a modular 3D tissue culture system to generate improved human tumor models with an *in vivo*-like micro-physiology. To this aim, we use a decellularized tissue matrix from porcine gut termed “SISmuc” in which the mucosa (muc) on top of the small intestinal submucosa (SIS) is preserved. In addition, we used for a leukemia tissue model the matrix “SISser” in which the SIS and the serosa (ser) is preserved.

Mina Bissell and others have stressed the huge importance of the microenvironment for physiological cell growth: isolated cells lose their functionality as cues from the microenvironment critically determine the cell fate (Bissell et al., 2003; Bissell, 1981). Advances in 3D technologies, particularly organoids, provide new options in the field of more physiological and personalized models for drug testing and cancer research (Drost and Clevers, 2018; Simian and Bissell, 2017).

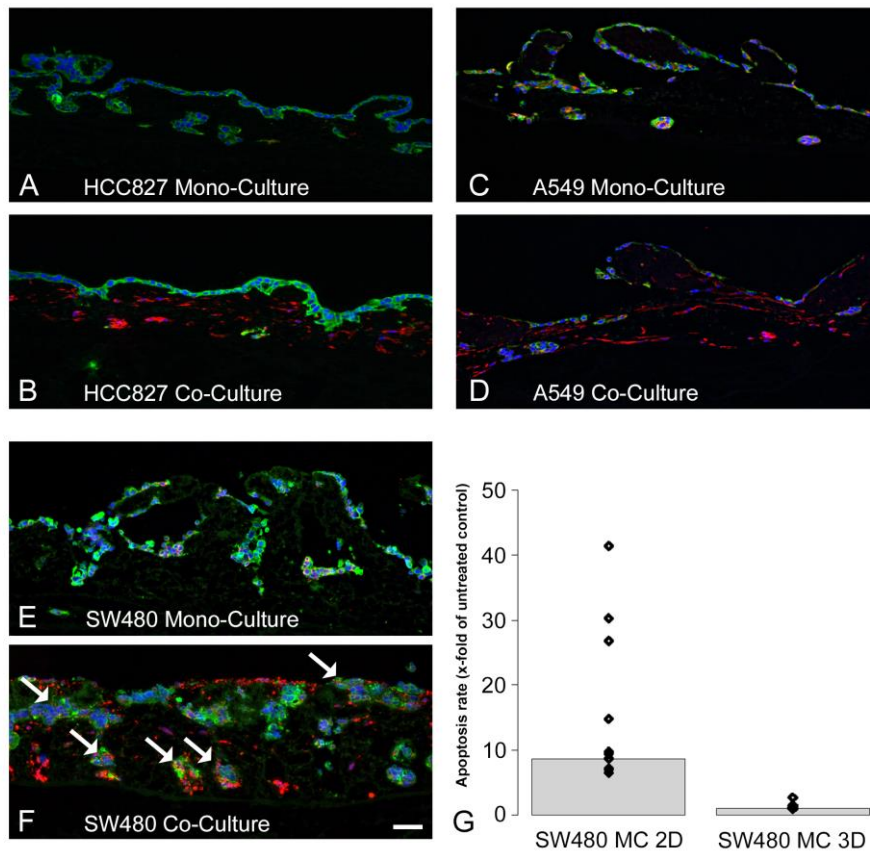


Fig. 7: The effect of cancer-associated fibroblasts (CAFs) on tumor cell morphology depends on tumor cell type. Compared to 2D culture, 3D conditions reduce allogenic tumor cell killing by immune cells

A and B: In HCC827 lung tumor cells (green in A and B) which show a well-differentiated cellular morphology, co-culture (B) with dermal fibroblasts (red in B) has no morphological effect on the growth pattern of these tumor cells. C and D: Also in A549 cells (green in C and D), the co-culture with dermal fibroblasts (red in D) does not influence the growth pattern in 3D cell culture. E and F: In contrast, when highly malignant colorectal SW480 tumor cells (green in E and F) are co-cultured with dermal fibroblasts (red in F), the formation of tumor clusters (white arrows in F) that overgrow former crypt structures is observed (n = 3). G: When allogenic PBMCs are added to SW480 tumor cells, allogenic (and thus largely antigen-independent) tumor cell killing was assessed in order to evaluate the potential usefulness of the models as test systems for MHC1-dependent immune-mediated tumor cell killing. In 2D (n = 6), the apoptosis induction is much higher (with a higher variation) than in 3D (n = 6) in mono- as well as in co-culture with fibroblasts (see Fig. S2²). A to F: immunohistochemical staining of PCK (green) and vimentin (Vim). Nuclei are counterstained with DAPI (blue). Scale bar in F: 50 μ m for A to F. All PBMCs derived from the same donor: n=2 (5 technical replicates/experiment) for 2D and n=3 for 3D.

Nevertheless, organoids have significant disadvantages like their inside-out topology that hinders practical analyses, the very expensive culture conditions due to the need of Matrigel® and growth factors, and high donor variation⁵. Moreover, during organoid formation dedifferentiation processes are inevitable. Stroma components are often not implemented into the organoids (Baker et al., 2016; Fan et al., 2019) or even get lost (Kim et al., 2019). Immune components can, in contrast, easily be added from peripheral blood (Dijkstra et al., 2018). Animal models as patient derived xenograft (PDX) present other challenges: Apart from ethical concerns they are time-consuming and generally show a huge variability, which calls for high numbers of animals to achieve statistically meaningful results. While these practical limitations may be overcome, other problems caused by the species barrier are intrinsic to these models. For example, host factors from mice or rats in some cases fail to activate their corresponding receptors on human cells as we have, next to others, demonstrated before (Baur et al., 2019; Francone et al., 2007; Jeffers et al., 1996; Anselmi et al., 2020; Rongvaux et al., 2014).

Decellularized matrices provide complex cues that enhance cell growth, differentiation (Berger et al., 2020) and - as shown here - also stemness potential. The main advantage of our 3D tissue model system compared to organoids is its modular and standardizable set-up with a distinct orientation in a transwell culture plate. Thereby transmigration of tumor and immune cells across the preserved basement membrane or the added endothelial barrier can be easily evaluated, as the monolayer integrity is visualized by CD31 staining.

To generate *in vitro* models close to the *in vivo* situation suitable for standardization and large-scale production, we use one single pig for the generation of about 150 tumor models out of one single intestine and generate tumor models based on a standardized operating protocol (Gottlich et al., 2016). We utilize the jejunum as in this part one intestinal loop is supplied

⁵ Lang, S. (2019). What are the pros and cons of using organoids? <https://www.drugtargetreview.com/article/48244/what-are-the-pros-and-cons-of-using-organoids/> (accessed December 8, 2020).

with blood via one artery and one vein. This enables the complete cell removal by thoroughly flushing the vessels with detergent as published before (Jannasch et al., 2015; Linke et al., 2007; Schanz et al., 2010). All investigated cell lines showed a stable proliferation-index as well as apoptosis levels between day 11 and about day 18 of a static 3D cell culture, which enables one week of drug testing in a kind of tissue homeostasis. The proliferation-index is generally reduced in 3D models in comparison to 2D models, which is more representative of *in vivo* conditions. In investigated cell lines we find different indices by counting the percentage of Ki-67 positive cells as done in the clinic. Most cell lines range between 20 and 40 percent that reflects observations from the clinic (Warth et al., 2014; Inwald et al., 2013). Thus, these models should reduce the risk for false-positive results in cytostatic drug testing (Cree et al., 2010).

Further aspects of the models should improve predictivity and mode-of-action analysis: (i) The 3D tissue architecture, its composition of ECM components, and the structure of the basement membrane and bioreactors lead to a more physiological growth of carcinoma cells according to their invasive traits, gene expression/pathway activity (apoptosis, proliferation) and stem cell markers. (ii) Semi-quantitative *in silico* simulations based on these gene expression data allow focused predictions of drug, targets and drug combinations. (iii) Addition of cells from the tumor microenvironment enables testing of antigen-specific and MHC-I-independent immune therapy and toxicity, transmigration studies across the endothelium, including assessment of the impact of activated fibroblasts on invasion. Moreover, allogenic immune reactions are reduced in 3D tumor models.

For model generation, tumor cells are seeded on the luminal side - the mucosal side - of the decellularized intestine. Similar to epithelia-derived carcinomas they are thus physiologically anchored to the basement membrane. We could show by ultrastructural analysis that only on the mucosal, but not on the serosal side, structures of the basement membrane are preserved as a closed layer showing small supposedly natural holes on the bottom of the former crypts. These holes are too small for undirected cell migration through them and were proposed to have functions in immune cell trafficking (McCluggage and Low, 1984; Takahashi-Iwanaga et al., 1999; Takeuchi and Gonda, 2004). Holes in the basement membrane are also reported in the human bronchus after decellularization (Howat et al., 2002). In our experiments we observed that the basement membrane represents a strong barrier for tumor cell growth in all investigated cancer entities when the tumor cells are non-invasive. Interestingly, the breast cancer cell line MDA-MB-231 which was formerly described to be highly invasive (Neve et al., 2006) overcomes this barrier and scatters over the whole mucosa in form of single cells as reported before (Wallstabe et al., 2019). In line with hypotheses on EMT and invasion (Zhang and Weinberg, 2018) these MDA-MB-231 cells show a more mesenchymal marker expression indicating a higher EMT status than the non-invasively growing MCF7 breast cancer cells as shown here for the first time on our matrix in a 3D tumor model.

4.1 Exploiting the modular micro-physiological 3D tissue models testing immune therapies, fibroblasts and immune cells

Different cell types can also be used to study primary stromal components of tumors. As hECs do not only contribute to the tumor stroma by building a physical barrier but also by secreting soluble signaling molecules, they play an important role when it comes to drug responses in tumor cells (Gubbiotti et al., 2020; Meurette and Mehlen, 2018). Endothelial cells can be seeded on the basolateral side of the matrix to investigate diapedesis of immune cells. For this purpose, specific cell crowns were developed to enable a 3-day upside-down pre-incubation with hECs. These cell crowns can also be manufactured by 3D printing. Even though no closed basement membrane structure is preserved on this serosal side of the matrix, hECs line up to form a closed endothelium-like structure. To explore further applications of our model, we also generated a leukemia model in which the acute myeloid leukemia (AML) cell line THP-1 was co-cultured with hECs. As depicted in Fig. 6 A and B we could show on top of a 3D endothelium a dose-dependent efficacy of the drug tipifarnib with values similar to 2D. Furthermore, tipifarnib treatment resulted in side effects indicated by damage to the endothelium. In clinical studies tipifarnib did not succeed in AML therapy (Thomas and Elhamri, 2007). We could observe a higher efficacy and specificity in our leukemia 3D model when we tested trispecific antibodies (Banaszek et al., 2019) as an expansion of the bispecific T-cell engaging (BiTE) therapy concept (Goebeler and Bargou, 2020). Here, the CD3-binding site of a split trispecific antibody, referred to as hemibody, is reconstituted after binding to another hemibody. For reconstitution both hemibodies have to bind specifically to an antigen expressed on leukemic tumor cells (CD45, marker of hemopoietic cells) and to an antigen expressed in all nucleated cells of the patient (HLA-A2). Thereby HLA-A2 negative but CD45 positive immune cell populations from donors and HLA-A2 positive but CD45 negative patient cells as hECs should not be affected. Accordingly, we could not observe toxic effects in only HLA-A2 positive endothelial cells demonstrating next to its efficacy also specificity of this immunotherapeutic strategy. This has allowed us to show that our models are suitable to test and explore antigen-specific, but MHC-I-independent immune therapies *in vitro*. In contrast to other frequently used endothelial 3D cell culture models, like transwell plates, our model allows direct and close contact of hECs to the ECM. This is important as ECM cues change signaling in endothelial cells (Fukuhara et al., 2009). Furthermore, integrating the endothelium in our model enables us to study the transmigration of immune cells over the endothelial barrier. This is an important feature for the improvement of immune therapies as the presence of immune cells within the tumor is currently the best predictor for a treatment response to immune checkpoint inhibition (Lu et al., 2019; Tumeh et al., 2014).

Fibroblasts are another major part of the tumor stroma contributing to physical and immunological barriers (Kalluri, 2016). These stromal cells can also be included into the 3D models. Notably, with or without tumor cells fibroblasts cross the basement membrane of our matrix and grow inside the whole matrix. Their relevance on tumor tissue morphology is demonstrated in our 3D CRC model where SW480 CRC cells show signs of collective invasion in co-cultures with primary dermal fibroblasts (Nietzer et al., 2016). This results in the destruction of former crypt structures in the SISmuc (Nietzer et al., 2016). The role of fibroblasts in tumor metastasis has also been confirmed in animal models (Gao et al., 2019) and they are important determinants of cancer therapy (Valkenburg et al., 2018). Our new and refined *in vitro* models thus reflect the behavior of non-invasive tumor cells as well as single cell invasion, but also collective invasion supported by the tumor stroma. This provides new options for drug testing in different tissue-like contexts. For example, it can be tested if substances interfere with the interaction of tumor cells with surrounding stroma cells and can thereby hinder tumor cell invasion.

An adjustment of *in vitro* to patient conditions is, for instance, suggested by the fact that our 3D model - similar to patients - does not imply a correlation between HSP90 inhibitor efficacy and a *KRAS* mutation in lung tumors (Gottlich et al., 2018). While such correlation had been suggested by 2D and animal models (Sos et al., 2009) clinical studies revealed this to be most likely an artifact (Socinski et al., 2013).

4.2 In which aspects are modular 3D tissue models an improvement?

To analyze differences between tumor cells cultured in 2D versus 3D in more detail, we first looked at stemness. CD44 functions as a receptor that binds to hyaluronic acid and other components of the ECM (Nusgens, 2010). It is widely recognized as a stem cell marker in solid tumors, acts as a co-receptor and regulates cell behavior by integrating external signals (Wang et al., 2018). Also other markers expressed by healthy stem cells such as e.g. CD133 are found on cancer stem cells (CSC) (Sahlberg et al., 2014; Wang et al., 2012). EpCAM is important for epithelial cell-to-cell contacts but has also oncogenic potential in cell signaling by releasing its intracellular domain (Munz et al., 2009). Together with CD44, EpCAM significantly affects the clinical course in CRC (Liu et al., 2014). Also CD166 which is found in the intestinal stem cell niche is discussed as a cancer stem cell marker (Levin et al., 2010). Staining of these markers revealed a higher expression of all investigated markers under 3D conditions than under 2D conditions. As tumor cells can acquire mesenchymal features and stem cell characteristics during invasion and the development of resistance (Shibue and Weinberg, 2017), it remains open whether CSCs are more likely than non-CSCs to grow on the OncoVaSc-TERM® scaffold, or whether stem cell features develop in non-CSCs due to the 3D culture conditions. Still, considering that the postulated CSC population comprises the cells that are most likely to escape from conventional cytostatic chemotherapy or radiotherapy, their targeting is thought to be essential for long-lasting therapeutic success (Shibue and Weinberg, 2017). The enhanced stemness of tumor cells cultured on the matrix in 3D may explain their generally higher chemoresistance compared to 2D cultured cells, which should be advantageous for the identification of efficient drugs in cancer therapy. Nevertheless, inhibitors that are well known to work in the clinic such as gefitinib do reliable work in our 3D tissue test systems (Stratmann et al., 2016; Gottlich et al., 2018). To determine more general differences between 2D and 3D expression in molecular detail, we have compared here the ratio of treated to non-treated gefitinib-responsive and non-responsive tumor cells carrying an EGFR biomarker or not. Gene ontology (Go) enrichment analysis of microarrays of 2D- and 3D-cultured cells normalized to untreated cells of the respective culture condition reveals highly significant differences in gene clusters for proliferation, cell cycle and apoptosis. Given the more physiological environment and growth pattern of 3D cell culture, there is good reason to believe that our 3D models reflect clinical responses more accurately than conventional 2D models.

For the understanding of systems biology of targeted treatments as applied in the clinic, and for connecting our *in vivo*-like 3D models to the *in silico* prediction module, we have integrated further analysis parameters going beyond viability such as proliferation, apoptosis and signaling (Stratmann et al., 2014). Thus, central important signaling cascades known from literature and data bases are set up *in silico* with the software CellDesigner as a topology to reflect interdependencies by feedback loops and redundancies. The interconnectivity of the network that includes parameters as kinase cascades, mutations, *in vitro* measured drug responses of proliferation, apoptosis, and EMT, subsequently provides a basis for optimized simulations of drug effects. The *in silico* module starts from a Boolean decision network which then is dynamically simulated and investigated by the software SQUAD using differential equations (Di Cara et al., 2007). This enables approximations of systemic drug responses even without a detailed kinetic information. As a generic example we have tested here the effects of the AMPK activator metformin on HCC827 cells, as AMPK activation was predicted to be a promising target before (Gottlich et al., 2018). Metformin is discussed to reduce the risk to die from cancer in diabetic patients (Chae et al., 2016; Sun et al., 2015). Increased apoptosis induction by metformin and the EGFR inhibitor gefitinib was predicted *in silico* and demonstrated *in vitro*. Starting from these experimental observations and combined with *in silico* modeling, hypotheses can be generated for mode-of-actions that are exemplified in the following: Looking at the topology, the induction of proliferation by metformin mono-therapy could be explained systemically by cellular pathway switching: upon mTOR inhibition a compensatory activation of the MEK-ERK pathway is likely to occur. Though there is no direct connection between these pathways, the cellular system change is instead mediated by a concerted reaction of the complete network (connection via PI3K-AKT, and both drugs have an enhancing effect via p53 on apoptosis). However, this MEK-ERK pathway activation could then be targeted by the combination with gefitinib. Hence, there is no direct interaction between the pathways. Instead, a whole system state switch occurs, which would have been difficult to hypothesize by just looking at the data obtained from our 3D culture system. Thus, “wet lab” research performed in this culture system can benefit from additional *in silico* modeling. *Vice versa*, *in silico* modeling can only be as good as the data the algorithms are fed with. While integrated mutational signatures cannot yet predict the response to a treatment, *in silico* analyses can identify promising candidates which can then be pretested in our 3D tumor tissue models. This could strongly reduce the number of animals required to develop combination therapies, as only the most promising combinations would have to be tested in animals. In addition, testing of individually tailored therapies could be greatly accelerated, which may become critical for precision medicine in oncology.

Finally, we show that a 3D CRC model with or without fibroblasts is much more resistant towards induction of apoptosis by allogenic PBMCs than a 2D model. This represents a first step towards establishing immunotherapeutic 3D test systems with material from different donors. Thus, the model provides a good starting point for testing MHC1-dependent immunotherapeutics such as immune checkpoint-inhibitors. In addition to antigen-specific T-cell engaging testing, we have already demonstrated that our 3D tumor models can be used to test CAR T-cell efficacy in solid tumors as a further antigen-specific approach and to develop new engineering strategies (Stuber et al., 2020; Wallstabe et al., 2019).

To summarize, benefits of our platform include a reduction of animal experiments, improved screening modalities for anticancer drug development, the possibility to include immune cells and components and hence a more reliable testing of immune therapies. We are thus confident that our modular and standardizable test platform, which closely mimics cellular *in vivo* conditions, has a high potential for basic and applied research.

References

- Albritton, J. L. and Miller, J. S. (2017). 3d bioprinting: Improving in vitro models of metastasis with heterogeneous tumor microenvironments. *Dis Model Mech* 10, 3-14. doi:10.1242/dmm.025049
- Anselmi, G., Vaivode, K., Dutertre, C. A. et al. (2020). Engineered niches support the development of human dendritic cells in humanized mice. *Nat Commun* 11, 2054. doi:10.1038/s41467-020-15937-y
- Arrowsmith, J. and Miller, P. (2013). Trial watch: Phase ii and phase iii attrition rates 2011-2012. *Nat Rev Drug Discov* 12, 569. doi:10.1038/nrd4090
- Baker, L. A., Tiriach, H., Clevers, H. et al. (2016). Modeling pancreatic cancer with organoids. *Trends Cancer* 2, 176-190. doi:10.1016/j.trecan.2016.03.004
- Banaszek, A., Bumm, T. G. P., Nowotny, B. et al. (2019). On-target restoration of a split t cell-engaging antibody for precision immunotherapy. *Nat Commun* 10, 5387. doi:10.1038/s41467-019-13196-0
- Baur, F., Nietzer, S. L., Kunz, M. et al. (2019). Connecting cancer pathways to tumor engines: A stratification tool for colorectal cancer combining human in vitro tissue models with boolean in silico models. *Cancers (Basel)* 12, doi:10.3390/cancers12010028
- Berger, C., Bjorlykke, Y., Hahn, L. et al. (2020). Matrix decoded - a pancreatic extracellular matrix with organ specific cues guiding human ipsc differentiation. *Biomaterials* 244, 119766. doi:10.1016/j.biomaterials.2020.119766
- Bersi, H. (2017). Etablierung eines 3d in vitro blutgefäß-/gewebemodells zur testung spezifischer therapeutika zur leukämiebehandlung/establishment of a 3d in vitro blood vessel /tissue model to test specific therapeutic agents to treat leukemia. University of Wuerzburg, medical faculty, urn:nbn:de:bvb:20-opus-152506
- Bhattacharjee, Y. (2012). Biomedicine. Pharma firms push for sharing of cancer trial data. *Science* 338, 29. doi:10.1126/science.338.6103.29
- Bissell, M. J. (1981). The differentiated state of normal and malignant cells or how to define a "normal" cell in culture. *Int Rev Cytol* 70, 27-100. doi:10.1016/s0074-7696(08)61130-4
- Bissell, M. J., Rizki, A. and Mian, I. S. (2003). Tissue architecture: The ultimate regulator of breast epithelial function. *Curr Opin Cell Biol* 15, 753-762. doi:10.1016/j.ceb.2003.10.016
- Chae, Y. K., Arya, A., Malecek, M. K. et al. (2016). Repurposing metformin for cancer treatment: Current clinical studies. *Oncotarget* 7, 40767-40780. doi:10.18632/oncotarget.8194
- Cree, I. A., Glaysher, S. and Harvey, A. L. (2010). Efficacy of anti-cancer agents in cell lines versus human primary tumour tissue. *Curr Opin Pharmacol* 10, 375-379. doi:10.1016/j.coph.2010.05.001
- Di Cara, A., Garg, A., De Micheli, G. et al. (2007). Dynamic simulation of regulatory networks using squad. *BMC Bioinformatics* 8, 462. doi:10.1186/1471-2105-8-462
- Dijkstra, K. K., Cattaneo, C. M., Weeber, F. et al. (2018). Generation of tumor-reactive t cells by co-culture of peripheral blood lymphocytes and tumor organoids. *Cell* 174, 1586-1598 e1512. doi:10.1016/j.cell.2018.07.009
- Drost, J. and Clevers, H. (2018). Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer* 18, 407-418. doi:10.1038/s41568-018-0007-6
- EC – European Commission (2020). 2019 report on the statistics on the use of animals for scientific purposes in the member states of the european union in 2015-2017. *Brussels*, 5.2.2020
- Fan, H., Demirci, U. and Chen, P. (2019). Emerging organoid models: Leaping forward in cancer research. *J Hematol Oncol* 12, 142. doi:10.1186/s13045-019-0832-4
- Francone, T. D., Landmann, R. G., Chen, C. T. et al. (2007). Novel xenograft model expressing human hepatocyte growth factor shows ligand-dependent growth of c-met-expressing tumors. *Mol Cancer Ther* 6, 1460-1466. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0466
- Fuchs, M., Kreutzer, F. P., Kapsner, L. A. et al. (2020). Integrative bioinformatic analyses of global transcriptome data decipher novel molecular insights into cardiac anti-fibrotic therapies. *Int J Mol Sci* 21, doi:10.3390/ijms21134727
- Fukuhara, S., Sako, K., Noda, K. et al. (2009). Tie2 is tied at the cell-cell contacts and to extracellular matrix by angiotensin-1. *Exp Mol Med* 41, 133-139. doi:10.3858/emm.2009.41.3.016
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F. et al. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960-1964. doi:10.1126/science.1129139
- Gao, Q., Yang, Z., Xu, S. et al. (2019). Heterotypic caf-tumor spheroids promote early peritoneal metastasis of ovarian cancer. *J Exp Med* 216, 688-703. doi:10.1084/jem.20180765
- Goebeler, M. E. and Bargou, R. C. (2020). T cell-engaging therapies - bites and beyond. *Nat Rev Clin Oncol* 17, 418-434. doi:10.1038/s41571-020-0347-5
- Gottlich, C., Muller, L. C., Kunz, M. et al. (2016). A combined 3d tissue engineered in vitro/in silico lung tumor model for predicting drug effectiveness in specific mutational backgrounds. *J Vis Exp* e53885. doi:10.3791/53885
- Gottlich, C., Kunz, M., Zapp, C. et al. (2018). A combined tissue-engineered/in silico signature tool patient stratification in lung cancer. *Mol Oncol* 12, 1264-1285. doi:10.1002/1878-0261.12323
- Groeber, F., Engelhardt, L., Lange, J. et al. (2016). A first vascularized skin equivalent as an alternative to animal experimentation. *ALTEX* 33, 415-422. doi:10.14573/altex.1604041
- Gubbiotti, M. A., Buraschi, S., Kapoor, A. et al. (2020). Proteoglycan signaling in tumor angiogenesis and endothelial cell autophagy. *Semin Cancer Biol* 62, 1-8. doi:10.1016/j.semcancer.2019.05.003
- Howat, W. J., Barabas, T., Holmes, J. A. et al. (2002). Distribution of basement membrane pores in bronchus revealed by microscopy following epithelial removal. *J Struct Biol* 139, 137-145. doi:10.1016/s1047-8477(02)00589-0
- Inwald, E. C., Klinkhammer-Schalke, M., Hofstadter, F. et al. (2013). Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: Results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat* 139, 539-552. doi:10.1007/s10549-013-2560-8
- Jannasch, M., Groeber, F., Brattig, N. W. et al. (2015). Development and application of three-dimensional skin equivalents for the investigation of percutaneous worm invasion. *Exp Parasitol* 150, 22-30. doi:10.1016/j.exppara.2015.01.005

- Jeffers, M., Rong, S. and Vande Woude, G. F. (1996). Hepatocyte growth factor/scatter factor-met signaling in tumorigenicity and invasion/metastasis. *J Mol Med (Berl)* 74, 505-513. doi:10.1007/BF00204976
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 16, 582-598. doi:10.1038/nrc.2016.73
- Katt, M. E., Placone, A. L., Wong, A. D. et al. (2016). In vitro tumor models: Advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. *Front Bioeng Biotechnol* 4, 12. doi:10.3389/fbioe.2016.00012
- Kim, M., Mun, H., Sung, C. O. et al. (2019). Patient-derived lung cancer organoids as in vitro cancer models for therapeutic screening. *Nat Commun* 10, 3991. doi:10.1038/s41467-019-11867-6
- Levin, T. G., Powell, A. E., Davies, P. S. et al. (2010). Characterization of the intestinal cancer stem cell marker cd166 in the human and mouse gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 139, 2072-2082 e2075. doi:10.1053/j.gastro.2010.08.053
- Linke, K., Schanz, J., Hansmann, J. et al. (2007). Engineered liver-like tissue on a capillarized matrix for applied research. *Tissue Eng* 13, 2699-2707. doi:10.1089/ten.2006.0388
- Liu, D., Sun, J., Zhu, J. et al. (2014). Expression and clinical significance of colorectal cancer stem cell marker epcam(high)/cd44(+) in colorectal cancer. *Oncol Lett* 7, 1544-1548. doi:10.3892/ol.2014.1907
- Lu, S., Wang, H. and Taube, J. M. (2019). Differernt biomarker modalities and response to anti-pd-1/pd-l1 therapies-reply. *JAMA Oncol* doi:10.1001/jamaoncol.2019.5154
- Matsuoka, Y., Funahashi, A., Ghosh, S. et al. (2014). Modeling and simulation using celldesigner. *Methods Mol Biol* 1164, 121-145. doi:10.1007/978-1-4939-0805-9_11
- McCluggage, S. G. and Low, F. N. (1984). Microdissection by ultrasonication: Porosity of the intestinal epithelial basal lamina. *Am J Anat* 171, 207-216. doi:10.1002/aja.1001710206
- Meurette, O. and Mehlen, P. (2018). Notch signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 34, 536-548. doi:10.1016/j.ccell.2018.07.009
- Mullins, C. S., Micheel, B., Matschos, S. et al. (2019). Integrated biobanking and tumor model establishment of human colorectal carcinoma provides excellent tools for preclinical research. *Cancers (Basel)* 11, doi:10.3390/cancers11101520
- Munz, M., Baeuerle, P. A. and Gires, O. (2009). The emerging role of epcam in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res* 69, 5627-5629. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0654
- Nath, S. and Devi, G. R. (2016). Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol Ther* 163, 94-108. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.03.013
- Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J. et al. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10, 515-527. doi:10.1016/j.ccr.2006.10.008
- Nietzer, S., Baur, F., Sieber, S. et al. (2016). Mimicking metastases including tumor stroma: A new technique to generate a three-dimensional colorectal cancer model based on a biological decellularized intestinal scaffold. *Tissue Eng Part C Methods* 22, 621-635. doi:10.1089/ten.TEC.2015.0557
- Nusgens, B. V. (2010). [hyaluronic acid and extracellular matrix: A primitive molecule?]. *Ann Dermatol Venereol* 137 Suppl 1, S3-8. doi:10.1016/S0151-9638(10)70002-8
- Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I. et al. (2019). G:Profiler: A web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res* 47, W191-W198. doi:10.1093/nar/gkz369
- Rongvaux, A., Takizawa, H., Strowig, T. et al. (2013). Human hemato-lymphoid system mice: Current use and future potential for medicine. *Annu Rev Immunol* 31, 635-674. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095921
- Rongvaux, A., Willinger, T., Martinek, J. et al. (2014). Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. *Nat Biotechnol* 32, 364-372. doi:10.1038/nbt.2858
- Sahlberg, S. H., Spiegelberg, D., Glimelius, B. et al. (2014). Evaluation of cancer stem cell markers cd133, cd44, cd24: Association with akt isoforms and radiation resistance in colon cancer cells. *PLoS One* 9, e94621. doi:10.1371/journal.pone.0094621
- Santo, V. E., Rebelo, S. P., Estrada, M. F. et al. (2017). Drug screening in 3d in vitro tumor models: Overcoming current pitfalls of efficacy read-outs. *Biotechnol J* 12, doi:10.1002/biot.201600505
- Schanz, J., Pusch, J., Hansmann, J. et al. (2010). Vascularised human tissue models: A new approach for the refinement of biomedical research. *J Biotechnol* 148, 56-63. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.03.015
- Schweinlin, M., Rossi, A., Lodes, N. et al. (2017). Human barrier models for the in vitro assessment of drug delivery. *Drug Deliv Transl Res* 7, 217-227. doi:10.1007/s13346-016-0316-9
- Shibue, T. and Weinberg, R. A. (2017). Emt, cscs, and drug resistance: The mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* 14, 611-629. doi:10.1038/nrclinonc.2017.44
- Simian, M. and Bissell, M. J. (2017). Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. *J Cell Biol* 216, 31-40. doi:10.1083/jcb.201610056
- Socinski, M. A., Goldman, J., El-Hariry, I. et al. (2013). A multicenter phase ii study of ganetespib monotherapy in patients with genotypically defined advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 19, 3068-3077. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3381
- Song, Y., Rongvaux, A., Taylor, A. et al. (2019). A highly efficient and faithful mds patient-derived xenotransplantation model for pre-clinical studies. *Nat Commun* 10, 366. doi:10.1038/s41467-018-08166-x
- Sos, M. L., Michel, K., Zander, T. et al. (2009). Predicting drug susceptibility of non-small cell lung cancers based on genetic lesions. *J Clin Invest* 119, 1727-1740. doi:10.1172/JCI37127
- Stieglitz, E., Ward, A. F., Gerbing, R. B. et al. (2015). Phase ii/iii trial of a pre-transplant farnesyl transferase inhibitor in juvenile myelomonocytic leukemia: A report from the children's oncology group. *Pediatr Blood Cancer* 62, 629-636. doi:10.1002/pbc.25342
- Stratmann, A. T., Fecher, D., Wangorsch, G. et al. (2014). Establishment of a human 3d lung cancer model based on a biological tissue matrix combined with a boolean in silico model. *Mol Oncol* 8, 351-365. doi:10.1016/j.molonc.2013.11.009

- Stuber, T., Monjezi, R., Wallstabe, L. et al. (2020). Inhibition of tgf-beta-receptor signaling augments the antitumor function of ror1-specific car t-cells against triple-negative breast cancer. *J Immunother Cancer* 8, doi:10.1136/jitc-2020-000676
- Sun, J., Zhao, M., Jia, P. et al. (2015). Deciphering signaling pathway networks to understand the molecular mechanisms of metformin action. *PLoS Comput Biol* 11, e1004202. doi:10.1371/journal.pcbi.1004202
- Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T. and Isayama, H. (1999). Porosity of the epithelial basement membrane as an indicator of macrophage-enterocyte interaction in the intestinal mucosa. *Arch Histol Cytol* 62, 471-481. doi:10.1679/ahoc.62.471
- Takeuchi, T. and Gonda, T. (2004). Distribution of the pores of epithelial basement membrane in the rat small intestine. *J Vet Med Sci* 66, 695-700. doi:10.1292/jvms.66.695
- Thomas, X. and Elhamri, M. (2007). Tipifarnib in the treatment of acute myeloid leukemia. *Biologics* 1, 415-424.
- Tumeh, P. C., Harview, C. L., Yearley, J. H. et al. (2014). Pd-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 515, 568-571. doi:10.1038/nature13954
- Valkenburg, K. C., de Groot, A. E. and Pienta, K. J. (2018). Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 15, 366-381. doi:10.1038/s41571-018-0007-1
- van Duinen, V., Trietsch, S. J., Joore, J. et al. (2015). Microfluidic 3d cell culture: From tools to tissue models. *Curr Opin Biotechnol* 35, 118-126. doi:10.1016/j.copbio.2015.05.002
- Wallstabe, L., Gottlich, C., Nelke, L. C. et al. (2019). Ror1-car t cells are effective against lung and breast cancer in advanced microphysiologic 3d tumor models. *JCI Insight* 4, doi:10.1172/jci.insight.126345
- Walsh, N. C., Kenney, L. L., Jangalwe, S. et al. (2017). Humanized mouse models of clinical disease. *Annu Rev Pathol* 12, 187-215. doi:10.1146/annurev-pathol-052016-100332
- Wang, C., Xie, J., Guo, J. et al. (2012). Evaluation of cd44 and cd133 as cancer stem cell markers for colorectal cancer. *Oncol Rep* 28, 1301-1308. doi:10.3892/or.2012.1951
- Wang, L., Zuo, X., Xie, K. et al. (2018). The role of cd44 and cancer stem cells. *Methods Mol Biol* 1692, 31-42. doi:10.1007/978-1-4939-7401-6_3
- Warth, A., Cortis, J., Soltermann, A. et al. (2014). Tumour cell proliferation (ki-67) in non-small cell lung cancer: A critical reappraisal of its prognostic role. *Br J Cancer* 111, 1222-1229. doi:10.1038/bjc.2014.402
- Weeber, F., Ooft, S. N., Dijkstra, K. K. et al. (2017). Tumor organoids as a pre-clinical cancer model for drug discovery. *Cell Chem Biol* 24, 1092-1100. doi:10.1016/j.chembiol.2017.06.012
- Wickham, H. (2009). *Ggplot2 - elegant graphics for data analysis*. Vol. Germany: Springer.
- Willis, N. D., Przyborski, S. A., Hutchison, C. J. et al. (2008). Colonic and colorectal cancer stem cells: Progress in the search for putative biomarkers. *J Anat* 213, 59-65. doi:10.1111/j.1469-7580.2008.00917.x
- Xu, X., Farach-Carson, M. C. and Jia, X. (2014). Three-dimensional in vitro tumor models for cancer research and drug evaluation. *Biotechnol Adv* 32, 1256-1268. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.07.009
- Yada, E., Wada, S., Yoshida, S. et al. (2018). Use of patient-derived xenograft mouse models in cancer research and treatment. *Future Sci OA* 4, FSO271. doi:10.4155/fsoa-2017-0136
- Zhang, Y. and Weinberg, R. A. (2018). Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: Complexity and opportunities. *Front Med* 12, 361-373. doi:10.1007/s11684-018-0656-6

Conflict of interest

There is no conflict of interest by the authors.

Author contributions

JK, FS, HL, MS, LN, TS, FB, CG, MP, CB, CK, JW, MP, HW: Cell culture experiments, methods and tests; MK, MF, TD: bioinformatics and simulations; All authors were involved in data analysis; GD, TD, SN: Supervision, led and guided the study; GD, TD, SN: manuscript draft. All authors read and corrected the manuscript and agreed to the final version.

Acknowledgements

We thank for support from the BMBF in the call "alternative methods to animal experiments" (GD, TD, project: 031L0129A/B; all parts concerning animal reduction strategies), the IZKF Würzburg (GD, JK: Project: B354; parts on coculture with stroma), the Bayern Fit program (LN, FB, SLN) and the Bavarian Research Foundation (GD, TD, JW: project: AZ-1365-18; parts on transmigration of immune cells and their signaling). For providing HROC24 and HROC87 early passage cells we thank Michael Linnebacher. Furthermore, we would like to thank Heide Häfner for any technical assistance in the lab, Christian Stigloher, Claudia Gehrig and Daniela Bunsen for their support in ultrastructural analysis and G. Stuhler for supply with PBMCs and trispecific antibodies. This publication was supported by the Open Access Publication Fund of the University of Würzburg.