

**Mechanismen der Wachstumsförderung α -Catenin defizienter Zellen des
kolorektalen Karzinoms durch mesenchymale Stromazellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Roxana Leonora Schuh

geboren am [REDACTED] in [REDACTED]

Betreuer: apl. Prof. Dr. med. Lutz P. Müller

Gutachter:

Jun.-Prof. Dr. Michael Böttcher, Halle (Saale)

Prof. Dr. Helge Taubert, Erlangen

Datum der Verteidigung: 06.03.2024

REFERAT

Die Interaktion zwischen Tumorzellen und umgebendem Stroma ist komplex. Das kolorektale Karzinom (CRC) ist geprägt von einem heterogenen Mutationsstatus, die Expression des Zelladhäsionsprotein α -Catenin (α -Cat) kann entscheidend für das Tumorwachstum sein. Multipotente mesenchymale Stromazellen (MSC) partizipieren am Tumorstroma, und interagieren somit vermutlich mit CRC-Zellen. Zur Rolle von α -Cat bei dieser Interaktion ist wenig bekannt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von α -Cat bei der MSC-vermittelten Wachstumsförderung in CRC-Zellen mit heterogenem Mutationsstatus zu bestimmen.

Mittels CRISPR/Cas9- oder shRNA-System wurde in den CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 ein α -Cat *knock down* (kd) etabliert. Dieser wurde auf transkriptioneller und translationaler Ebene verifiziert und sein Einfluss auf die CRC-Zellen und deren Interaktion mit MSC charakterisiert. Die Proliferation der CRC-Zellen *in vitro* wurde nicht durch die α -Cat Defizienz beeinflusst. Unter 3D-Kulturbedingungen zeigte sich für α -Cat defiziente Zellen ein Verlust der Sphäroidbildung. Bei α -Cat kd DLD1 konnte die Präsenz von MSC die Fähigkeit zur Sphäroidbildung in Abhängigkeit von β 1-Integrin (β 1-Int) wiederherstellen, nicht jedoch in α -Cat kd HT29. Interessanterweise fanden sich qualitative Unterschiede in der β 1-Int Expression unabhängig von der α -Cat Expression zwischen der Zelllinien DLD1 und HT29. Durchflusszytometrisch wurde jedoch in beiden Zelllinien eine Oberflächenexpression von β 1-Int detektiert. In einer 2D-Kokultur mit MSC zur Analyse potenzieller molekularer Mechanismen fand sich für beide CRC-Zelllinien eine veränderte Expression von Genen der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) und in MSC eine veränderte Expression von fibroblastären Markern. Beide Veränderungen wurden unabhängig vom α -Cat Status der jeweiligen CRC-Zelllinie beobachtet. *In vivo* förderten MSC das Xenograftwachstum von α -Cat exprimierenden CRC-Zellen im murinen Modell. Analog zum Sphäroidmodell fand sich eine differentielle Förderung des Wachstums bei α -Cat Defizienz im MSC-gemischten CRC-Xenograft: Während das Tumorwachstum von α -Cat kd DLD1 durch MSC weiter gefördert wurde, war die Förderung durch MSC für Xenografte von α -Cat kd HT29 aufgehoben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen damit erstmalig, dass die Förderung des Tumorwachstums von CRC-Zellen durch MSC in bestimmten CRC-Zelllinien mit der Expression von α -Cat assoziiert ist. Die Daten deuten darauf hin, dass dieser Einfluss von in CRC-Zellen exprimierten β 1-Int abhängig ist.

Schuh, Roxana: Mechanismen der Wachstumsförderung α -Catenin defizienter Zellen des kolorektalen Karzinoms durch mesenchymale Stromazellen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 70 Seiten, 2023

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Bedeutung der Interaktion von Tumor und Stroma	1
1.1.1	Aufbau des Tumorstromas.....	1
1.1.2	Rolle des Tumorstromas bei Invasion und Metastasierung.....	2
1.2	Multipotente mesenchymale Stromazellen als Teil des Tumorstromas.....	3
1.2.1	Grundlegende Charakteristika von MSC	3
1.2.2	Interaktion von MSC und Tumorzellen	4
1.3	Die Rolle der Zelladhäsion in Tumorzellen.....	5
1.3.1	Physiologie der Zelladhäsionsproteine	5
1.3.2	Rolle der Zelladhäsionsproteine im Tumor	6
1.4	Die Rolle des Tumorstromas im kolorektalen Karzinom.....	6
1.4.1	Epidemiologie und Pathophysiologie des CRC.....	6
1.4.2	Genetische Heterogenität des CRC	7
1.4.3	Bedeutung des Tumorstromas im CRC	7
2	ZIELSTELLUNG.....	9
3	MATERIAL UND METHODEN	10
3.1	Materialien und Geräte.....	10
3.1.1	Zellen.....	10
3.1.2	Allgemeine Chemikalien.....	10
3.1.3	Antikörper	10
3.1.4	Oligonukleotide	11
3.1.5	Lentivirale shRNA-Partikel.....	13
3.1.6	DNA-Zielsequenz in CRISPR/Cas9.....	14
3.1.7	Medien, Puffer und Lösungen.....	14
3.1.8	Verbrauchsmaterialien und Geräte	15

3.2	Herkunft der MSC.....	16
3.3	Kultivierung von CRC-Zelllinien und MSC.....	16
3.4	Generierung eines stabilen α -Catenin <i>knock down</i> in CRC-Zellen.....	17
3.4.1	Herstellung einer α -Catenin Defizienz mittels shRNA-Partikel.....	17
3.4.2	Herstellung einer α -Catenin Defizienz mittels CRISPR/Cas9.....	17
3.5	Analyse der Wachstumskinetik <i>in vitro</i>	18
3.5.1	Messung der Proliferation der CRC-Zellen <i>in vitro</i>	18
3.5.2	Wachstumsanalyse mittels Sulforhodamin B-Assay.....	19
3.6	Kultivierung im 3D-Sphäroidmodell.....	19
3.6.1	Prinzip des 3D-Sphäroidmodells und CRC-Zellen in der Sphäroidkultur.....	19
3.6.2	Herstellung von MSC-gemischten 3D-Sphäroidkulturen.....	20
3.7	Kultivierung in 2D-Kokulturen.....	20
3.8	Durchflusszytometrische Analyse und Sortierung.....	20
3.8.1	Analyse der Oberflächenexpression von β 1-Int in CRC-Zellen.....	20
3.8.2	Fluoreszenz-markiertes Sortieren von MSC und CRC.....	21
3.9	Western-Blot Analyse.....	21
3.10	RNA-Isolation und quantitative <i>real-time</i> PCR.....	22
3.10.1	Isolierung von RNA und reverse Transkription.....	22
3.10.2	Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	23
3.10.3	Elektrophorese von DNA.....	24
3.11	Tierversuche.....	24
3.12	Mikroskopische Fotodokumentation von 2D- und 3D-Kulturen.....	24
3.13	Statistische Analysen.....	25
4	ERGEBNISSE.....	26
4.1	Etablierung eines α -Catenin <i>knock down</i> Modells in CRC-Zellen.....	26
4.1.1	Herstellung eines stabilen α -Catenin <i>knock down</i>	26
4.1.2	Wachstumsanalyse der <i>knock down</i> Zellen.....	27
4.1.3	Zellmorphologische Veränderungen nach α -Catenin <i>knock down</i>	29

4.2	Auswirkungen der α -Catenin Defizienz auf die Sphäroidbildung <i>in vitro</i>	30
4.2.1	Abhängigkeit der Sphäroidbildung von der α -Catenin Expression	30
4.2.2	Differentielle Sphäroidbildung in Kokultur mit MSC.....	30
4.2.3	Vermittlung der Sphäroidbildung durch β 1-Integrin	31
4.3	Analyse der β 1-Integrin Expression in α -Catenin <i>knock down</i> CRC-Zellen	32
4.3.1	Messung der mRNA- und Proteinexpression von β 1-Integrin	32
4.3.2	Messung der Oberflächenexpression von β 1-Integrin.....	34
4.4	Assoziation ausgewählter Marker mit der differentiellen Interaktion von MSC mit α -Catenin defizienten CRC-Zellen.....	35
4.4.1	Untersuchung der Expression von EMT-Markern in CRC-Zellen mit α -Catenin <i>knock down</i>	35
4.4.2	Untersuchung der Expression von TAF-Markern in MSC.....	38
4.5	Xenograftwachstum α -Catenin defizienter CRC-Zellen	41
5	DISKUSSION	43
5.1	Wesentliche Resultate	43
5.2	Auswirkungen der α -Catenin Defizienz im CRC-Modell.....	44
5.2.1	Morphologische Veränderungen in den CRC-Zellen.....	44
5.2.2	Proliferation von α -Catenin defizienten Zellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	45
5.2.3	Defizitäre Sphäroidbildung von CRC-Zellen bei Fehlen von α -Catenin	46
5.3	Mechanismen der Interaktion zwischen MSC und CRC-Zellen <i>in vitro</i>	47
5.3.1	β 1-Integrin abhängige Kompensation der Sphäroidbildung durch MSC	47
5.3.2	Induktion einer EMT unabhängig von der α -Catenin Expression	48
5.3.3	Induktion einer TAF-Differenzierung unabhängig von der α -Catenin Expression	50
5.4	Mechanismen der Interaktion zwischen MSC und CRC-Zellen <i>in vivo</i>	51
5.4.1	Wachstumsförderung von CRC-Zellen durch MSC.....	51
5.4.2	Zelllinien-spezifische Wachstumsförderung von α -Catenin defizienten CRC-Zellen durch MSC.....	52

6	ZUSAMMENFASSUNG.....	54
7	LITERATURVERZEICHNIS	56
8	THESEN	70

ANLAGEN

Abbildungen

Tabellen

Erklärungen

Danksagung

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
cDNA	<i>complementary-Desoxyribonukleinsäure</i>
Col1A1	<i>Kollagen Typ 1 α1</i>
Col1A2	<i>Kollagen Typ 1 α2</i>
Col3A1	<i>Kollagen Typ 3</i>
CRC	kolorektales Karzinom
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
Ctrl	Kontrolle
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FAP	<i>fibroblast activation protein</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
gRNA	<i>guide-Ribonukleinsäure</i>
ITGA11	<i>Integrin α-11</i>
KM	Knochenmark
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MRTF-A	<i>myocardin-related transcription factor-A</i>
MSC	mesenchymale Stromazellen
MW	Mittelwert
OD	optische Dichte
PD	Populationsverdopplung
PDT	Populationsverdopplungszeit
qPCR	quantitative <i>real-time</i> Polymerase-Kettenreaktion
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>
SRB	Sulforhodamin B
Stabw	Standardabweichung
TAF	Tumor-assoziierte Fibroblasten

TGF- β *transforming growth factor β*
TNC *Tenascin C*
WT *Wildtyp*
 α -Cat *α -Catenin*
 β 1-Int *β 1-Integrin*

1 EINLEITUNG

1.1 Die Bedeutung der Interaktion von Tumor und Stroma

1.1.1 Aufbau des Tumorstromas

In der Betrachtung von soliden Tumoren hat sich die Vorstellung von einer isolierten Ansammlung maligner Zellen gewandelt – der Tumor wird eher mit einem komplexen Organ verglichen, dessen Parenchym, die Tumorzellen, in Interaktion mit dem Tumorstroma stehen (Hanahan und Weinberg 2011).

Physiologisch setzt sich Stroma aus Extrazellulärer Matrix (ECM), Lymph- und Blutgefäßen, Nerven-, Immunzellen und Fibroblasten zusammen. Als Hauptzellen des Stromas synthetisieren und modellieren Fibroblasten ECM zur Aufrechterhaltung der Gewebemöostase. Bei Vorgängen wie Wundheilung, Neovaskularisation, aber auch bei Narbenbildung und Fibrose initiieren Myofibroblasten in Interaktion mit ihrer Umgebung die Bildung eines reaktiven Stromas, das durch einen höheren Zellanteil, gesteigerte Kapillardichte sowie Ablagerung von Kollagen I und Fibrin gekennzeichnet ist (Kalluri und Zeisberg 2006).

In Analogie von Tumoren zu chronischen Wunden (Dvorak 1986) interagieren Tumorzellen mit dem umgebenden Stroma und rufen eine Stromareaktion hervor (Liotta und Kohn 2001). Tumor-assoziierte Fibroblasten (TAF) als Teil des reaktiven Stromas in Tumoren weisen einen myofibroblastären Phänotyp auf. Dieser ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Proliferationsrate und Kollagensynthese, Sekretion von Wachstumsfaktoren und Umbau von ECM. TAF befinden sich am Tumorrand oder infiltrieren den Tumor (Madar et al. 2013). Auf molekularer Ebene können TAF eine Reihe von Markern exprimieren, die auf einen myofibroblastären Phänotyp hinweisen (Übersicht in Shiga et al. 2015). Als Ursprung von TAF wurden ruhende Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen, Perizyten sowie dem Knochenmark entstammende Zellen wie multipotente mesenchymale Stromazellen (MSC) beschrieben (Xouri und Christian 2010; Direkze et al. 2003).

TAF stimulieren die Karzinogenese (Olumi et al. 1999; Strnad et al. 2010) und fördern Proliferation, Vaskularisation (Fukumura et al. 1998) und Invasivität in Interaktion mit den Tumorzellen mittels Wachstumsfaktoren und ECM-Umbau (Talmadge und Fidler 2010). In Brustkrebszellen induzieren TAF einen aggressiveren Phänotyp sowie *transforming growth factor* β (TGF- β)-vermittelt eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) (Yu et al. 2014).

1.1.2 Rolle des Tumorstromas bei Invasion und Metastasierung

Metastasierung ist ein Prozess, in dem es zur Ansiedlung von Tumorzellen an einem von dem Primärtumor differnten Ort im Körper kommt. Der Prozess ist in zwei Hauptschritte unterteilt: Zuerst erfolgt die Disseminierung vom Primärtumor, die eine lokale Invasion, Intravasation und Distribution im Organismus beinhaltet. Daran schließt sich die Kolonisation eines Organs an: vereinzelte Tumorzellen adhären bei geeigneten Bedingungen an die Gefäßwand und durchwandern diese (Extravasation), um sich im Gewebe anzusiedeln. Dort entwickeln sie sich schlussendlich zum makroskopischen Sekundärtumor, der Metastase (Hanahan und Weinberg 2011; Nguyen et al. 2009).

Um vom Primärtumor zu disseminieren, entwickeln die Tumorzellen eine erhöhte Zellmotilität sowie die Fähigkeit sich dem Immunsystem zu entziehen, zur EMT und ECM-Degradation. Die Stimulation der Angiogenese und Mobilisierung von Knochenmarkvorläuferzellen durch den Tumor unterstützen ebenfalls den Vorgang der Disseminierung. Das Überleben in dem neuen Parenchym nach Verlassen des Gefäßsystems ist abhängig von den Eigenschaften des Gewebes und der Tumorzellen: Die „*seed-and-soil*“-Theorie geht davon aus, dass Tumorzellen besonders günstige Umgebungsbedingungen benötigen, damit es zum Wachstum eines makroskopischen Tumors kommt (Paget 1989). Diese Bedingungen unterscheiden sich bei den Tumorentitäten (Talmadge und Fidler 2010).

Die EMT ist ein aus der embryonalen Entwicklung stammender Prozess, der bei Wundheilung und Fibrose auftritt. Im Tumor spielt sowohl die EMT bei der Disseminierung als auch der umgekehrte Vorgang der mesenchymal-epithelialen Transition bei der Kolonisation eine Rolle. Die EMT ist ein dynamischer Prozess, in dem epitheliale Zellen schrittweise einen mesenchymalen Phänotyp annehmen, der durch Motilität, Invasivität und erhöhter Resistenz gegenüber Apoptose gekennzeichnet ist (Nieto et al. 2016).

Ausgelöst werden kann die EMT durch ein Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren wie TGF- β , *epidermal growth factor* (EGF) oder *fibroblast growth factor* (FGF) und ECM-Bestandteilen wie Kollagen und Hyaluronsäure (Thiery und Sleeman 2006; Zoltan-Jones et al. 2003). Das Tumorstroma spielt bei der Schaffung dieser Bedingungen eine entscheidende Rolle. So tritt in epithelialen Tumoren bei direkter Nachbarschaft zum Tumorstroma eine Erhöhung des Transkriptionsfaktors Snail auf, welcher eine EMT anzeigt (Francí et al. 2006). Die Steuerung erfolgt durch Transkriptionsfaktoren wie Snail, Slug, ZEB1, ZEB2 und Twist. E-Cadherin, ein Schlüssel-molekül in der Inhibition von Invasion und Metastasierung, wird supprimiert, und es

kommt zur Expression von mesenchymalen Markern wie N-Cadherin und Vimentin (Lamouille et al. 2014).

1.2 Multipotente mesenchymale Stromazellen als Teil des Tumorstromas

1.2.1 Grundlegende Charakteristika von MSC

MSC sind eine seltene Population von Stromazellen, die initial aus dem Knochenmark isoliert und charakterisiert wurden (Pittenger et al. 1999). Neben der Gewinnung aus dem Knochenmark wurden MSC inzwischen auch aus verschiedenen anderen Geweben wie Fettgewebe (Zuk et al. 2002), Haut (Shih et al. 2005) und Nabelschnurblut (Erices et al. 2000) isoliert (Übersicht bei Keating 2012).

Im humanen Organismus liegen MSC in vielen Geweben vermutlich als Gefäß-assoziierte Perizyten vor (Crisan et al. 2008). Zudem ist für MSC eine lebenslange Persistenz im Knochenmark beobachtet worden (Nishida et al. 1999).

In vitro weisen MSC ein multipotentes Differenzierungspotential auf. Neben der osteogenen, chondrogenen und adipogenen Differenzierung (Pittenger et al. 1999) wurde auch die Differenzierung in Astrozyten (Kopen et al. 1999), Neurozyten (Woodbury et al. 2000), Pneumozyten (Kotton et al. 2001) und Hepatozyten (Aurich et al. 2007) beobachtet.

Aufgrund eines fehlenden spezifischen Markers für MSC erfolgt die Identifikation von MSC *in vitro* anhand ihres charakteristischen Phänotyps: Sie exprimieren eine typische Auswahl an Oberflächenmarker, darunter das Adhäsionsprotein CD 105 sowie die Wachstumsfaktor-Rezeptoren EGF-Rezeptor, TGF β -Rezeptor und den FGF-Rezeptor, während hämatopoetische Marker fehlen (Minguell et al. 2001).

Anhand dieser Erkenntnisse definierte die *International Society for Cellular Therapy* minimale Kriterien zur Charakterisierung von MSC (Dominici et al. 2006):

- 1) Plastik-Adhärenz von unter Standardbedingungen kultivierten MSC
- 2) Expression von den Oberflächenmarker CD 105, CD 73 und CD 90, und das Fehlen von CD 45, CD 34, CD 14 oder CD 11b, CD 79a oder CD 19 und HLA-DR
- 3) Potential zur Differenzierung *in vitro* zu Osteo-, Chondroblasten und Adipozyten

Da MSC keine HLA-Klasse II oder kostimulatorische Moleküle exprimieren, sowie nur eine geringe Anzahl von HLA Klasse I-Molekülen, weisen sie eine niedrige Immunogenität auf (Le Blanc et al. 2003; Rasmusson 2006). Zudem haben MSC ein immunregulatorisches Potential: Sie

wirken auf T-, B- und NK-Zellen sowie dendritische Zellen des angeborenen Immunsystems suppressiv (Di Nicola 2002; Hass et al. 2011; Jiang et al. 2005).

Physiologisch spielen MSC bei der Aufrechterhaltung und Regulation des Mikromilieus im Knochenmark für die Reifung von hämatopoetischen Stammzellen eine Rolle (Valtieri und Sorrentino 2008). Im Rahmen einer Beteiligung von MSC an der Geweberegeneration wurde im Tiermodell ein Tropismus von MSC für Wunden beobachtet (Fox et al. 2007; Ponte et al. 2007). Gewebeständige MSC scheinen die Wundheilung zu fördern und differenzieren vor Ort zu Endothelzellen, Keratino- und Perizyten (Sasaki et al. 2008).

1.2.2 Interaktion von MSC und Tumorzellen

Aufgrund der lebenslangen Persistenz, dem Vorkommen in multiplen Gewebearten und dem Tropismus für Wunden wird vermutet, dass MSC mit Tumorzellen interagieren. *In vitro* differenzieren MSC im Kontakt mit Tumorzellen oder deren Medium zu TAF (Direkze et al. 2004; Ishii et al. 2003; Jeon et al. 2008). In malignen Tumoren des Menschen wurden Zellen nachgewiesen, die dem Knochenmark entstammten und am Tumorstroma partizipierten (Cogle et al. 2007).

Neben der Migration von MSC aus dem Knochenmark in etablierte maligne Tumore besteht die Möglichkeit, dass ortsansässige perivaskuläre MSC eine prämetastatische Nische bilden – analog zur Schaffung eines günstigen Mikromilieus für hämatopoetische Stammzellen – und damit den disseminierten Tumorzellen die Ansiedlung und Bildung eines Sekundärtumors in dem fremden Gewebe ermöglichen (Psaila und Lyden 2009).

Der Effekt von MSC auf das Tumorwachstum im Tiermodell unterscheidet sich bei den einzelnen Tumorentitäten und verwendeten Zelllinien (Übersicht von Rhee et al. 2015). Es sind mehrere Mechanismen der Wachstumsförderung von Tumoren durch MSC beobachtet worden: bei 2D-Kokulturen mit MSC wurde in Tumorzellen verschiedener Tumorentitäten (Mammakarzinom, Prostatakarzinom, CRC) eine vermehrte Expression von EMT-spezifischen Markern *in vitro* beobachtet (Martin et al. 2010; Karnoub et al. 2007). Im murinen Modell mit Koinjektion von Lungentumorzellen siedeln sich MSC an der Gefäßwand an und exprimieren endotheliale Marker sowie Wachstumsfaktoren, wodurch die Vaskularisation des Tumors gefördert wird (Suzuki et al. 2011). Bei Koinjektion mit CRC zeigte sich neben einer verstärkten Angiogenese eine gesteigerte Expression von mesenchymalen Markern in den Tumorzellen sowie eine erhöhte Invasivität des Tumors via membrangebundenem TGF β (Mele et al. 2014). Zu TAF differenzierte MSC fördern *in vitro* die EMT mittels löslicher Faktoren (Jing et al. 2012; Jung et al. 2013).

1.3 Die Rolle der Zelladhäsion in Tumorzellen

1.3.1 Physiologie der Zelladhäsionsproteine

Zelladhäsion beschreibt die Anheftung einer Zelle über Zelladhäsionsmoleküle an andere Zellen oder an die ECM. Sie ist essenziell für Zellkommunikation und -regulation zum Aufbau und Aufrechterhaltung von Geweben (Khalili und Ahmad 2015). Zell-Zell-Kontakte wie *adherens junctions*, *tight junctions* und Desmosomen stellen die Verbindung zwischen Zytoskelett der eigenen und der Nachbarzelle her (Perez-Moreno et al. 2003).

Zur Initiation von Zell-Zell-Kontakten dient die *adherens junction* (Nelson 2008). Sie beruht auf homophiler Interaktion eines Clusters von Cadherin/Catenin-Komplexen. In Epithelien bindet das transmembrane Molekül E-Cadherin direkt an intrazelluläres β -Catenin, welches über α -Catenin (α -Cat) mit dem Zytoskelett verbunden ist (Perez-Moreno et al. 2003).

α -Cat steuert so die Zelladhäsion und den Aufbau des Zytoskeletts. Am Ort eines Zell-Zell-Kontakts mit hoher Konzentration von Cadherin/Catenin-Komplexen an der Zellmembran dissoziiert α -Cat von β -Catenin und bildet Dimere, die das Aktin-Verzweigungsenzym Arp2/3 hemmen. Verzweigungen des Aktins sind assoziiert mit der Ausbildung von Lamellipodien und Zellmigration. Zusätzlich bündelt das α -Cat Dimer Aktin und stabilisiert damit den Zell-Zell-Kontakt (Nelson 2008; Scott und Yap 2006).

Eine weitere Rolle spielt α -Cat als Inhibitor des Wnt-Signalwegs im Zellkern: durch seine Fähigkeit β -Catenin zu binden, gelangt es zusammen mit β -Catenin in den Zellkern und inhibiert die Expression der von β -Catenin gesteuerten Transkriptionsfaktoren (Daugherty et al. 2014; McCrea und Gottardi 2016).

Der zweite Aspekt der Zelladhäsion ist der Zell-Matrix-Kontakt. Der Integrinrezeptor gehört zur Familie der transmembranen Zelloberflächenrezeptoren und ist heterodimer aus einer von 18 α - und einer von 8 β -Untereinheiten aufgebaut, die eine Gesamtheit von 24 bekannten Integrinrezeptoren bilden. Sie stellen die Verbindung der ECM mit dem Zellinneren her und erlauben eine Reaktion der Zelle auf das externe Milieu. Gleichzeitig passen intrazelluläre Signale die Affinität der Integrine zu Bestandteilen der ECM an. Integrine beeinflussen Proliferation, Überleben, Migration und Genexpression (Bianconi et al. 2016; Franceschi et al. 2015).

Eine der häufigsten Untereinheiten in Integrin-Heterodimeren ist β 1-Integrin (β 1-Int), welches mit 12 anderen α -Untereinheiten dimerisieren kann (Howe und Addison 2012). β 1-Int ist ein 87 kDa schweres Polypeptid, dessen Reifung durch Glykosylierung im Endoplasmatischen

Retikulum und Golgi-Apparat erfolgt und die ausschlaggebend für Aktivität und Affinität zu bestimmten Liganden der ECM ist (Salicioni et al. 2004; Shaikh et al. 2008).

1.3.2 Rolle der Zelladhäsionsproteine im Tumor

In malignen Tumoren ist die niedrige Expression von E-Cadherin und α -Cat mit einer schlechteren Prognose verbunden (Benjamin und Nelson 2008). Der Verlust der α -Cat Expression ist assoziiert mit einer gesteigerten Proliferation, Migration, Verlust der apikal-basolateralen Polarität und der Kontaktinhibition (Pokutta et al. 2008). Im CRC ist β -Catenin nur selten reduziert, vielmehr findet es sich vermehrt im Zellkern, was auf seine Bedeutung als Schlüsselmolekül im Wnt-Signalweg hinweist (Ghadimi et al. 1999).

Eine vermehrte Expression von β 1-Int findet sich häufig in Tumoren (Howe und Addison 2012). Die Überexpression von β 1-Int im CRC ist mit Proliferation und Dedifferenzierung verbunden (Song et al. 2014; Vassos et al. 2014). Von β 1-Int ausgehend werden im CRC verschiedene Signalwege zur Steuerung von Proliferation und Migration kontrolliert, darunter der Hedgehog-Signalweg (Song et al. 2015), Proteinkinase C und *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalweg (Rigot et al. 1998) und die Aktivierung der *focal adhesion kinase* (FAK), die bei der Ausbildung von Lamellipodien und Migration eine Rolle spielt (Pichard et al. 2001). In metastatischen Tumorzellen ermöglicht eine Aktivierung der FAK durch β 1-Int nach der Extravasation die Ausbildung von Mikrometastasen in der Lunge (Shibue und Weinberg 2009).

1.4 Die Rolle des Tumorstromas im kolorektalen Karzinom

1.4.1 Epidemiologie und Pathophysiologie des CRC

Weltweit erkrankten im Jahr 2018 geschätzt über 1,8 Millionen Menschen am kolorektalen Karzinom (CRC). Das sind 6,1 % aller Krebsneuerkrankungen, womit das CRC die dritthäufigste Krebsneuerkrankung ist. Die Mortalität des CRC liegt mit 9,2 % weltweit auf Platz 2 aller auf Krebs zurückzuführenden Todesfälle (Bray et al. 2018).

Ein Großteil der CRC entstehen aus Adenomen, der Vorläuferläsion des CRC. Adenome sind als intraepitheliale Neoplasie von der Basallamina begrenzt, die Entwicklung zum Karzinom erfolgt bei Überschreitung der Basalmembran. Mit steigender Größe, höhergradiger Dysplasie und villösem Wachstumstyp steigt das Risiko der Entartung (Risio 2010).

Bei dem klassischen Weg der Adenom-Karzinom-Sequenz (Kinzler und Vogelstein 1996) ist das Tumorsuppressorgen *adenomatous polyposis coli* (APC) mutiert (70-80 % von sporadischem CRC) und resultiert in einer konstitutiven Aktivierung des Wnt-Signalwegs: β -Catenin

akkumuliert im Zytoplasma und bildet einen Komplex mit Transkriptionsfaktoren aus der Gruppe der TCF/LEF Proteine. Im Zellkern bindet der Komplex an den Promotor von Transkriptionsfaktoren und aktiviert damit die Expression von Proto-Onkogenen wie cMYC und cyclinD1, die Proliferation und Wachstum steuern. Weiterhin zeigen 15 % der CRC eine *high-grade* Mikrosatelliteninstabilität, die zum Großteil durch den Verlust des MLH1-Gens aufgrund einer Hypermethylierung am Promoter hervorgerufen wird (Fearon 2011).

1.4.2 Genetische Heterogenität des CRC

Die Progression des CRC ist von einer Akkumulation von Mutationen aufgrund genomischer Instabilität geprägt. Im Verlauf entwickeln sich CRC zu inhomogenen Tumoren, die eine hohe Heterogenität in Genexpression und Mutationsstatus aufweisen (Markowitz und Bertagnoli 2009).

Eine häufige Mutation im CRC ist die des Tumorsuppressor-Gens TP53, welche in der Expression von inaktivem p53 resultiert. Das funktionelle p53 führt einen Zellzyklusarrest und Zelltod herbei, der Mechanismus kann durch multiple Stressoren aktiviert werden (Vazquez et al. 2008).

Onkogene Mutationen von RAS-Genen finden sich in 40 -50 % der CRC. Die Mutation des RAS-Onkogens betrifft beim CRC hauptsächlich die KRAS GTPase, welche als molekularer Schalter zur Übertragung von extrazellulären Signalen wie Wachstumsfaktoren dient. Es kommt zu einer dauerhaften Aktivierung der GTPase, die zu Beginn des MAPK-Signalwegs steht. Die Aktivierung des MAPK-Signalwegs führt zu einer Steigerung der Proliferation, des Überlebens sowie der Migration und Invasion (Maffei et al. 2019; Rajagopalan et al. 2002).

Sowohl der Verlust von funktionellem p53 als auch die Mutation von KRAS geht im CRC häufig mit einer Zunahme der Invasivität einher (Baker et al. 1990; Maffei et al. 2019).

Neben Veränderungen in der Genexpression von KRAS und TP53 sind auch Gene von Adhäsionsmolekülen wie E-Cadherin und α -Cat von der genetischen Heterogenität betroffen (Hou et al. 2016). Aktuelle Arbeiten zeigen auch einen Zusammenhang zwischen KRAS Signalwegen und E-Cadherin sowie α -Cat Expression (Murtaza et al. 2016).

1.4.3 Bedeutung des Tumorstromas im CRC

Wie in anderen malignen Tumoren nimmt auch im CRC das Tumorstroma eine wichtige Rolle ein. Aufgrund der Dynamik und des komplexen Zusammenspiels verschiedener Zellen sind viele Vorgänge noch unbekannt.

Am invasiven Rand des Tumors und damit in direkter Nachbarschaft zum Tumorstroma zeigte sich *in vivo* eine Dedifferenzierung und ein mesenchymaler Phänotyp der Tumorzellen durch eine Modulation der Expression von β -Catenin und E-Cadherin (Brabletz et al. 2001). Darüber hinaus wirkt sich das Mikromilieu auch auf die Expression von α -Cat aus (Plumb et al. 2009). Weiterhin konnten multiple Faktoren identifiziert werden, die als Teil des Stromas bei der Bildung von Metastasen in der Leber relevant sind (van den Eynden et al. 2013). Dazu zählt u.a. die Zusammensetzung der ECM (Zvibel et al. 1998).

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde eine Förderung des Wachstums von CRC-Zellen durch MSC festgestellt (Luetzkendorf et al. 2010). Dabei konnte ein β 1-Int abhängiger Mechanismus bei der spezifischen Wachstumsförderung der inhärent α -Cat defizienten CRC-Zelllinie HCT8 durch MSC identifiziert werden (Widder et al. 2016).

Inwiefern dieser Mechanismus generalisierbar ist und welche zellulären Mechanismen die Wachstumsförderung vermitteln, ist noch unklar. Die Klärung dieser Fragen könnte Ansätze zur Prävention von Metastasierung oder Tumorprogression bieten.

2 ZIELSTELLUNG

Aus dem Stand der Forschung leitet sich ab, dass das Wachstum des CRC durch das Tumorstroma geprägt wird. Weiterhin wird das Tumorwachstum sowie die Interaktion mit dem Tumorstroma von der α -Cat Expression im CRC reguliert. Die Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigen, dass MSC das Wachstum von α -Cat defizienten CRC *in vivo* fördern. Es liegen nur wenige Daten über die Mechanismen der von MSC-vermittelten Wachstumsförderung sowie zu deren Abhängigkeit von der Expression von α -Cat im CRC vor.

Hieraus leitete sich die folgende Hypothese für die vorliegende Dissertation ab:

Die Förderung des Tumorwachstums wird durch die Expression von α -Cat in CRC-Zellen in Abhängigkeit der heterogenen Charakteristika der CRC-Zellen beeinflusst.

Daraus ergaben sich die folgenden Ziele:

Zuerst sollte unter Nutzung der CRISPR/Cas9- oder shRNA-Methode ein Modell von CRC-Zellen mit heterogenem Mutationsstatus und defizienter α -Cat Expression generiert und charakterisiert werden.

Nachfolgend sollte die Interaktion dieser α -Cat defizienten CRC-Zellen mit MSC *in vitro* und *in vivo* im 3D-Sphäroidmodell und im Xenograftmodell untersucht werden. Dabei sollte auch der Einfluss der α -Cat Expression auf die Induktion einer EMT in CRC-Zellen und die TAF-Charakteristika in MSC betrachtet werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Zellen

Ursprung und Referenz bzw. *American Type Culture Collection* (ATCC)-Nummer der für die Arbeit verwendeten Zellen sind im Folgenden aufgelistet.

Tab. 1: Verwendete Zellen.

Zelle	Ursprung	Referenz
MSC	Humane primäre MSC, isoliert aus KM-Aspiraten	Mueller et al. 2006
DLD1	Humane CRC-Zelllinie	ATCC Nr. CCL-221
HT29	Humane CRC-Zelllinie	ATCC Nr. HTB-38
HCT8	Humane CRC-Zelllinie	ATCC Nr. CCL-244
β 1-Int kd HCT8	Humane CRC-Zelllinie mit β 1-Int shRNA-kd	Widder et al. 2016
Colo320DM	Humane CRC-Zelllinie	ATCC Nr. CCL-220
β 1-Int kd Colo320DM	Humane CRC-Zelllinie mit β 1-Int shRNA-kd	Widder et al. 2016

Die CRC-Zelllinien wurden, soweit nicht anders beschrieben als Wildtyp (WT) eingesetzt. Im Rahmen der Arbeit wurden Klonkulturen der CRC-Zelllinien mit einem α -Cat kd generiert. Dementsprechend wurden, wie im Weiteren beschrieben α -Cat exprimierende Kontrollen hergestellt.

3.1.2 Allgemeine Chemikalien

Übliche Chemikalien und Biochemikalien wurden von Carl Roth (Karlsruhe; DE) und Sigma Aldrich (München; DE) bezogen. Spezifische Kits oder Reagenzien sind unter den jeweiligen Methoden gesondert genannt.

3.1.3 Antikörper

Die in der Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper sind unter Angabe des Herstellers, ihrer Anwendung und der eingesetzten Konzentration bzw. Verdünnung in Tabelle 2 und 3 zu finden.

Tab. 2: Primäre Antikörper.

Antikörper (Spezies)	Klon/Bestellnr.	Hersteller	Applikation	Konzentration
anti α -Cat (<i>mouse</i>)	21620	BD Biosciences (Heidelberg; DE)	Western-Blot	1:500
anti α -Cat (<i>rabbit</i>)	2081	Sigma Aldrich (Darmstadt; DE)	Western-Blot	1:1000
anti β 1-Int (<i>mouse</i>)	P5D2	Abcam (Cambridge; GB)	Blockierung <i>in vitro</i>	10 μ g/ml
anti GAPDH (FL-335) (<i>rabbit</i>)	D3015	Santa Cruz Biotechnologies (Heidelberg; DE)	Western-Blot	1:1000
anti α -Tubulin (<i>mouse</i>)	DM1A	Sigma Aldrich	Western-Blot	1:5000
anti CD 29 PE (<i>mouse</i>)	MAR4	BD Biosciences (Heidelberg; DE)	FACS	1/1
anti CD 105 FITC (<i>mouse</i>)	266	BD Biosciences (Heidelberg; DE)	FACS	1/1
anti CD 90 PE (<i>mouse</i>)	5E10	BD Biosciences (Heidelberg; DE)	FACS	1/1
Simultest Control γ 1/ γ 1 FITC/PE (<i>mouse</i>)	X40	BD Biosciences (Heidelberg; DE)	FACS	1/1

Tab. 3: Sekundäre Antikörper.

Antikörper (Spezies)	Hersteller	Applikation	Konzentration
anti-rabbit IgG-HRP (<i>goat</i>)	Santa Cruz Biotechnologies	Western-Blot	1:5000
anti-mouse IgG-HRP (<i>goat</i>)	Santa Cruz Biotechnologies	Western-Blot	1:5000

3.1.4 Oligonukleotide

Die als Primer eingesetzten Oligonukleotide wurden kommerziell synthetisiert oder lagen der Arbeitsgruppe vor. Anhand der mRNA-Sequenzeinträge (Referenz) der *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) Datenbank „Entrez Nucleotide“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) wurden die Sequenzen generiert. Sie sind der Tabelle 4 unter Angabe der Basenpaarlänge (bp) des entstehenden Produkts zu entnehmen.

Tab. 4: Verwendete Oligonukleotide.

Gen	Sequenz	Referenz	bp
Alas-1	5'-CTGCAAAGATCTGACCCCTC-3' 5'-CCTCATCCACGAAGGTGATT-3'	NM_000688	136
β 1-Int	5'-GCCGCGCGGAAAAGATGAAT-3' 5'-TGCTGTTCCCTTGCTACGGT-3'	NM_002211	323
α -Cat	5'-GGGGATAAAATTGCGAAGGAGA-3' 5'-GTTGCCTCGCTTCACAGAAGA-3'	NM_001903	144
SMA	5'-CGGTGCTGTCTCTCTATGCC-3' 5'-AGCAGTAGTAACGAAGGAATAGCCA-3'	NM_001141945	200
Calponin	5'-CTGTCAGCCGAGGTTAAGAAC-3' 5'-GAGGCCGTCCATGAAGTTGTT-3'	NM_001299	123
CD 105	5'-TGCACTTGGCCTACAATTCCA-3' 5'-AGCTGCCCACTCAAGGATCT-3'	NM_001114753	107
CTGF	5'-CAGCATGGACGTTCTGTCTG-3' 5'-AACCACGGTTTGGTCCTTGG-3'	NM_001901	115
E-Cadherin	5'-AACAGCAAAGGGCTTGGATTTTG-3' 5'-GCAGTGTCTCTCCAAATCCGA-3'	NM_004360	279
FAP	5'-CCTCTGCTGTGCTTGCCTTA-3' 5'-CCGATCAGGTGATAAGCCGT-3'	NM_004460	290
GAPDH	5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3' 5'-GGCTGTTGCATACTTCTCATGG-3'	NM_002046	197
ITGA11	5'-GACCTACATGGACATCGTCATTG-3' 5'-ATCTTCGCCATACTGCACAAC-3'	NM_001004439	148
COL1A1	5'-CGATGGATTCCAGTTCGAGTAT-3' 5'-GACAGTGACGCTGTAGGTGAAG-3'	NM_000088	244
COL2A1	5'-AAAGAGGAGCCAAAGGGCCTAA-3' 5'-GGAGCACCAAGAAGACCCTGAG-3'	NM_000089	391
COL3A1	5'-GAAATTCTGCCATCCTGAACTC-3' 5'-CAAACGTGTTTCTTCTCAGCAC-3'	NM_000090	186
MRTF-A	5'-GGAATTGCACTTTGTTCTGAG-3' 5'-ATCGAGGAAGTCTGTGGAGAAG-3'	NM_020831	166
N-Cadherin	5'-ACA GTG GCC ACC TAC AAA GG-3' 5'-CCG AGA TGG GGT TGA TAA TG-3'	NM_001792	201

Snail	5'-ACTGCAACAAGGAATACCTCAG-3' 5'-GCACTGGTACTTCTTGACATCTG-3'	NM_005985	242
Slug	5'-TGTGACAAGGAATATGTGAGCC-3' 5'-TGAGCCCTCAGATTTGACCTG-3'	NM_003068	203
TNC	5'-CGGAGAATGCCTTTGACAGC-3' 5'-TCTGGGGTGGCATCTGAAAC-3'	NM_002160	247
Twist	5'-GGA GTC CGC AGT CTT ACG AG-3' 5'-TCT GGA GGA CCT GGT AGA GG-3'	NM_000474	201
Vimentin	5'-CCCTCACCTGTGAAGTGGAT-3' 5'-TCCAGCAGCTCCTGTAGGT-3'	NM_003380	241

3.1.5 Lentivirale shRNA-Partikel

Die Durchführung eines stabilen kd in Tumorzellen erfolgte mittels lentiviraler Partikel des Systems MISSION® - *Lentiviral Transduction Particles* von Sigma-Aldrich. Für den kd des α -Cat Gens (CTNNA1) wurden 5 shRNA-Sequenzen sowie eine Kontroll-Sequenz (*non-target* im Säuger genom) getestet. Die Bestellnummern (TRCN) sowie die Sequenz der Bindestelle auf der mRNA für einen kd von α -Cat sind in Tabelle 5 angegeben.

Tab. 5: Verwendete lentivirale shRNA-Sequenzen für den kd von α -Cat.

Klon/TRCN-Nr.	Sequenz	Vektor
234531	CCGGTAGTAAAGGGCCCTCTAATAACTCGAGTTATTAGAGGG CCCTTACTATTTTTG	TRC2-pLKO- puro
234532	CCGGGACTTAGGAATCCAGTATAAACTCGAGTTTATACTGGAT TCCTAAGTCTTTTTG	
234533	CCGGCCTGATGTCGCAGCCTATAAGCTCGAGCTTATAGGCTGC GACATCAGGTTTTTG	
234534	CCGGCCCTCTGTCCTCAGGTTACTCGAGTAATAACCTGAG GACAGAGGGTTTTTG	
234535	CCGGCAGTGTCTCGATGCCATAATCCTCGAGGATTATGGCATC GAGACACTGTTTTTG	
Kontrolle SHC202	<i>non-mammalian shRNA</i> CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTC- GAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGTTTT	TRC2-pLKO- puro

3.1.6 DNA-Zielsequenz in CRISPR/Cas9

Es erfolgte außerdem der Einsatz der CRISPR/Cas9-Methode zur Elimination von α -Cat. Durch Schneiden der DNA an der Zielsequenz wurde ein *knock out* von α -Cat in den Tumorzellen durchgeführt. Die Sequenz der *guide*-Ribonukleinsäure (gRNA) zum Auffinden der Zielgens wurde mithilfe des *CRISPR gRNA Design tool* von ATUM (Kalifornien; US) ermittelt. Als Kontrolle wurde eine *Scramble*-gRNA verwendet. Die Sequenz der gRNA und der Vektor von Addgene (Teddington; GB) sind in Tabelle 6 angegeben.

Tab. 6 Verwendete CRISPR/Cas9-gRNA-Sequenzen für den *knock out* von α -Cat.

gRNA-Nr.	Sequenz	Vektor
1	5'-CACCGCGCACAGCTGGTGAATTTCG-3' 5'-AAACCGAATTGCACCAGCTGTGCGC-3'	lentiCRISPR v2 (Plasmid #52961)
2	5'-CACCGTTGCACCAGCTGTGCGGTCC-3' 5'-AAACGGACCGCACAGCTGGTGCAAC-3'	
3	5'-CACCGGAGAGTTCCCGTACCTGTGT-3' 5'-AAACACACAGGTACGGGAACTCTCC-3'	
<i>Scramble</i>	5'-CACCGTCGATCGTCAAGCAGATCG -3' 5'-AAACCGATCTGCTTGACGATCGAC-3'	

Im Folgenden werden die Tumorzellen mit defizitärer α -Cat Expression als α -Cat kd Zellen bezeichnet, unabhängig von der Methode der Genausschaltung.

3.1.7 Medien, Puffer und Lösungen

Wachstumsmedium für CRC-Zelllinien

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

Wachstumsmedium für MSC

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

Kokulturmedium für Kultivierung von CRC-Zellen mit MSC

DMEM (Gibco über Life Technologies), 1 % FKS (Biochrom AG), 1 % Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG)

Weitere Medien, Puffer und Lösungen für die Zellkultur

PBS	10x Stammlösung w/o Ca ²⁺ und Mg ²⁺ (Sigma Aldrich)
Trypsin-EDTA	0,5 g/L Trypsin, 0,2 g/L EDTA (Sigma Aldrich)
Polybrene	8 mg/mL Stammlösung in destilliertem H ₂ O (Sigma Aldrich)
Puromycin	Puromycin-Dihydrochlorid, 10 mg/mL Stammlösung (Gibco)

Weitere verwendete Medien und Puffer

TCA	Trichloressigsäure (Carl Roth), 10 % w/v in destilliertem H ₂ O
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ * KH ₂ PO ₄ , pH 6,8 (jeweils Carl Roth)
PBST	PBS + 0,1 % TWEEN-20 (Sigma-Aldrich)
destilliertes H ₂ O	„Aqua B. Braun“, steril (B.Braun, Melsungen; DE)
RIPA-Lysepuffer	100 mM NaCl, 50 mM Tris, 0,5 % Desoxycholat, 0,5 % SDS, 0,5 % Igepal (jeweils Carl Roth); vor Gebrauch zugeben: 0,1 mM Dithiothreitol (Carl Roth), 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (Carl Roth), 0,4 U Protease-Inhibitor (Sigma Aldrich), 1x Phosphatase-Inhibitor (Thermo Scientific, Dreieich; DE)
Protein-Ladepuffer	10 % Glycerol, 2 % SDS; 5 % β-Mercaptoethanol, 0,005 % Bromphenolblau in 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 (jeweils Carl Roth)
Western-Blot-Laufpuffer	1x Rotiphorese SDS Page (10x Stammlösung; Carl Roth)
Western-Blot Transferpuffer	1x Rotiphorese SDS Page, 20 % Methanol (Sigma Aldrich)
SRB	Sulforhodamin B; 0,4 % w/v in 1 % Essigsäure (Sigma Aldrich)

3.1.8 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Die Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Carl Roth, Eppendorf (Hamburg; DE) und VWR International (Darmstadt; DE) bezogen. Ausnahmen sind bei den jeweiligen Methoden aufgeführt.

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

Die eingesetzten Geräte (Zentrifugen, *laminar-flow*-Werkbänke, Inkubatoren etc.) entsprachen den allgemeinen Standards und sind außer im Rahmen methodenspezifischer Ausnahmen nicht weiter aufgeführt.

3.2 Herkunft der MSC

Die Gewinnung und Isolierung humaner MSC erfolgte wie vorher beschrieben nach etablierten Protokollen (Mueller et al. 2006). Die MSC wurden aus Knochenmark (KM)-Aspiraten freiwilliger Spender nach ausführlicher Aufklärung und bei vorliegendem schriftlichem Einverständnis durch ärztliche Mitarbeiter der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, gewonnen. Die Isolierung erfolgte durch die Arbeitsgruppe des hämatologisch-onkologischen Forschungslabor, Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, mittels Dichtegradientenzentrifugation (Böyum 1968) des Aspirates. Anschließend wurde die aus mononukleären Zellen bestehende Interphase in Plastikgefäßen zur Adhärenzselektion kultiviert. Nach 24 h wurden die nicht-adhären Zellen durch Waschen mit PBS abgespült. Ein positives Ethikvotum der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg lag vor („Untersuchung humaner adulter mesenchymaler Stammzellen in vitro und im Tiermodell II“ Antragsfassung vom 03.12.2006; Version Nr. 2; Amendement 1; Stand: 18.03.2010).

3.3 Kultivierung von CRC-Zelllinien und MSC

Zellkulturarbeiten wurden unter steriler Atmosphäre an *laminar-flow*-Werkbänken mit auf 37°C vorgewärmten Medien und Lösungen durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte im jeweiligen Wachstumsmedium unter Standardbedingungen (37°C, 5 % CO₂, Luftfeuchtigkeit ≥ 95 %). Der Medienwechsel bei CRC-Zelllinien erfolgte jeden bis jeden zweiten Tag. Bei Erreichen einer Konfluenz von 80-100 % wurden die Zellen enzymatisch durch Trypsin-EDTA abgelöst und passagiert.

Der Medienwechsel bei der Kultivierung von MSC erfolgte alle 3 Tage. Bei Erreichen einer Konfluenz von 50 % erfolgte die Passagierung mittels Trypsin-EDTA.

3.4 Generierung eines stabilen α -Catenin *knock down* in CRC-Zellen

3.4.1 Herstellung einer α -Catenin Defizienz mittels shRNA-Partikel

Der kd von α -Cat in den CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 wurde mithilfe kommerziell erhältlicher lentiviraler shRNA-Partikel (siehe Tab. 5) durchgeführt. Neben der shRNA gegen das Zielgen verfügen diese über eine Resistenz gegen Puromycin, sodass die transduzierten Zellen selektiert werden konnten. Es wurden 5 unterschiedliche shRNA-Sequenzen und 1 Kontroll-Sequenz (siehe Abschnitt 3.1.5) kommerziell erworben.

Der WT der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 wurde initial in 12-*well*-Platten mit 500.000 Zellen pro *well* gesetzt und bis zu einer Konfluenz von etwa 60 % kultiviert. Die Transduktion erfolgte unter Zugabe der viralen Partikel und 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Polybrene in das Wachstumsmedium für CRC-Zellen. Für jede vorhandene shRNA-Sequenz erfolgte eine separate Transduktion. Nach 24 h wurde das Medium gegen frisches Wachstumsmedium ausgetauscht. Nach 48 h wurden die transduzierten Zellen passagiert und weiter in einer 6-*well*-Platte kultiviert. Die Selektionierung erfolgte erstmalig durch Zugabe von 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Puromycin über 96 h. Nach Kultivierung in 25 cm^2 -Zellkulturflaschen erfolgte die erneute Zugabe von 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Puromycin über 48 h. Die Mischpopulationen wurden mittels qPCR und Western-Blot auf die Effizienz des kd getestet (Daten nicht gezeigt). Pro Zelllinie wurde je eine Mischpopulation mit einem effizienten kd ausgewählt und kloniert. Bei der Linie DLD1 handelte es sich um den kd mittels der shRNA 234533, bei HT29 um die shRNA 234534 (TRCN-Nr., siehe Tab. 5). Zur Generierung von Einzelzellen wurden die transduzierten CRC-Zellen mittels limitierter Verdünnung (1 Zelle/*well* einer 96-*well*-Platte) ausplattiert. Die Klonkulturen wurden nach 14 Tagen Kultivierung mittels mikroskopischer Beurteilung vorausgewählt und expandiert.

Es wurden 20 Klonpopulationen je Zelllinie mittels Western-Blot und quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) auf die Expression von α -Cat analysiert und daraufhin selektioniert. Jeweils 2 Klonpopulationen mit effektivem kd von α -Cat pro Zelllinie wurden anschließend in Wachstumsverhalten, Morphologie und 3D-Kultur untersucht.

Als Kontrollen dienten 2 Klonkulturen je CRC-Zelllinie, im Folgenden als Ctrl bezeichnet. Hierfür wurden analog zum bereits beschriebenen Vorgehen die CRC-Zellen mit lentiviralen Partikeln der shRNA-Kontrollsequenz transduziert (siehe Tab. 5), kloniert und anschließend selektioniert.

3.4.2 Herstellung einer α -Catenin Defizienz mittels CRISPR/Cas9

Des Weiteren wurde ein kd von α -Cat in den CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 mithilfe von CRISPR/Cas9 gRNA-Partikeln (siehe Tab. 6) durchgeführt. Neben der Sequenz gegen das Zielgen

verfügen diese über eine Resistenz gegen Puromycin, sodass die transduzierten Zellen selektiert werden konnten. Es standen 3 CRISPR/Cas9 gRNA-Sequenzen und eine unspezifische Kontrollsequenz (siehe Abschnitt 3.1.6) zur Verfügung.

Das Vorgehen bei der Transduktion entsprach dem für die Generierung eines kd mittels shRNA (siehe vorherigen Abschnitt). Sowohl bei der CRC-Zelllinie DLD1 als auch HT29 wurden die mittels gRNA 3 transduzierten Tumorzellen, sowie mittels *Scramble*-gRNA als Kontrolle, zur Klonierung ausgewählt (siehe Tab. 6). Die Klonierung, Analyse und anschließende Selektion von 2 Klonpopulationen mit effektivem α -Cat kd sowie 2 Kontrollen pro Zelllinie erfolgte wie im vorherigen Abschnitt beschrieben.

Wo nicht anders angegeben, sind die dargestellten Ergebnisse das Resultat aus Experimenten mit 4 selektionierten α -Cat kd bzw. Kontroll-Klonkulturen je Zelllinie, davon 2 mittels shRNA- und 2 mit CRISPR/Cas9-Methode transduziert.

3.5 Analyse der Wachstumskinetik *in vitro*

Um ein unverändertes Wachstumsverhalten nachzuweisen, wurde die Proliferation der klonierten CRC-Zellen auf zwei Weisen gemessen.

3.5.1 Messung der Proliferation der CRC-Zellen *in vitro*

Es wurde eine anfängliche Zellzahl von 40.000 Zellen/cm² (1x10⁶ Zellen je 25 cm² Flasche) gesetzt. Bei 80 % Konfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen und Trypsin-EDTA abgelöst. Die Gesamtzahl an Zellen wurde mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt. Anschließend wurden erneut 40.000 Zellen/cm² ausplattiert. Die Populationsverdopplung (PD) und die Populationsverdopplungszeit (PDT in Tagen) wurde für jede Passage mit folgenden Formeln (Baxter et al. 2004) berechnet:

$$PD = \frac{\lg\left(\frac{\text{Gesamtzellzahl zum Zeitpunkt der Passage}}{n \text{ Zellen initial gesetzt}}\right)}{\lg 2}$$

$$PDT = \frac{n \text{ Tage zwischen den Passagen}}{\text{zugehörige PD}}$$

Der Mittelwert (MW) der PDT von CRC-Zellen wurde über mindestens 4 Passagen und ≥ 9 Tage ermittelt.

3.5.2 Wachstumsanalyse mittels Sulforhodamin B-Assay

Der Sulforhodamin B (SRB)-Assay beruht auf dem Prinzip, dass der Farbstoff SRB bei saurem pH-Wert stabil an Proteine bindet, während ungebundener Farbstoff ausgewaschen wird (Skehan et al. 1990). Unter basischem pH-Wert wird der gebundene Farbstoff anschließend freigesetzt und die optische Dichte (OD) photometrisch ermittelt. Die OD korreliert innerhalb eines bestimmten Bereiches linear mit der Proteinmenge und somit mit der Zellzahl im *well*.

Um ein uneingeschränktes Wachstum über die gesamte Versuchsdauer hinzuerhalten, wurden die CRC-Zellen mit ansteigender Zelldichte (500-1000-2000 Zellen/*well*) pro Spalte (8-fach Bestimmung pro eingesetzte Zellzahl) in 5 identische 96-*well*-Platten gesetzt. Nach 24, 48, 72, 96 und 120 h wurde je 1 Platte abgestoppt und mit 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 10 % Trichloressigsäure (TCA) für mindestens 2 h fixiert. Die Platten wurden 5-mal mit destilliertem H₂O gewaschen (Plate Washer 96 PW/ SLT 96SW, Tecan, Männedorf, CH) und mit 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 0,4 % SRB-Lösung für 45 min bei Raumtemperatur (RT) gefärbt. Das überschüssige SRB wurde 5-mal mit 1 % Essigsäure in destilliertem H₂O gespült und die Platten bei RT getrocknet. Am nächsten Tag wurde das gebundene SRB mit 10 mM Tris (100 $\mu\text{L}/\text{well}$) innerhalb von 30min gelöst und die OD bei 570 nm ermittelt (Mikroplatten-Reader, SpectraFluor Plus, Tecan). Eine Spalte ohne Zellen, die der gesamten Prozedur unterzogen wurde, diente als Hintergrundwert. Pro Spalte wurde der MW der OD-Werte abzüglich Hintergrundwert gebildet. Bei einer Anfangszellzahl von 1000 Zellen/*well* zeigte sich ein uneingeschränktes Wachstum über die gesamte Versuchsdauer. Der MW der OD-Werte von 4 biologisch unabhängigen Experimenten mit 1000 Zellen/*well* wurde gegen die Zeit aufgetragen.

3.6 Kultivierung im 3D-Sphäroidmodell

3.6.1 Prinzip des 3D-Sphäroidmodells und CRC-Zellen in der Sphäroidkultur

Das 3D-Kulturmodell wurde in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe angewendet (Widder et al. 2016). Zur Generierung von 3D-Kulturen wurden die Platten mittels *Liquid-Overlay*-Methode nach Yuhas modifiziert (Yuhas et al. 1977). Zur Herstellung einzelner Sphäroide von reproduzierbarer Größe wurden 96-*well*-Platten verwendet. Diese wurden mit 0,7 % Agarose (Seakem GTG in PBS, Lonza) beschichtet und direkt für die Versuche eingesetzt, da nur eine kurzzeitige Lagerung möglich war. Pro *well* wurden Tumorzellen mit einer Zellzahl von 3000 in einem Volumen von 100 μL Wachstumsmedium für CRC-Zellen gesetzt und unter Standardbedingungen kultiviert.

3.6.2 Herstellung von MSC-gemischten 3D-Sphäroidkulturen

In den 3D-Sphäroidkulturen sollte der Einfluss von MSC auf die α -Cat defizienten CRC-Zellen bei der Ausbildung einer Tumorarchitektur untersucht werden. Dafür wurden CRC-Zellen und MSC im Verhältnis 4:1 (3000 CRC-Zellen mit 750 MSC) gemischt, in 100 μ L Wachstumsmedium für CRC-Zellen pro *well* gesetzt und in der Sphäroidkultur unter Standardbedingungen kultiviert. Als Kontrollen dienten Sphäroidkulturen von MSC-gemischten Kontroll-CRC-Zellen. Nach 24 und 48 h wurden die 3D-Kulturen lichtmikroskopisch beurteilt und fotodokumentiert.

Zur Beurteilung der Relevanz von β 1-Int in Sphäroidkulturen von CRC-Zellen und MSC wurden β 1-Int Antikörper dem Wachstumsmedium direkt beim Ansetzen der Kultur zugegeben (siehe Tab. 2).

3.7 Kultivierung in 2D-Kokulturen

Zur Untersuchung einer EMT und Differenzierung zu TAF bei der Interaktion von MSC und CRC-Zellen wurden direkte Kokulturen in 75 cm² Zellkulturflaschen durchgeführt. Die α -Cat kd CRC-Zellen wurden mit MSC im Verhältnis 1:1 (je $1,2 \times 10^6$ Zellen) in 20 mL Kokulturmedium gesetzt. Als Kontrollen dienten ungemischte CRC und MSC-Zellen in Kokulturmedium und Kokulturen der Kontroll-CRC-Zellen mit MSC. Nach 72 h wurden die Zellen mittels Trypsin-EDTA geerntet und weiterverarbeitet.

3.8 Durchflusszytometrische Analyse und Sortierung

3.8.1 Analyse der Oberflächenexpression von β 1-Int in CRC-Zellen

Um das Vorhandensein von β 1-Int an der Zelloberfläche von α -Cat kd Zellen zu überprüfen, wurde eine durchflusszytometrische Untersuchung durchgeführt: Nach dem Lösen der Zellen mit Trypsin-EDTA wurden sie in ein Rundboden-Röhrchen (BD Bioscience) überführt. Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde mit 10 μ L des PE-markierten β 1-Int Antikörpers (siehe Tab. 2) gelöst und für 15 min bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 2 mL PBS abgestoppt und die Suspension wurde 5 min bei 1300 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 mL PBS resuspendiert. Am Durchflusszytometer (FACSCalibur) wurden die Zellen mit der Software CellQuest (BD Bioscience) analysiert. Die Einstellungen des Geräts wurden anhand der Isotypkontrolle (vgl. Tabelle 2) angepasst und für die jeweilige Messreihe beibehalten (Daten nicht gezeigt).

3.8.2 Fluoreszenz-markiertes Sortieren von MSC und CRC

Um eine möglichst genaue Sortierung anhand der Oberflächenmarker von MSC und CRC zu gewährleisten, wurden die MSC-Oberflächenmarker CD 90 und CD 105 auf den Zellen wie oben beschrieben analysiert: Es zeigte sich eine deutliche Expression beider Oberflächenmarker auf den MSC. Die modifizierten CRC-Zellen wiesen keine Oberflächenexpression von CD 105 auf (Daten nicht gezeigt).

Die Vorbereitung der Zellen auf die Sortierung erfolgte wie in 3.8.1 beschrieben. Die Zellen wurden mit dem FITC-markierten CD 105 Antikörper inkubiert. Die Zellsortierung anhand der FITC-Fluoreszenz erfolgte in Kooperation mit dem Zentrum für medizinische Grundlagenforschung (Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) am FACS Aria II SORP (BD Biosciences). Dabei konnte ein Reinheitsgrad der Zellen von 98 % erreicht werden. Die so gewonnenen Zellen wurden weiter via qPCR analysiert.

3.9 Western-Blot Analyse

Zur Gewinnung von Protein wurden adhärenente Zellen aus Zellkulturflaschen mit Trypsin-EDTA abgelöst und mit PBS gespült. Das Zellpellet wurde in RIPA-Puffer lysiert und das Lysat durch Scheren mit einer 27G-Kanüle (BD Biosciences) oder Zugabe von Benzonsase (Endkonzentration 0,12 %) homogenisiert. Nach Inkubation der Proben für 45 min auf Eis wurden sie bei 13.000 rpm 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der proteinreiche Überstand wurde ohne Störung des Pellets in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Die Proteinkonzentration wurde anhand der kolorimetrischen Methode nach Bradford bestimmt. Dafür wurden Proben der gewonnenen Proteinlösung mittels kommerziell erhältlicher Färbelösung (Bio-Rad Protein Assay; Bio-Rad Laboratories, München; DE) gefärbt und die Absorption nach Angaben des Herstellers bei 595 nm gemessen (BioPhotometer D30; Eppendorf).

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (System: Mini Protean Tetra Cell; BioRad). Pro Slot wurden 10 µg Protein eingesetzt, welches vorher mit Proteinladepuffer bei 95°C denaturiert wurde. Die Proteine wurden auf eine Nitrocellulose-Membran (0,45 µm; GE Healthcare über A. Hartenstein Laborbedarf, Würzburg; DE) bei 4°C mittels Tank-Blot nach Angaben des Herstellers (Mini Trans Blot Cell; BioRad) transferiert. Zur Überprüfung des Transfers wurde die Membran anschließend mit Ponceau S (ready to use; BioRad) gefärbt. Anschließend wurde die Membran in 5 % Trockenmilch in PBST bei RT für 1 h inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Weiterhin folgte die Inkubation der Membran mit dem jeweiligen primären Antikörper (siehe Tab. 2) für 2 h bei RT

bzw. über Nacht bei 4°C. Danach wurde die Membran 3x 5 und 2x 10 min mit PBST gespült, anschließend folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (siehe Tab. 3) in PBST für 1 h bei RT. Erneut wurde die Membran 3x 5 min mit PBST gewaschen. Die Immunkomplexe wurden mittels Chemilumineszenz (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent; GE Healthcare, Chalfont St. Giles, GB) nach Angaben des Herstellers auf Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare) am Gerät ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) detektiert.

3.10 RNA-Isolation und quantitative *real-time* PCR

Die Methode der qPCR wird zur Quantifizierung der Genexpression auf transkriptioneller Ebene genutzt.

3.10.1 Isolierung von RNA und reverse Transkription

Zuerst wird die gesamte RNA aus den Zellen isoliert und mittels reverser Transkription in *complementary*-Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben.

Zur RNA-Isolierung wurden die trypsinisierten Zellen bei 1300 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 mL TriFast (Avantor) lysiert und für 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 250 µL Chloroform, 3-minütiger Inkubation und erneuter Zentrifugation mit 13.000 rpm für 15 min bei 4°C wird die obere RNA-haltige Phase abgenommen. Bei Zugabe eines äquivalenten Volumens von Isopropanol und Inkubation für mindestens 2 h bei -20°C erfolgte die Fällung der RNA. Nach anschließender Zentrifugation mit 13.000 rpm für 15 min bei 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet zweifach mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach ausreichender Lufttrocknung wurde das Pellet in DECP Wasser gelöst. Zur Reduktion möglicher Kontamination mit DNA wurde ein kommerziell erhältliches Kit (DNA-free Kit; Applied Biosystems, Darmstadt, DE) nach den Angaben des Herstellers mit DNase I verwendet. Die Quantifizierung und Abschätzung der Reinheit der isolierten RNA wurden photometrisch am Gerät BioPhotometer D30 (Eppendorf) durchgeführt. Hierfür wurde die OD der isolierten RNA bei 260 und 280 nm gemessen. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/mL. Die Verunreinigung durch Proteine ließ sich mittels des Quotienten aus OD₂₆₀/OD₂₈₀ abschätzen. Bei einem Wert von OD₂₆₀/OD₂₈₀ ≥ 2 wurde die RNA für nachfolgende Analysen verwendet.

Die reverse Transkription von mRNA in cDNA erfolgte mittels kommerziell erhältlichen Kit nach den Angaben des Herstellers (GeneAmp®RNA, RNA PCR Kit; Applied Biosystems über Life Technologies) in einem Thermoblock (T-Gradient; Biometra, Göttingen; DE). Es wurden 1 µg RNA in einem Endvolumen von 20 µL eingesetzt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Zugabe

von reverser Transkriptase (RT-Kontrolle). Die Reaktion lief bei folgendem Programm: initiale Extension 5 min bei 25°C, reverse Transkription 30 min bei 42°C und Denaturierung 5 min bei 99°C.

3.10.2 Quantitative *real-time* PCR

Mit Primern für das zu analysierende Gen wird die cDNA über eine PCR amplifiziert und nach jedem Zyklus quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgt über einen Farbstoff, der in die doppelsträngige DNA interkaliert und dadurch fluoresziert. Je nach Menge der vorhandenen doppelsträngigen DNA steigt proportional die Intensität des Fluoreszenzsignals und desto früher wird es messbar. Der C_T -Wert (*threshold cycle*) ist definiert als der PCR-Zyklus, bei dem die Intensität der Fluoreszenz eine gewählte Schwelle überschreitet.

Der Ansatz für die Amplifizierung in der qPCR wurde mittels kommerziell erhältlichem SYBR-Green I Mastermix Kit nach Angaben des Herstellers generiert (GoTaq[®] qPCR Mastermix, Promega, Mannheim; DE). Es wurden 0,75 µL cDNA in einem Endvolumen von 12,5 µL mit je 0,5 µM der jeweiligen Primer (siehe Tab. 4) eingesetzt. Ansätze mit H₂O (Test auf Kontamination in den Reagenzien) bzw. der -RT-Kontrolle (Test auf genomische DNA in den Proben) dienten als *no-template* Kontrollen.

Die PCR erfolgte mit dem System CFX96 unter Verwendung der Software CFX Manager 3.1 (beides BioRad). Folgendes Programm wurde verwendet: Initial erfolgte die Denaturierung 3 min bei 95°C, folgend die Denaturierung 15 s bei 95°C, Primer-*annealing* 20 s bei 60°C, Synthese 20 s bei 72°C, 40-fache Wiederholung der vorherigen Schritte. Anschließend wurde eine Schmelzkurve im Temperaturbereich von 72 - 97°C aufgenommen.

Die Genexpression wurde mittels der komparativen C_T Methode relativ quantifiziert. Hierbei wurde der C_T -Wert der eingesetzten cDNA mit dem C_T -Wert zweier nicht regulierter Gene (*housekeeping*-Gene) verglichen. Die eingesetzten *housekeeping*-Gene für CRC-Zellen und MSC waren GAPDH und Alas-1. Die Expression des untersuchten Gens einer Probe im Vergleich zu einer Referenzprobe wurde gemäß der Formel $2^{\Delta\Delta C_T}$ berechnet. Bei nicht nachweisbarer RNA wurde der Wert 0 angenommen.

Für jedes Experiment wurde eine interne Wiederholung der reversen Transkription und qPCR durchgeführt und der MW berechnet. Wo nicht anders angegeben sind die dargestellten Ergebnisse MW aus 4 biologisch unabhängigen Experimenten basierend auf den genetisch veränderten und klonierten Zellpopulationen.

3.10.3 Elektrophorese von DNA

Zum Nachweis der mRNA-Neuexpression einzelner EMT-Marker wurde eine Elektrophorese auf 2%igem Agarose-Gel durchgeführt. Hierfür wurden 4 gr Agarose in 200 ml TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (Sigma-Aldrich) durch kurzes Aufkochen gelöst und mit 20 µl Ethidiumbromid (1:20.000) versetzt. Das flüssige Gel wurde in eine Kammer gegossen, härtete für 20 min aus und wurde anschließend in der mit TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer platziert. Die amplifizierte DNA wurde im Verhältnis 6:1 mit DNA-Ladepuffer vermischt und neben einem DNA-Marker (GeneRuler 50 bp DNA-Leiter, Thermo Scientific) aufgetragen. Es erfolgte die Auftrennung bei 1-5 Volt pro cm Elektrodenabstand und im Anschluss die Auswertung und Fotografie unter Anregung mittels UV-Licht (BioRad).

3.11 Tierversuche

Alle Tierversuche wurden freundlicherweise von Fr. Dr. Jana Lützkendorf gemäß institutionellen Bestimmungen durchgeführt. Eine Genehmigung der tierexperimentellen Versuche zur Untersuchung des Einflusses von MSC auf das Wachstum von CRC lag vor (Nr. 42502-2-1477 MLU-HAL). Es wurden athymische, T-Zell defiziente Nacktmäuse männlichen Geschlechts (Athymic Nude-*Foxn1^{nu}*) aus der Eigenzucht des ZMG (Zentrum für medizinische Grundlagenforschung, Universitätsklinikum Halle (Saale)) verwendet. Dabei wurden 3×10^6 CRC-Zellen gemischt mit $0,75 \times 10^6$ MSC subkutan (s.c.) in die Flanke einer Nacktmaus injiziert. Als Kontrollen dienten ungemischte CRC-Zellen an der kontralateralen Flanke der Maus. Um den Einfluss des α -Cat Expressionsstatus im CRC zu untersuchen, wurden dabei genetisch veränderte differentiell α -Cat exprimierende CRC-Zellen eingesetzt.

Die Versuche wurden an Tag 25 nach der s.c. Injektion beendet. Die Tiere wurden getötet, die Xenografte exzidiert und gewogen.

3.12 Mikroskopische Fotodokumentation von 2D- und 3D-Kulturen

Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Bilder von *in vitro* kultivierten Zellen (2D- und 3D-Kultur) wurden am Mikroskop Axiovert-25 mit der Kamera AxioCam (beides Zeiss, Jena; DE) unter Einsatz der Software AxioVision 3.1 (Zeiss) fotografiert.

3.13 Statistische Analysen

Für die statistischen Berechnungen wurde die Software RStudio (RStudio, Inc.) genutzt.

Die Berechnung der Standardabweichung (Stabw) und Varianz erfolgte als Schätzung unter der Annahme der Stichprobenziehung aus der Grundgesamtheit.

Der Einfluss der α -Cat Expression in CRC-Zellen auf die mRNA-Expression von TAF-Markern in MSC wurde mittels Welch-t-Test für unabhängige Stichproben bei ungleicher Varianz untersucht.

Der statistische Vergleich hinsichtlich der Relevanz der Expression von α -Cat auf das Xenograftgewicht wurde bei fehlender Normalverteilung mittels Mann-Whitney-U Test bei unverbundenen Stichproben durchgeführt.

Die statistische Testung der Xenograftgewichte zur Beurteilung des Einflusses von MSC auf das Tumorwachstum erfolgte unter Annahme von verbundenen Stichproben. Bei der Verwendung beider Flanken für die Generierung von Xenograften ist die Korrelation des Xenograftwachstums innerhalb des murinen Organismus zu beachten. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Individuen werden durch den intraindividuellen Vergleich minimiert (Heitjan et al. 1992). Wie in Abschnitt 3.11 beschrieben, wurde in eine Flanke eines Tieres ungemischte CRC-Zellen und in die andere Flanke MSC-gemischte CRC-Zellen einer Klonpopulation gegeben. Bei vereinzelt fehlenden Werten wurde die gesamte Zeile (+/-MSC) in der statistischen Berechnung der verbundenen Stichproben nicht berücksichtigt. Es wurde sowohl graphisch als auch analytisch mittels Shapiro-Wilk Test eine Normalverteilung der Paardifferenzen von MSC-gemischten und ungemischten Xenograftgewichten getestet (siehe Abb. A12, Tab. A3 in den Anlagen). Bei vorliegender Normalverteilung wurde ein t-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Auch unter Berücksichtigung aller Werte unter Annahme von unverbundenen Stichproben und Testung mittels Mann-Whitney-U Test (bei kleiner Stichprobe und einzelnen Ausreißern) zeigten sich vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Die deskriptive Darstellung erfolgte mittels Boxplot.

Der Effekt wurde als Vielfaches des MW der Xenograftgewichte angegeben und mittels Cohens d standardisiert berechnet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Etablierung eines α -Catenin *knock down* Modells in CRC-Zellen

4.1.1 Herstellung eines stabilen α -Catenin *knock down*

Um die Relevanz der α -Cat Expression in CRC-Zellen für die Interaktion mit MSC zu untersuchen, wurde ein α -Cat kd Modell in zwei CRC-Zelllinien entwickelt. Die Zelllinien DLD1 und HT29 wurden aufgrund der in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigten Eigenschaften ausgewählt (Widder et al. 2016):

- Expression von α -Cat im Rahmen eines funktionellen E-Cadherin/Catenin-Komplexes
- Wachstumsförderung durch MSC im Xenograft
- Differentieller Mutationsstatus u.a. von KRAS (DLD1 mutiert vs. HT29 Wildtyp) zur Einschätzung des Einflusses der genetischen Heterogenität des CRC

Mittels lentiviraler Transduktion wurde ein kd von α -Cat durchgeführt. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet: Der kd mittels shRNA- und CRISPR/Cas9-gRNA-Partikeln. Die Kontrollen wurden unter Verwendung unspezifischer shRNA- bzw. CRISPR/Cas9-gRNA-Partikeln generiert (siehe Abschnitt 3.4). Der kd in den Zelllinien wurde auf transkriptioneller und translationaler Ebene mittels qPCR und Western-Blot verifiziert (Daten nicht gezeigt).

Um Nebeneffekte aufgrund eines heterogenen Expressionsstatus der Zelltypen innerhalb der Zelllinie zu minimieren und einen effektiven α -Cat kd zu erzielen, wurden Klonkulturen aus einer einzelnen Zelle mittels limitierender Verdünnung generiert.

Auch in den Klonkulturen wurde die Expression von α -Cat mittels qPCR und Western-Blot analysiert. Anhand der gemessenen Effizienz des α -Cat kd wurden für DLD1 und HT29 jeweils 2 Klonkulturen mit einem shRNA kd und 2 mit einem CRISPR/Cas9 kd ausgewählt. Die Herstellung der Kontrollen erfolgte analog; sie wurden anhand einer mit dem Wildtyp vergleichbaren α -Cat Expression selektioniert. In Abbildung 1 ist die mRNA- und Proteinexpression von α -Cat in kd-Zellen und Kontrollen der ausgewählten Klonpopulationen *in vitro* dargestellt. Die Daten für jede der 4 ausgewählten α -Cat kd Klonkulturen je CRC-Zelllinie sind den Anlagen zu entnehmen (Abb. A1 und A2).

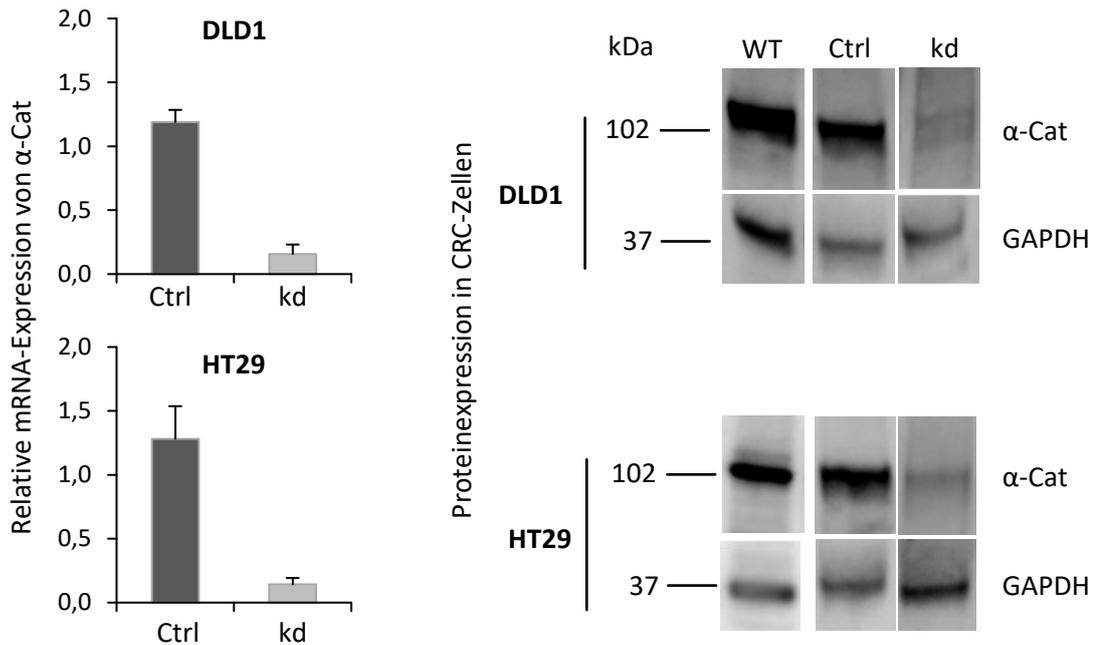


Abb. 1: Analyse der α -Cat Expression in α -Cat kd Zellen. Mittels qPCR ermittelte relative mRNA-Expression in den 4 ausgewählten Klonpopulationen mit α -Cat kd (kd) via shRNA- oder CRISPR/Cas9-gRNA-Partikeln und deren Kontrollen (Ctrl) der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 *in vitro*, vergleichend gegenüber dem WT, MW \pm Stabw aus 4 unabhängigen Experimenten. Im Western-Blot gemessene Proteinexpression von α -Cat (102 kDa) in kd, Ctrl und WT CRC-Zellen. Darstellung repräsentativer Beispiele, n = 4. GAPDH (37 kDa) als Ladekontrolle.

Bereits auf transkriptioneller Ebene war annähernd eine Aufhebung der mRNA-Expression von α -Cat in den kd-Zellen unabhängig von der kd-Methode im Vergleich zu den Kontrollen festzustellen (vgl. Abb. A1). Dies wurde im Western-Blot bestätigt (vgl. Abb. A2), sodass von einer suffizienten α -Cat Defizienz in den via shRNA oder CRISPR/Cas9-gRNA transduzierten Klonkulturen der CRC-Zellen auszugehen war.

4.1.2 Wachstumsanalyse der *knock down* Zellen

Durch die Generation von Klonkulturen kann es zu einer zufälligen Selektion von Eigenschaften kommen, die nicht denen der Ursprungszelllinie entsprechen. Um den Erhalt von wichtigen Charakteristika in den CRC-Zellen zu überprüfen, wurde das Wachstum der α -Cat kd-Zellen gegenüber den Kontrollen sowohl in der Zellkultur (Tab. 7) wie auch mittels SRB-Assay analysiert (Abb. 2).

Tab. 7: Wachstumskinetik von α -Cat kd Zellen *in vitro*. Populationsverdopplungszeit (PDT) in Tagen (d) in Zellkulturen von α -Cat kd Zellen (kd via shRNA- oder CRISPR/Cas9-gRNA-Partikeln) und deren Kontrollen (Ctrl) der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29, MW \pm Stabw aus 4 unabhängigen Experimenten über ≥ 4 Passagen und ≥ 9 Tage.

	DLD1		HT29	
	Ctrl	α -Cat kd	Ctrl	α -Cat kd
PDT [d]	0,94	1,01	0,93	0,98
Stabw	0,07	0,08	0,07	0,05

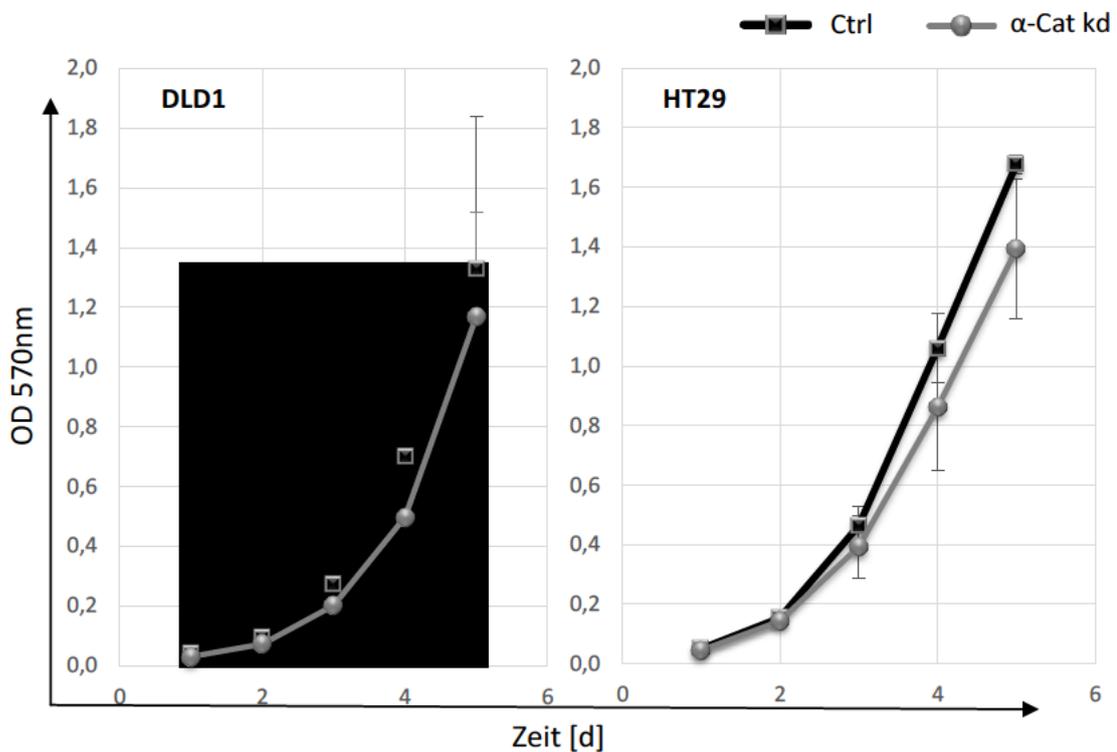


Abb. 2: Wachstumsverhalten von α -Cat kd Zellen *in vitro*. Im SRB-Assay gemessene optische Dichte (OD) über 5 Tage (d) von α -Cat kd Zellen und deren Kontrollen (Ctrl) der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29. Anfangszellzahl von 1000/well, MW \pm Stabw aus 4 unabhängigen Experimenten.

Es zeigte sich *in vitro* kein Unterschied im Wachstumsverhalten der kd Zellen im Vergleich zu den Kontrollen. Weiterhin war das Wachstum der Zellen mit unterschiedlicher kd Methode (shRNA und CRISPR/Cas9) vergleichbar. Eine Darstellung der Wachstumskinetik in Abhängigkeit von der kd-Methode und über die Zeit ist in den Anlagen zu finden (Abb. A3). Somit ist die Proliferation *in vitro* als wichtiges Zellcharakteristikum in den kd-Zellen und Kontrollen erhalten.

4.1.3 Zellmorphologische Veränderungen nach α -Catenin *knock down*

Nach Etablierung des kd fiel in 2D-Kulturen der α -Cat kd Zellen ein veränderter mikroskopischer Phänotyp auf. Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der α -Cat kd Zellen sowie der Kontrolle und des Wildtyps sind in der Abbildung 3 gezeigt. Der veränderte Phänotyp war in beiden Zelllinien DLD1 und HT29 mit α -Cat Defizienz unabhängig der verwendeten Methode (shRNA und CRISPR/Cas9) zu beobachten. Aufnahmen der weiteren Klonkulturen sind der Abbildung A4 in den Anlagen zu entnehmen.

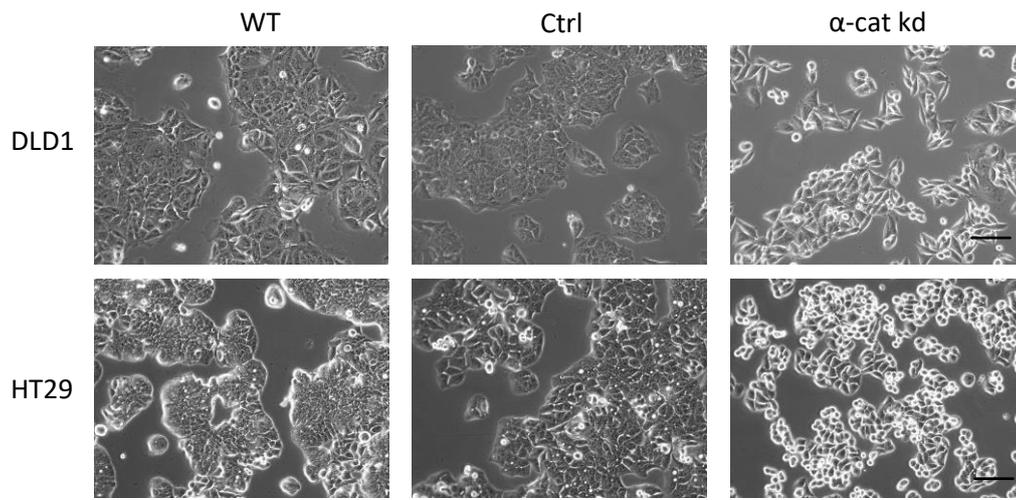


Abb. 3: Zellmorphologie von α -Cat kd Zellen *in vitro*. Beispielhafte lichtmikroskopische Aufnahmen der 2D-Kultur von α -Cat kd Zellen und deren Kontrollen (Ctrl) aus je 4 unabhängigen Experimenten sowie Wildtyp (WT) der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29, Balken – 100 μ m.

Die Morphologie der Kontrollen ähnelte der des WT, während die α -Cat kd Zellen differente Merkmale aufwiesen: Die Zellkörper der α -Cat defizienten Zellen wiesen eine geringe Zahl von Zell-Zell-Kontakten auf, die Kolonien wuchsen weniger dicht. Die Zellen der α -Cat defizienten DLD1 waren teils spindelförmig und gestreckt, teils weniger abgeflacht und adhärenz als die Kontrollen. Währenddessen waren die Zellen der α -Cat defizienten HT29 deutlich gerundet und teilweise kaum adhärenz.

Da α -Cat als ein wesentlicher Bestandteil von Zell-Zell-Kontakten fungiert (Benjamin und Nelson 2008), könnten die morphologischen Veränderungen auf dem funktionellen kd mit Störung der Zell-Zell-Kontakte beruhen.

Hiermit konnte ein Modell zur Untersuchung der Relevanz von α -Cat etabliert werden, in dem die eingesetzten kd Zellen einen suffizienten kd von α -Cat aufwiesen und ein vergleichbares Wachstum gegenüber den Kontrollen zeigten. Alle folgenden Experimente sind mit den oben

untersuchten 4 Klonkulturen mit α -Cat kd und 4 Kontrollen je CRC-Zelllinie DLD1 und HT29 durchgeführt worden.

4.2 Auswirkungen der α -Catenin Defizienz auf die Sphäroidbildung *in vitro*

4.2.1 Abhängigkeit der Sphäroidbildung von der α -Catenin Expression

Die Untersuchung der Tumor-Stroma-Interaktion *in vitro* ist bei Verwendung von *Monolayer*-Kulturen eingeschränkt. Die Kultivierung als 3D-Sphäroid ermöglicht die Untersuchung von Zell-Zell-Kontakten, der Ausbildung einer Gewebearchitektur und der Interaktion zwischen Zellen (Yuhas et al. 1977).

Zunächst sollte die Fähigkeit zur Ausbildung einer dreidimensionalen Tumorarchitektur in α -Cat defizienten Zellen untersucht werden. In der Abbildung 4 sind repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der 3D-Sphäroidkulturen gezeigt (Aufnahmen der weiteren Klonkulturen sind der Abbildung A5 in den Anlagen zu entnehmen).

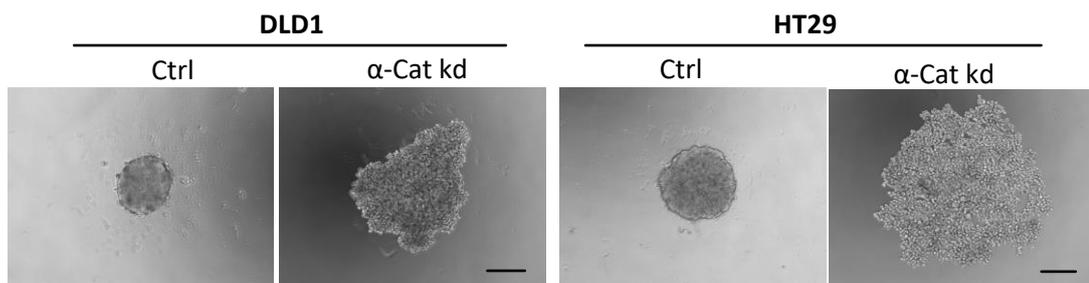


Abb. 4: Einfluss der α -Cat-Expression auf die Sphäroidbildung. Beispielhafte lichtmikroskopische Aufnahmen von 3D-Sphäroidkulturen von α -Cat kd Zellen und Kontrollen (Ctrl) der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 aus je 4 unabhängigen Experimenten, Balken – 200 μ m. Die CRC-Zellen mit funktionellem E-Cadherin/Catenin-Komplex bildeten kompakte Sphäroide. Dagegen hatten die α -Cat defizienten Zellen die Fähigkeit zur Sphäroidbildung verloren und bildeten lediglich lockere Aggregate. Dies zeigte, dass die Expression von α -Cat für die Ausbildung von Sphäroiden in 3D-Kulturen essenziell ist.

4.2.2 Differentielle Sphäroidbildung in Kokultur mit MSC

Unter der Annahme, dass MSC am Tumorstroma partizipieren, sollte die Tumor-Stroma-Interaktion zwischen den α -Cat kd Zellen und MSC *in vitro* analysiert werden. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass die Kokultur mit MSC die Sphäroidbildung bei der CRC-Zelllinie HCT8 mit inhärent dysfunktionalem E-Cadherin/Catenin-Komplex ermöglichte. Es wurde ein genereller Mechanismus zur Förderung der Sphäroidbildung durch MSC für α -Cat dysfunktionale Zellen vermutet (Widder et al. 2016). In Abbildung 5 ist eine 3D-Kokultur von

CRC-Zellen mit einem MSC-Anteil von 20 % an der Gesamtzellzahl gezeigt (Darstellung der weiteren Klonkulturen in den Anlagen Abb. A6).

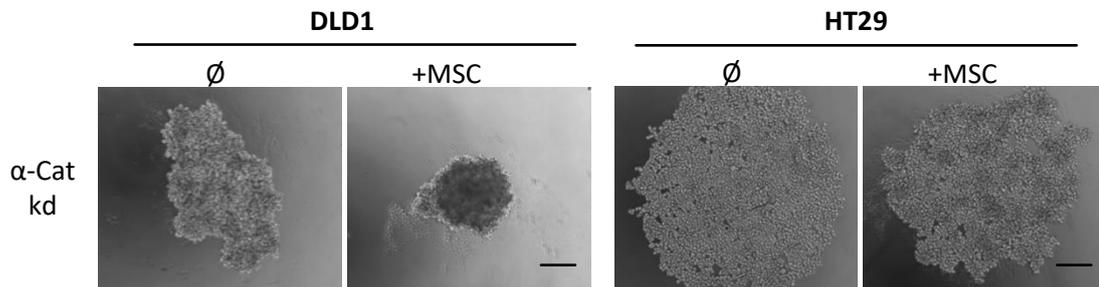


Abb. 5: Differentielle Sphäroidbildung in α -Cat kd CRC-Zellen bei Präsenz von MSC. Beispielhafte lichtmikroskopische Aufnahmen von MSC-gemischten (+MSC) und ungemischten (\emptyset) 3D-Sphäroidkulturen von α -Cat kd Zellen der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 aus je 4 unabhängigen Experimenten, Balken – 200 μ m.

Es zeigte sich eine differentielle Kompensierung der Sphäroidbildung durch MSC in den α -Cat kd Zellen: In der Linie DLD1 wurde die Fähigkeit Sphäroide zu bilden durch MSC wiederhergestellt. Dagegen konnten MSC bei α -Cat kd Zellen der Linie HT29 den Verlust der Sphäroidbildung nicht kompensieren. Dies weist auf Zelllinien-spezifische Unterschiede im zugrundeliegenden Mechanismus zur Förderung der Sphäroidbildung hin.

4.2.3 Vermittlung der Sphäroidbildung durch β 1-Integrin

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe beschrieben Widder et al bei der MSC-vermittelten Sphäroidbildung eine Abhängigkeit von CRC-Zell-exprimierten β 1-Int in inhärent α -Cat defizienten CRC-Zellen (Widder et al. 2016). Um die Relevanz von β 1-Int bei der MSC-vermittelten Sphäroidbildung in den α -Cat kd Zellen zu untersuchen, wurde eine 3D-Kultur unter Zugabe von β 1-Int blockierendem Antikörper zu MSC-gemischten CRC-Zellen angesetzt (Abbildung 6, Darstellung weiterer Klonpopulationen in den Anlagen Abb. A7).

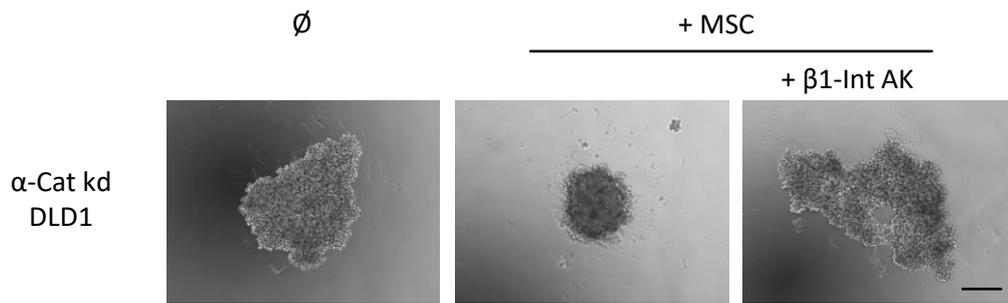


Abb. 6: Einfluss von β 1-Int auf die MSC-vermittelte Sphäroidbildung in α -Cat kd CRC-Zellen. Lichtmikroskopische Aufnahmen von MSC-gemischten (+MSC) und ungemischten (\emptyset) 3D-Sphäroidkulturen von α -Cat kd Zellen der CRC-Zelllinie DLD1 unter Zugabe von β 1-Integrin blockierenden Antikörpern (+ β 1-Int AK) aus je 4 unabhängigen Experimenten, Balken – 200 μ m.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Förderung der Sphäroidbildung in α -Cat defizienten Zellen der CRC-Zelllinie DLD1 durch MSC von der Funktionalität von β 1-Int abhängig war. Dies entsprach der in den Vorarbeiten der Gruppe berichteten Ergebnissen bei inhärent α -Cat defizienten CRC-Zellen der Linie HCT8.

4.3 Analyse der β 1-Integrin Expression in α -Catenin *knock down* CRC-Zellen

4.3.1 Messung der mRNA- und Proteinexpression von β 1-Integrin

In den vorherigen Abschnitten wurde gezeigt, dass α -Cat kd Zellen ihre Fähigkeit zur Sphäroidbildung verlieren. In der CRC-Zelllinie DLD1 wurde die Sphäroidbildung durch MSC in Abhängigkeit von β 1-Int wiederhergestellt. Diese Kompensation der Sphäroidbildung durch MSC erfolgte nicht in α -Cat kd Zellen der Linie HT29. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich die α -Cat kd Zellen der Linie DLD1 und HT29 in ihrer Expression von β 1-Int unterscheiden.

Daher wurde die β 1-Int Expression in den CRC-Zellen untersucht. Dazu wurde zuerst die β 1-Int mRNA Expression *in vitro* quantifiziert (Abb. 7).

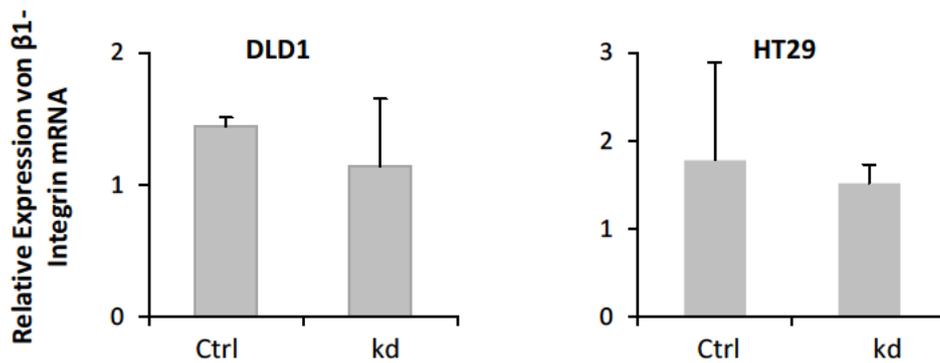


Abb. 7: Analyse der $\beta 1$ -Int mRNA-Expression in α -Cat kd CRC-Zellen. Mittels qPCR ermittelte relative mRNA-Expression von $\beta 1$ -Int in Zellen mit α -Cat kd (kd) via shRNA- oder CRISPR/Cas9-gRNA-Partikeln und deren Kontrollen (Ctrl) der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 *in vitro*, vergleichend gegenüber dem Wildtyp (WT), MW \pm Stabw aus 4 unabhängigen Experimenten.

Die mRNA-Expression von $\beta 1$ -Int zeigte sich bei DLD1 und HT29 in α -Cat kd Zellen unverändert gegenüber den jeweiligen Kontrollen. Dies war unabhängig von der Methode des kd und den jeweiligen Klonen (Daten in den Anlagen Abb. A8).

Im nächsten Schritt wurde die Proteinexpression von $\beta 1$ -Int von CRC-Zellen *in vitro* mittels Western-Blot analysiert (Abb. 8). Eine vollständige Darstellung aller untersuchten Zellen ist den Anlagen zu entnehmen (Abb. A9).

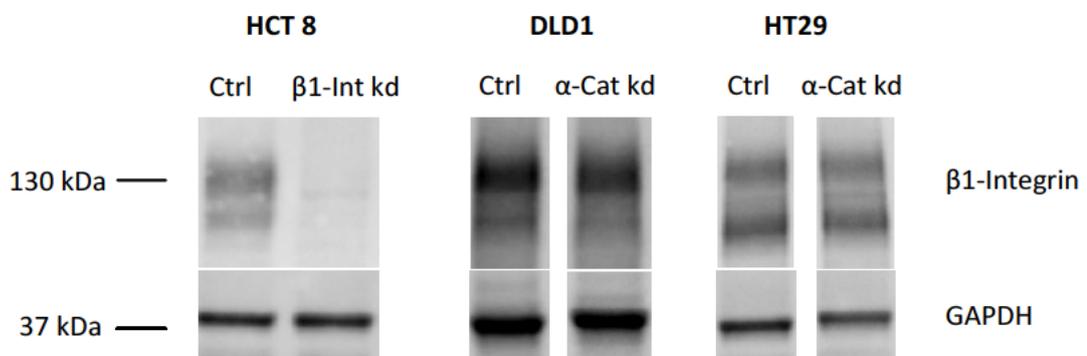


Abb. 8: Analyse der $\beta 1$ -Int Proteinexpression in α -Cat kd Zellen. Western-Blot Analyse der $\beta 1$ -Int (130 kDa) Expression in kd und Kontrollen (Ctrl) der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 *in vitro*. Negativkontrolle mit $\beta 1$ -Int kd Zellen der CRC-Zelllinie HCT8. Darstellung repräsentativer Beispiele, n = 4. GAPDH (37 kDa) als Ladekontrolle.

Die Expression von $\beta 1$ -Int zeigte sich auf Proteinebene unabhängig vom α -Cat Expressionsstatus. Jedoch fiel ein Zelllinien-spezifisch verändertes Bandenmuster auf: In der CRC-Zelllinie HT29 war eine untere Bande von $\beta 1$ -Int bei ca. 120 kDa betont, während die Zellen der DLD1 eine Ausprägung der oberen Bande bei 130 kDa aufwiesen. Da die Bandenausprägung sowohl in den Kontrollen, in den α -Cat kd Zellen und im WT zu finden war, schien sich die $\beta 1$ -Int Proteinexpression Zelllinien-spezifisch zu unterscheiden.

4.3.2 Messung der Oberflächenexpression von β 1-Integrin

Für die Interaktion der Tumorzelle mit dem umgebenden Stroma ist das Vorhandensein der entsprechenden Zelladhäsionsproteine an der Zelloberfläche essenziell. Nach der Proteinbiosynthese von β 1-Int ist der Transport an die Zelloberfläche verschiedenen Regulationsmechanismen unterworfen. Um etwaige Unterschiede zwischen den α -Cat kd Zellen der Zelllinien DLD1 und HT29 als Erklärung für die differentielle Förderung der Sphäroidbildung durch MSC abzuklären, wurde für beide die Oberflächenexpression von β 1-Int (CD 29) mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen der CRC-Zelllinie Colo320 mit β 1-Int kd. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

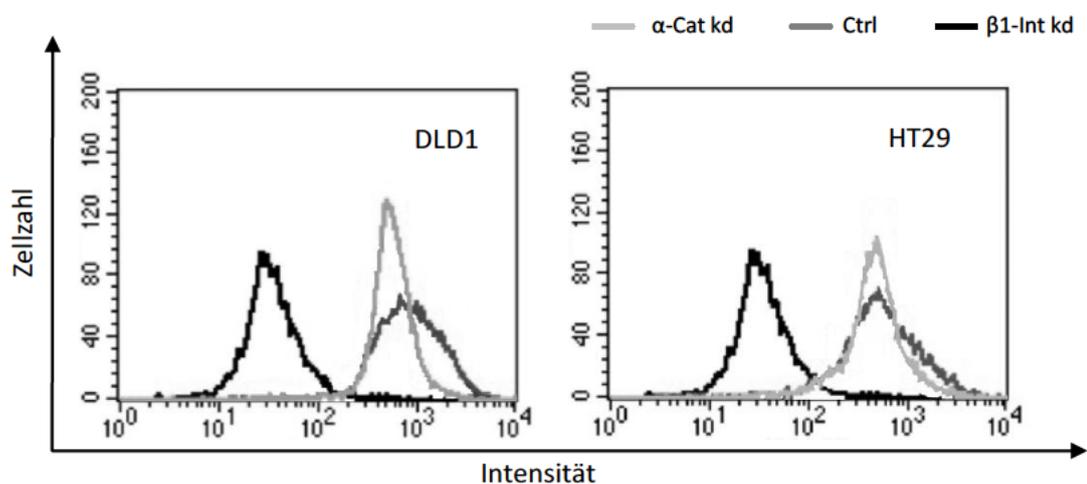


Abb. 9: Durchflusszytometrische Analyse der CD 29 (β 1-Int) -Oberflächenexpression. *Overlay-Darstellung der Fluoreszenzintensität in der Durchflusszytometrie nach Inkubation mit Anti-CD 29-PE Antikörper in α -Cat kd Zellen und Kontrollen (Ctrl) der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29, vergleichend gegenüber der β 1-Int kd CRC-Zelllinie Colo320. Darstellung repräsentativer Beispiele, n = 4.*

Die Ergebnisse zeigten eine ähnliche Oberflächenexpression von β 1-Int in Kontrollen und α -Cat kd Zellen beider CRC-Zelllinien. Es fanden sich keine Unterschiede in der β 1-Int Oberflächenexpression zwischen den einzelnen Klonen oder in Zusammenhang mit der Methode des α -Cat kd (Abb. A10).

Zusammenfassend ist hervorzuheben, dass die β 1-Int Expression der α -Cat defizienten Zellen sich nicht von der der Kontrollen unterschied. Im Western-Blot ergab sich ein Hinweis auf Zelllinien-spezifische Unterschiede auf Ebene der Proteinexpression von β 1-Int. Hierfür bestand jedoch kein Korrelat in der mRNA-Expression und der Oberflächenexpression.

4.4 Assoziation ausgewählter Marker mit der differentiellen Interaktion von MSC mit α -Catenin defizienten CRC-Zellen

4.4.1 Untersuchung der Expression von EMT-Markern in CRC-Zellen mit α -Catenin *knock down*

In Publikationen anderer Autoren ist bei Verlust von α -Cat eine Förderung der Transition von Tumorzellen von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Stadium hin beschrieben (Benjamin und Nelson 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Einfluss von MSC auf die Sphäroidbildung (siehe Abschnitt 4.2) α -Cat defizienter CRC-Zellen beobachtet. Es wurde vermutet, dass eine spezifische Interaktion zwischen MSC und α -Cat defizienten CRC-Zellen zu einer Veränderung des EMT-Programms in CRC-Zellen führte.

Hierfür wurde der Einfluss von MSC auf die Expression von EMT-Markern in α -Cat kd Zellen auf der Ebene der mRNA-Expression in 2D-Kokulturen untersucht. Als Vergleich diente die Kokultur der Kontrollen mit MSC. Nach gemeinsamer Kultivierung für 72 h erfolgte die Zellsortierung mittels FACS-Analyse. Hierbei konnte eine 98 % Reinheit der isolierten CRC-Zellpopulation erzielt werden (siehe Abschnitt 3.8).

Als Marker für eine EMT wurde die mRNA-Expression des Zelladhäsionsprotein E-Cadherin mit seiner Schlüsselrolle bei der Inhibition von Invasion und Metastasierung sowie die mesenchymalen Marker N-Cadherin und Vimentin untersucht (Abb. 10).

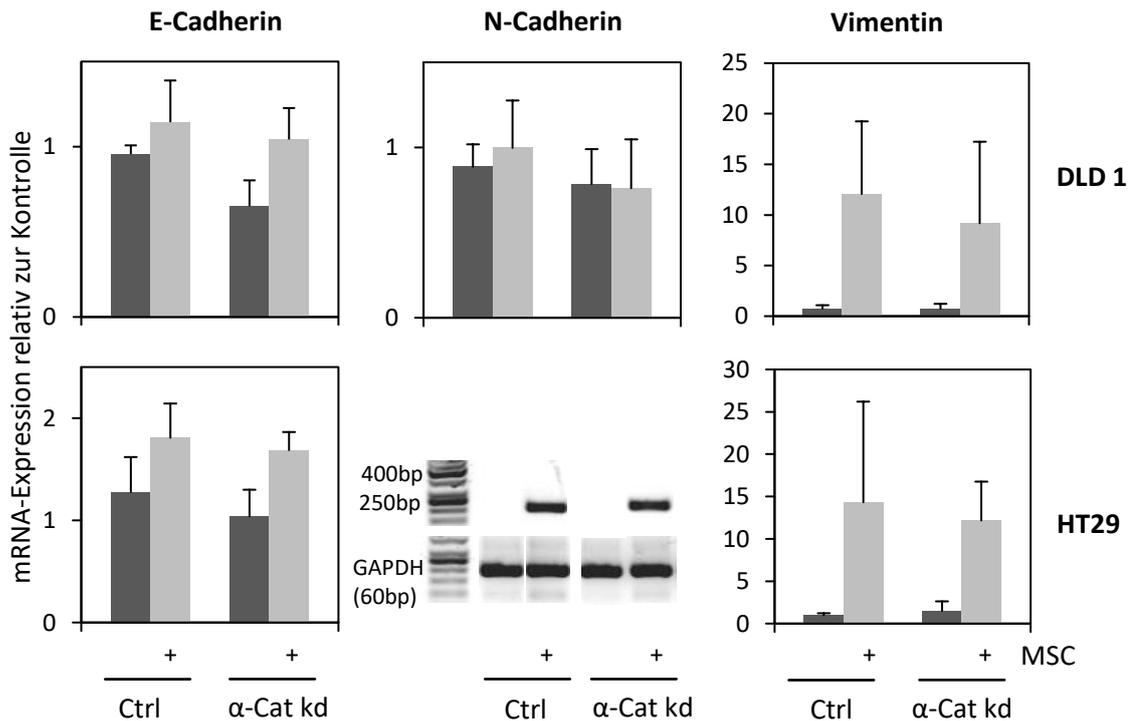


Abb. 10: Analyse der mRNA-Expression von E-Cadherin, N-Cadherin und Vimentin in α -Cat kd CRC-Zellen. Mittels qPCR ermittelte mRNA-Expression in MSC-gemischten (+) und ungemischten α -Cat kd Zellen und Kontrollen (Ctrl) in den CRC-Zelllinien DLD1 und HT29, relativ zur Expression in der Monokultur einer Kontrolle, MW \pm Stabw aus 4 unabhängigen Experimenten. Aufgrund der fehlenden Expression von N-Cadherin in HT29 Zellen war eine Darstellung relativ zur Kontrolle nicht möglich, daher wurde ein exemplarisches Gel abgebildet.

In der Kokultur der CRC-Zellen der Linie DLD1 und HT29 mit MSC zeigte sich die relative mRNA-Expression von E-Cadherin unabhängig vom Expressionsstatus von α -Cat. In der CRC-Zelllinie HT29 wurde N-Cadherin in der Monokultur nicht exprimiert, dies veränderte sich auch in den α -Cat kd Zellen nicht. Während sich die N-Cadherin Expression der DLD1-Linie in Kokulturen mit MSC unverändert zeigte, wurde in der HT29 Kokultur N-Cadherin detektiert. In beiden CRC-Zelllinien wurde eine vermehrte Menge an Vimentin in der Kokultur mit MSC nachgewiesen. Die Veränderungen der mRNA-Level waren nicht durch die α -Cat Defizienz der Zellen beeinflusst. Der vermehrte Nachweis von mesenchymalen Markern wie N-Cadherin und Vimentin in den Kokulturen könnte auch die Folge einer möglichen Kontamination mit MSC sein. MSC weisen im Gegensatz zu CRC-Zellen eine hohe Expression dieser Marker auf.

Weiterhin wurde die mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren Snail, Slug und Twist analysiert (Abb. 11).

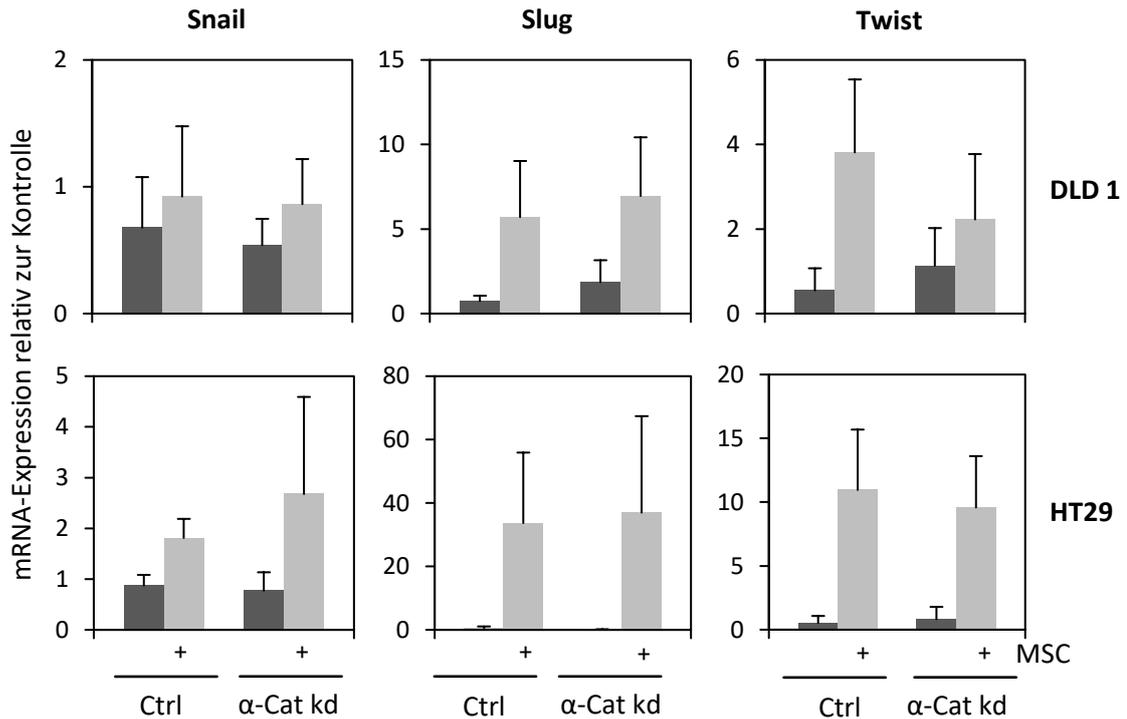


Abb. 11: Analyse der mRNA-Expression von Snail, Slug und Twist in α -Cat kd Zellen in Kokultur mit MSC. Mittels qPCR ermittelte mRNA-Expression in MSC-gemischten (+) und ungemischten α -Cat kd Zellen und Kontrollen (Ctrl) in den CRC-Zelllinien DLD1 und HT29, relativ zur Expression in der Monokultur einer Kontrolle, MW \pm Stabw aus 4 unabhängigen Experimenten.

In beiden Zelllinien zeigte sich in der Kokultur mit MSC eine gesteigerte mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren Snail, Slug und Twist. Jedoch wurde keine Beeinflussung der Expression durch den α -Cat Status in den CRC-Zellen beobachtet.

Bei den Ergebnissen trat eine große Schwankungsbreite innerhalb der biologischen Replikate auf. Diese kam unter anderem aufgrund einer sehr geringen absoluten mRNA-Menge der untersuchten Gene in den Monokulturen der CRC-Zellen zustande. Daher wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

Zusammenfassend zeigte sich in der Kokultur mit MSC ein vermehrter Nachweis von N-Cadherin in der HT29 sowie Vimentin und EMT-typischer Transkriptionsfaktoren in den CRC-Zellen, wie sie bei einem beginnenden oder partiellen Übergang der CRC-Zellen in ein mesenchymales Stadium auftreten können (Grigore et al. 2016). Die α -Cat Defizienz übte keinen erkennbaren Einfluss auf die Expression von EMT-Markern aus. Daher wurde vermutet, dass die kompensierte Sphäroidbildung in α -Cat defizienten CRC-Zellen der Linie DLD1 durch MSC unabhängig von einer EMT-Induktion vermittelt wurde.

4.4.2 Untersuchung der Expression von TAF-Markern in MSC

In der Literatur wurde beschrieben, dass ein TAF-Phänotyp in MSC durch Kontakt mit Tumorzellen induziert werden kann (Mishra et al. 2008; Spaeth et al. 2009). Es sollte daher untersucht werden, inwiefern der α -Cat kd in CRC-Zellen Einfluss auf diese TAF-Induktion hat. In einer 2D-Kokultur von CRC-Zellen mit MSC wurde die Induktion des TAF-Phänotyps in MSC anhand der molekularen Marker *fibroblast activation protein (FAP)*, *α -smooth muscle actin (SMA)*, *Calponin*, *myocardin-related transcription factor-A (MRTF-A)* und *connective tissue growth factor (CTGF)* untersucht.

In Voruntersuchungen mit den ursprünglichen WT CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 fanden sich Zelllinien-spezifische Unterschiede bei der Expression von TAF-Markern in MSC in den jeweiligen Kokulturen (Abb. A11). Im Weiteren wurde der Fokus auf den Einfluss des α -Cat kd in den CRC-Zellen auf die Expression von TAF-Markern in MSC gelegt. Dies wurde anhand der mRNA-Expression in MSC in einer 2D-Kokultur mit α -Cat kd Zellen und Kontrollen der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 gemessen (Abb. 12).

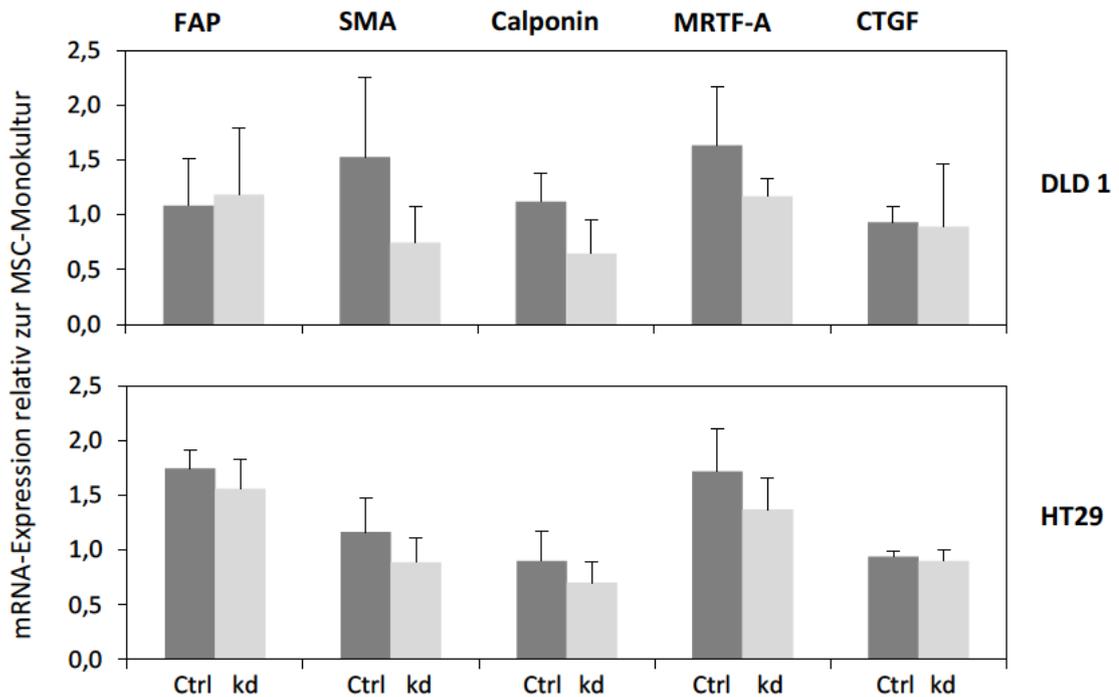


Abb. 12: Analyse der mRNA-Expression der TAF-Differenzierungsmarker FAP, SMA, Calponin, MRTF-A und CTGF in MSC bei Kokultur mit α -Cat kd CRC-Zellen. Mittels qPCR ermittelte mRNA-Expression in MSC-Kokulturen, gemischt mit α -Cat kd Zellen (kd) oder Kontrollen (Ctrl) der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29, relativ zur Expression in der MSC-Monokultur, MW \pm Stabw aus 4 unabhängigen Experimenten.

Bei der FAP und CTGF mRNA-Expression in MSC zeigte sich kein Unterschied nach α -Cat Status der kokultivierten CRC-Zellen. Bei den TAF-Markern SMA, Calponin und MRTF-A war eine verminderte Expression in MSC bei einer Kokultur mit α -Cat defizienten Zellen angedeutet. In Kokultur mit α -Cat kd Zellen der Linie DLD1 war die mRNA-Expression von SMA und Calponin in MSC um 0,5- ($p = 0,11$) respektive 0,6-fach ($p = 0,06$) geringer im Vergleich zur Kokultur mit α -Cat exprimierenden CRC-Zellen. In Kokultur mit der α -Cat defizienten Linie HT29 war die Expression um nur 0,8- ($p = 0,21$) und 0,8-fach ($p = 0,28$) verringert. Die MRTF-A Expression zeigte sich um jeweils auf das 0,7- ($p = 0,18$) bzw. 0,8-fache ($p = 0,21$) des Wertes in Kokultur mit α -Cat defizienten Zellen der DLD1 und HT29 verringert. Somit konnte kein deutlicher Unterschied in der Expression von TAF-Markern in MSC nach α -Cat Status der CRC-Zellen festgestellt werden. Die Ergebnisse der statistischen Analyse mittels Welch-t-Test sind unter der Einschränkung der geringen Stichprobengröße und der Schwankungsbreite der Messungen zu betrachten.

Unabhängig vom α -Cat Status der CRC-Zellen schien die Expression von FAP bei Kokultur mit CRC-Zellen der HT29 erhöht zu sein, vergleichbar zu der Erhöhung bei Kokultur mit dem Wildtyp.

Die Differenzierung zu TAF ist auch durch eine erhöhte Kollagensynthese gekennzeichnet (Kalluri 2016). Als Marker der Kollagensynthese wurde Kollagen Typ 1 $\alpha 1$ (Col1A1) und Kollagen Typ 1 $\alpha 2$ (Col1A2) bestimmt, die zusammen Kollagen Typ 1 bilden, sowie Kollagen Typ 3 (Col3A1). Integrin α -11 (ITGA11) ist ein Kollagenrezeptor und steuert neben der myofibroblastären Differenzierung auch die Kollagenorganisation und -festigkeit (Navab et al. 2016). Das ECM Glykoprotein Tenascin C (TNC) wird durch Interaktion zwischen Tumor- und Stromazellen von beiden Zellarten gebildet und in der ECM deponiert. Integrin-vermittelt wirkt es proliferations- und migrationsfördernd (Yoshida et al. 2015).

Die Abbildung 13 zeigt die Expression von Markern der Kollagensynthese und –interaktion in MSC bei Kokultur mit CRC-Zellen.

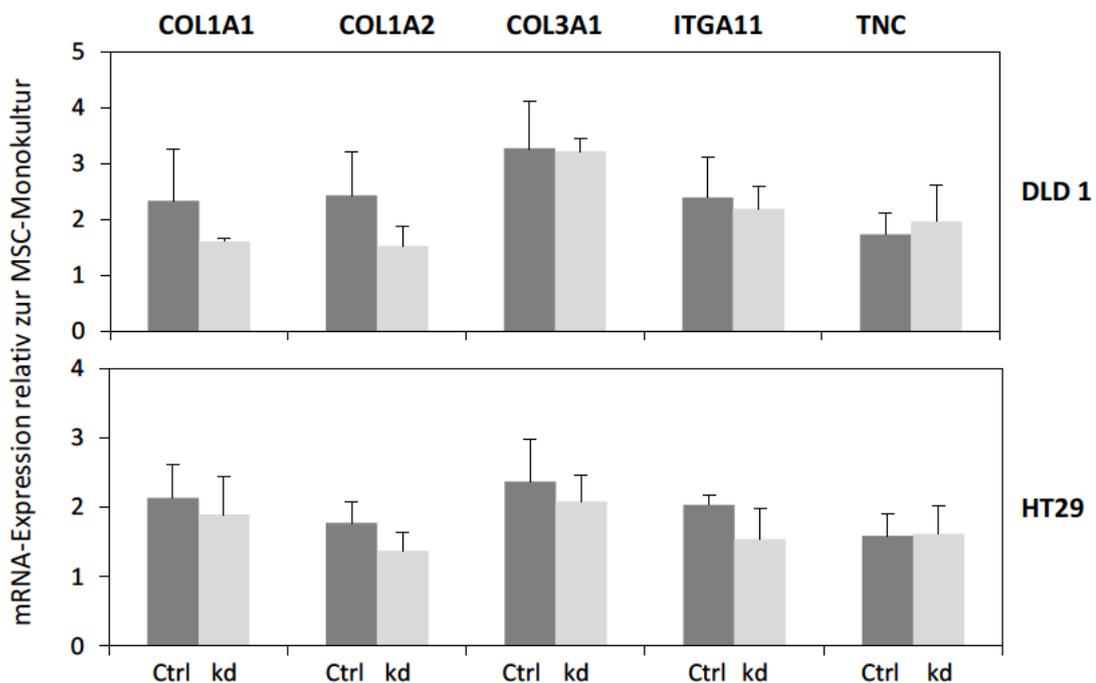


Abb. 13: Expression von Genen der Kollagensynthese und –interaktion in MSC bei Kokultur mit α -Cat kd CRC-Zellen. Mittels qPCR ermittelte mRNA-Expression in MSC-Kokulturen, gemischt mit α -Cat kd Zellen (kd) oder Kontrollen (Ctrl) der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29, relativ zur Expression in der MSC-Monokultur, MW \pm Stabw aus 4 unabhängigen Experimenten.

Insgesamt zeigte sich eine Induktion der Expression von mRNA (1,6 – 3,3-fach vs. Monokultur) für die Kollagenbildung (COL1A1, COL1A2 und COL3A1) sowie -interaktion (ITGA11 und TNC) durch eine Kokultur mit den untersuchten CRC-Zellen. Auch hier zeigte der α -Cat Status der CRC-Zellen in der statistischen Auswertung keinen Einfluss auf die Expression von Markern der Kollagensynthese- und -interaktion in MSC (Daten nicht gezeigt).

Es bleibt festzuhalten, dass es auf transkriptioneller Ebene Hinweise für eine Differenzierung der MSC zu TAF durch die Kokultur mit den CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 gab. Dies war jedoch nicht mit dem α -Cat Status der CRC-Zellen assoziiert.

4.5 Xenograftwachstum α -Catenin defizienter CRC-Zellen

Zunächst sollte der Einfluss des α -Cat kd auf das Tumorwachstum *in vivo* untersucht werden. Dazu wurden das Gewicht s.c. Xenografte der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 an Tag 25 nach Injektion von α -Cat kd Zellen vergleichend gegenüber den Kontrollen analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass das Xenograftwachstum der DLD1 von der α -Cat Expression nicht beeinflusst wird ($p = 0,169$). Im Gegensatz dazu zeigte sich in der CRC-Zelllinie HT29 ein verstärktes Tumorwachstum bei α -Cat kd ($p = 0,042$). Weitere Daten zur statistischen Auswertung sind den Anlagen zu entnehmen (Tab. A1).

Um die Frage zu klären, inwiefern die *in vitro* beobachtete Förderung der Sphäroidbildung durch MSC mit einer MSC-vermittelten Wachstumsförderung *in vivo* korreliert, wurde das Wachstum von MSC-gemischten Xenograften analysiert. In der Abbildung 14 sind die Gewichte der Xenografte von MSC-gemischten und ungemischten CRC-Zellen dargestellt. Die exakten MW sowie Stabw und Median der Xenograftgewichte sind in der Tabelle A2 in den Anlagen zu finden.

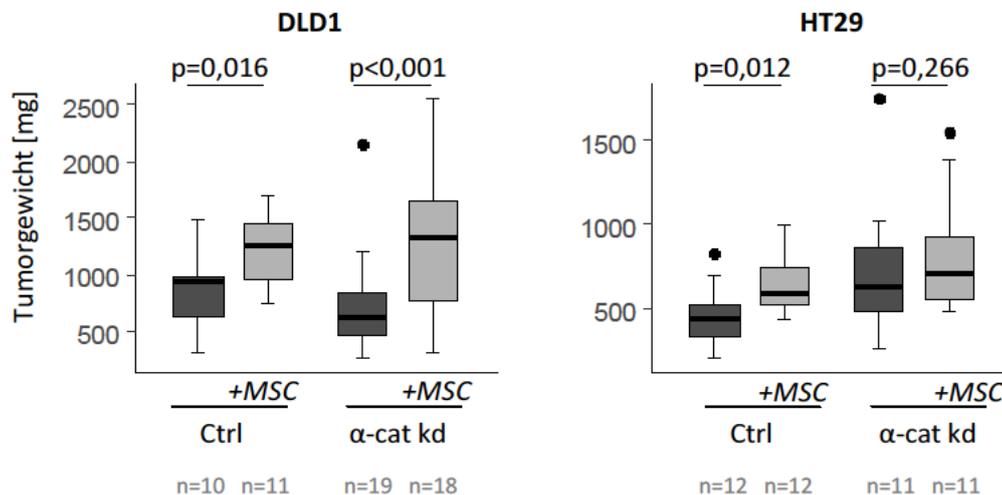


Abb. 14: MSC-vermittelte Wachstumsförderung von α -Cat kd Zellen *in vivo*. Boxplotdarstellung der Tumorgewichte MSC-gemischter (+MSC) und ungemischter s.c. Xenografte von α -Cat kd Zellen oder Kontrollen (Ctrl) der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 an Tag 25 nach Injektion im murinen Modell. Kreise – Ausreißer.

Im Mischxenograft förderten MSC das Tumorwachstum der α -Cat exprimierenden Kontrollen der CRC-Zelllinien DLD1 ($p < 0,05$, $d = 1,48$) und HT29 ($p < 0,05$, $d = 1,41$).

Bei den α -Cat kd Zellen der CRC-Zelllinie DLD1 kam es ebenso zu einem verstärkten Wachstum in MSC-gemischten Xenograften ($p < 0,001$, $d = 1,19$) mit einem 1,7-fachen Tumorgewicht im Vergleich zu dem ungemischten Xenograft mit α -Cat kd Zellen. Im Gegensatz dazu war bei den α -Cat kd Zellen der CRC-Zelllinie HT29 keine Wachstumsförderung durch MSC zu beobachten ($p = 0,27$, $d = 0,36$). Weitere Angaben zur Teststatistik und Normalverteilung sind in den Anlagen zu finden (Abb. A12, Tab. A3 und A4).

Insgesamt gesehen wurde eine spezifische Wachstumsförderung von α -Cat defizienten Zellen festgestellt, die jedoch abhängig von der Zelllinie war. Die Wachstumsförderung wurde analog zu der MSC-vermittelten Sphäroidbildung nur in den α -Cat kd Zellen der CRC-Zelllinie DLD1 beobachtet.

5 DISKUSSION

5.1 Wesentliche Resultate

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass die α -Cat Expression in CRC-Zellen bei der differentiellen Förderung des Tumorwachstums durch MSC relevant ist.

In den CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 wurde mittels shRNA- und CRISPR/Cas9-System ein kd des Zelladhäsionsproteins α -Cat etabliert. Hierbei war Proliferation bei den α -Cat kd Zellen *in vitro* unverändert gegenüber den α -Cat exprimierenden Kontrollen.

Im 3D-Sphäroidmodell verloren die α -Cat defizienten Zellen die Fähigkeit zur Sphäroidbildung. In Kokultur mit MSC wurde die Sphäroidbildung in den α -Cat kd Zellen der CRC-Zelllinie DLD1 wiederhergestellt, nicht jedoch bei α -Cat kd Zellen der Linie HT29. Die MSC-vermittelte Sphäroidbildung in α -Cat kd Zellen der DLD1 war von funktionellem β 1-Int abhängig.

Die mRNA- und Proteinexpression von β 1-Int in den CRC-Zellen war nicht durch den α -Cat kd verändert. Ebenso zeigte sich eine unveränderte Oberflächenexpression. Es schien jedoch Zelllinien-spezifische qualitative Unterschiede in der β 1-Int Proteinexpression zu geben.

Zur Untersuchung potenzieller molekularer Mechanismen wurde die Genexpression in CRC-Zellen und MSC *in vitro* in einer 2D-Kokultur analysiert. Marker für eine EMT-Induktion in CRC-Zellen bzw. Induktion einer TAF-Differenzierung in MSC zeigten sich nicht vom α -Cat Status der CRC-Zellen beeinflusst, jedoch gab es Hinweise auf Zelllinien-spezifische Unterschiede.

Bei der Untersuchung *in vivo* förderten MSC das Tumorwachstum der α -Cat exprimierenden Kontrollen der Linien DLD1 und HT29 sowie das Tumorwachstum der α -Cat kd Zellen der Linie DLD1. Hingegen wurde das Wachstum der α -Cat kd Zellen der Linie HT29 nicht durch MSC gefördert.

Dies spricht für eine differentielle Interaktion von MSC mit CRC-Zellen in Abhängigkeit von ihrer α -Cat Expression. Die differentielle Wachstumsförderung von α -Cat defizienten CRC-Zellen durch MSC könnte durch qualitative Unterschiede in der Expression von β 1-Int erklärbar sein.

Dieses Ergebnis trägt weiter zum Verständnis der komplexen Tumor-Stroma-Interaktion bei. Für weiterführende Arbeiten leitet sich die Hypothese ab, dass die Stroma-vermittelte Wachstumsförderung von der transkriptionellen Signatur der CRC-Zellen entscheidend geprägt wird.

5.2 Auswirkungen der α -Catenin Defizienz im CRC-Modell

5.2.1 Morphologische Veränderungen in den CRC-Zellen

Der Verlust von α -Cat bei CRC-Zellen mit primär funktionellem E-Cadherin/Catenin-Komplex führte zu einer morphologischen Veränderung, die sich *in vitro* bei der lichtmikroskopischen Beobachtung von *Monolayern* zeigte: Die CRC-Zellen wuchsen insgesamt weniger dicht und wiesen eine geringere Zahl von Zell-Zell-Kontakten auf.

Der E-Cadherin/Catenin-Komplex ist wesentlich für die Initiierung und Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten und damit auch die Morphologie der Zellen: Bei einer mit Methotrexat selektionierten Subpopulation der CRC-Zelllinie HT29 wurde im Zusammenhang mit einer verminderten E-Cadherin Expression eine Reduktion der Zell-Zell-Kontakte sowie eine abgeflachte Zellmorphologie und weniger dichtes Wachstum beobachtet (Fabre und García de Herreros 1993). Als Bindeglied zwischen dem Adhäsionskomplex und dem Zytoskelett nimmt α -Cat innerhalb der E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Kontakte eine wichtige Rolle ein (Nelson 2008). Das Fehlen von α -Cat wirkt sich daher ebenfalls auf die Morphologie der Zellen aus, wie bei einer Subpopulation der CRC-Zelllinie HCT8. Zellen der HCT8 mit epithelalem Phänotyp exprimieren einen funktionellen E-Cadherin/Catenin-Komplex mit Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten. Eine α -Cat defiziente Subpopulation mit runden, wenig adhären Zellen bildete dagegen keine Zell-Zell-Kontakte aus (Vermeulen et al. 1997). Somit haben die E-Cadherin/Catenin-vermittelten Zell-Zell-Kontakte der CRC-Zellen durch den suffizienten kd von α -Cat vermutlich ihre Funktion verloren und die morphologische Veränderung hervorgerufen.

Der Verlust von α -Cat und in der Folge gestörte Zell-Zell-Kontakte sind assoziiert mit einer gesteigerten Migration (Pokutta et al. 2008). Bei der Zellmigration werden zwei morphologisch differente Formen unterschieden, die amöboide und die mesenchymale Form (Maffei et al. 2019). Bei der mesenchymalen Migration adhärirt die Zelle je nach Richtung der Migration über Integrine an die ECM. Dadurch nimmt sie eine elongierte, polarisierte Form an. Die amöboide Form ist gekennzeichnet durch eine kugelförmige Morphologie, die durch einen hohen intrazellulären Druck und verminderter Adhäsion an die ECM entsteht (Wolf et al. 2003). Die spindelförmigen Zellen der DLD1 ähnelten dem mesenchymalen Phänotyp, während die wenig adhären, kugelförmigen Zelltypen der DLD1 und der HT29 mit der amöboiden Form vergleichbar waren. Das bedeutet jedoch nicht, dass die Zellen in dieser Form migrieren. Hierfür müssten weitere Untersuchungen *in vivo* oder innerhalb einer ECM-ähnlichen Matrix durchgeführt werden. Außerdem sind Zellmorphologie und Migration stark abhängig von der ECM, der Zellpolarität und den Zellinteraktionen (Maffei et al. 2019). Die differente

Morphologie der DLD1 und HT29 könnte auf Zelllinien-spezifische Unterschiede hinsichtlich des Aufbaus des Zytoskeletts oder Expression von Adhäsionsproteinen wie Integrinen hindeuten.

5.2.2 Proliferation von α -Catenin defizienten Zellen *in vitro* und *in vivo*

In der Literatur sind neben einer Veränderung der Zellmorphologie bei α -Cat Defizienz auch eine gesteigerte Proliferation beschrieben. Der Einfluss von α -Cat auf die Proliferation wird vermutlich auf zwei unterschiedlichen Wegen ausgeübt: Zum einen ist α -Cat an zellulären Signalwegen zur Steuerung des Wachstums beteiligt (Scott und Yap 2006). Im Mausmodell resultierte eine erhöhte Proliferationsrate bei α -Cat defizienten Hautzellen, die auf einer Aktivierung des Ras/MAPK-Signalwegs beruhte (Vasioukhin et al. 2001). In CRC-Zellen inhibierte α -Cat durch nukleäre Lokalisation und Bindung an β -Catenin die Transkription im Rahmen des Wnt-Signalwegs (Daugherty et al. 2014). Zum anderen kann die durch α -Cat kontrollierte Zelladhäsion das Wachstum über Kontaktinhibition beeinflussen. In nicht-adhärenenten Lungenkarzinomzellen führte die Re-Expression von α -Cat zur Adhäsion der Zellen, Wachstum in *Monolayern* und einer reduzierten Proliferation (Watabe et al. 1994). In der Sphäroidkultur zeigte sich eine verringerte Proliferation von α -Cat exprimierenden CRC-Zellen im Vergleich zu α -Cat defizienten Zellen. Da dieser Effekt nicht in der zweidimensionalen Zellkultur zu beobachten war, wurde eine kontakt-abhängige Inhibition der Proliferation vermutet (Matsubara und Ozawa 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte die Proliferation der α -Cat defizienten CRC-Zellen *in vitro* keine Veränderung gegenüber den CRC-Zellen mit funktionellem α -Cat. Hierbei müssen potenzielle Nebeneffekte durch die Herstellung des α -Cat kd in den CRC-Zellen beachtet werden. Auch durch die Klonierung können einzelne Zelleigenschaften zufällig selektiert werden, die in der ursprünglichen Zelllinie nur gering vertreten waren. Da im Vergleich der zwei verwendeten Methoden (shRNA und CRISPR/Cas9) zur Generierung eines α -Cat kd keine Unterschiede im Proliferationsverhalten *in vitro* zu beobachten waren, scheiden Methoden-spezifische Effekte als Ursache des fehlenden Einflusses des α -Cat kd auf die Proliferation *in vitro* aus.

Das Wachstum *in vivo* war bei den α -Cat defizienten Zellen der CRC-Zelllinie HT29 gegenüber den α -Cat exprimierenden Kontrollen erhöht. Dies könnte auf eine kontakt-abhängige Inhibition des Wachstums durch α -Cat in der HT29 hinweisen, die im dreidimensionalen System auftritt, aber nicht in der Kultur in *Monolayern*. Dies könnte analog zur Untersuchung von Matsubara und Ozawa mittels einer Proliferationsmessung in der Sphäroidkultur getestet werden.

Bei der CRC-Zelllinie DLD1 konnte *in vivo* kein Wachstumsunterschied bei einer differentiellen Expression von α -Cat festgestellt werden. Durch Mutationen im CRC sind viele die Proliferation

regulierende Signalwege bereits verändert, so wird durch die APC-Mutation der Wnt-Signalweg konstitutiv aktiviert, und auch durch die Mutation von KRAS wird die Proliferation beeinflusst (Fearon 2011). Die differentielle Proliferation könnte auf Zelllinien-spezifische Mutationen dieser Signalwege zurückzuführen sein, da α -Cat auch über diese Wege die Proliferation beeinflusst. In der CRC-Zelllinie DLD1 ist KRAS mutiert, während in der HT29 der Wildtyp exprimiert wird (Ahmed et al. 2013). Es besteht ein Zusammenhang zwischen der α -Cat Defizienz und einer Aktivierung des Ras/MAPK-Signalwegs (Vasioukhin et al. 2001). Die α -Cat Defizienz könnte daher den Ras/MAPK-Signalweg in HT29 aktivieren und darüber die Proliferation in den Zellen steigern. Da aufgrund der KRAS-Mutation der Ras/MAPK-Signalweg in der DLD1 bereits konstitutiv aktiviert ist, führt der Verlust von α -Cat hier nicht zur Zunahme der Proliferation. Um jedoch eine Aussage über den relevanten Mechanismus treffen zu können, müssten weitergehende Untersuchungen zur Aktivierung der Signalwege bei unterschiedlichem Mutationsstatus der Zellen und zur Rolle der Kontaktinhibition folgen.

5.2.3 Defizitäre Sphäroidbildung von CRC-Zellen bei Fehlen von α -Catenin

Während normale Zellen in der 3D-Kultur lose Aggregate bilden, finden sich Tumorzellen zu kompakten Sphäroiden zusammen und bilden eine dreidimensionale Struktur aus (Yuhas et al. 1977). Zellform, -größe und Verteilung von Zellorganellen bilden gegenüber der Kultur in *Monolayern* besser die Situation *in vivo* ab, und ermöglichen die Untersuchung des komplexen Netzwerks aus Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen *in vitro* (Kunz-Schughart et al. 1998). Das Modell simuliert ein frühes Stadium der Tumorentwicklung mit einer geringen Anzahl an Tumorzellen, wie sie bei der Tumorentstehung oder Ansiedlung von Metastasen vorkommt (Friedrich et al. 2007). In dieser Arbeit wurde im Sphäroidmodell der Aufbau einer Tumorarchitektur bei Interaktion mit MSC als Teil des Tumorstromas untersucht.

CRC-Zellen mit funktionellem E-Cadherin/Catenin-Komplex bildeten kompakte Sphäroide. Nach dem kd von α -Cat verloren sie die Fähigkeit zur Sphäroidbildung, und es zeigten sich lose Zellaggregate. Analoge Daten wurden von anderen Autoren im Brustkrebs- und Kolonkarzinomzellmodell bei Tumorzellen ohne funktionellen E-Cadherin/Catenin Komplex berichtet (Byers et al. 1995). Neben E-Cadherin waren auch α -Cat defiziente CRC-Zellen unfähig zur Ausbildung von kompakten Sphäroiden (Widder et al. 2016). Ein funktioneller E-Cadherin/Catenin-Komplex ist daher bei der Ausbildung einer Tumorarchitektur von entscheidender Bedeutung.

5.3 Mechanismen der Interaktion zwischen MSC und CRC-Zellen *in vitro*

5.3.1 β 1-Integrin abhängige Kompensation der Sphäroidbildung durch MSC

Unter der Annahme, dass bei der Tumor-Stroma-Interaktion vor allem die dreidimensionale Struktur relevant sein könnte (Kunz-Schughart et al. 1998), wurde die Kokultur von CRC-Zellen und MSC im Sphäroidmodell untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass α -Cat defiziente Zellen der Zelllinie DLD1 bei Kokultur mit MSC wieder kompakte Sphäroide entwickeln. Die vorliegende Arbeit gibt Hinweise auf mögliche Mechanismen, wie MSC die durch α -Cat Defizienz gestörten Zell-Zell-Kontakte kompensieren. Ein Kandidat für diesen Mechanismus sind Zell-Matrix-Interaktionen. Zahlreiche Arbeiten zeigen, dass Integrine die Bindung von Tumorzellen an die ECM vermitteln, gezeigt u.a. bei Zellen des Mammakarzinoms (Ivascu und Kubbies 2007). Im Sphäroidmodell von CRC-Zellen mit dysfunktionalem E-Cadherin/Catenin-System kompensierten MSC ebenfalls die Bildung kompakter Sphäroide, diese Interaktion beruhte auf einer β 1-Integrin vermittelten Bindung an Kollagen (Widder et al. 2016). Entsprechend wurden Therapieansätze zur Inhibition dieser Interaktionen untersucht, so z. B. Volociximab als Antikörper gegen α 5 β 1-Integrin (Ganguly et al. 2013).

Auch in dieser Arbeit zeigte sich die Fähigkeit der MSC, eine Sphäroidbildung in α -Cat defizienten CRC zu ermöglichen, von der Zell-Matrix-Interaktion abhängig: Nach Zugabe eines β 1-Int blockierenden Antikörpers wurden in der Kokultur von α -Cat defizienten CRC und MSC keine Sphäroide mehr beobachtet.

Jedoch kompensierten MSC die Sphäroidbildung nicht in der α -Cat defizienten CRC-Zelllinie HT29. Da in der DLD1 bereits die Relevanz von β 1-Int nachgewiesen wurde, sollte die Integrin Expression in den CRC-Zellen untersucht werden, um eventuelle Nebeneffekte des α -Cat kd auf die Integrin Expression auszuschließen: Dabei konnte kein Einfluss des α -Cat kd auf die mRNA-, Protein- oder Oberflächenexpression von β 1-Int festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch ein von dem kd unabhängige, Zelllinien-spezifisch differentielle Ausprägung der β 1-Int Banden im Western-Blot.

In der Literatur sind verschiedene Modifikationen von β 1-Int auf Ebene der RNA (Melker und Sonnenberg 1999) als auch der Proteine (Übersicht zur Glykosylierung in Bellis 2004) beschrieben, die sich auf die Ligandenbindung und Signalaktivität der Integrine auswirken. Diese können eine verändertes Bandenmuster im Western-Blot aufweisen. In der CRC-Zelllinie HT29 wurden zwei unterschiedlich glykosylierte Formen von β 1-Int beschrieben. Die „unreife Form“

von $\beta 1$ -Int mit geringer ausgeprägter Glykosylierung bindet schwächer an Laminin und Kollagen (Lampe et al. 1993). In Zellkulturuntersuchungen von Kolonepithelzellen bestand außerdem ein Zusammenhang zwischen der Aktivität des Ras Proteins und der vollständigen Glykosylierung von $\beta 1$ -Int zur „reifen Form“: In dem schrittweisen Prozess der Glykosylierung ist die Konversion des vorläufigen 115 kDa $\beta 1$ -Integrin Proteins zur reifen 130 kDa Form der Zelloberfläche bei fehlender Ras Aktivität eingeschränkt (Bellis et al. 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte daher eine Zelllinien-spezifische Kompensation der Sphäroidbildung bei α -Cat Defizienz durch MSC *in vitro* beobachtet werden. Die Unterschiede bei den Zelllinien könnten auf einem funktionell eingeschränktem $\beta 1$ -Int in der Zelllinie HT29 beruhen.

5.3.2 Induktion einer EMT unabhängig von der α -Catenin Expression

In der Interaktion zwischen Tumorstroma und Tumor werden verschiedene zelluläre Signalwege aktiviert, darunter die EMT in den Tumorzellen. In dieser Arbeit wurde eine Veränderung EMT-spezifischer Marker in Kokultur mit MSC beobachtet.

Für eine komplette EMT ist der Verlust von E-Cadherin entscheidend, welcher mit Dedifferenzierung, Migration und Invasivität einhergeht (Tsanou et al. 2008). Bei dysfunktionalem E-Cadherin zeigte sich ein Verlust des epithelialen und die Ausprägung eines mesenchymalen Phänotyps, welcher durch ein vermehrtes migratorisches Potential geprägt ist (Thiery 2002). Der Verlust von E-Cadherin wurde *in vivo* am invasiven Tumorrand beobachtet, wohingegen E-Cadherin im Tumorzentrum unverändert exprimiert wurde (Brabletz et al. 2001). In dieser Arbeit wurde E-Cadherin bei Kokultur mit MSC in CRC-Zellen weiterhin, tendenziell sogar vermehrt, exprimiert.

Die E-Cadherin Expression wird unter anderem durch Transkriptionsfaktoren beeinflusst: Der Transkriptionsfaktor Snail bindet am Promoter von E-Cadherin und inhibiert so direkt die E-Cadherin Expression (Cano et al. 2000). Slug zählt in die gleiche Gruppe der Transkriptionsfaktoren wie Snail, und inhibiert ebenfalls die E-Cadherin Expression, führt aber auch zur Expression von mesenchymalen Molekülen wie Vimentin (Bolós et al. 2016).

Die Transkriptionsfaktoren Snail und Slug waren in Kokultur mit MSC tendenziell erhöht, ohne jedoch mit einem Rückgang der E-Cadherin Expression verbunden zu sein.

Auch der Transkriptionsfaktor Twist war in Kokultur mit MSC vermehrt exprimiert. Er hat ebenfalls Einfluss auf eine Reduktion von E-Cadherin und geht mit den typischen Veränderungen einer EMT einher: Verlust von Zell-Zell-Kontakten, Expression von mesenchymalen Markern und

Induktion der Zellmotilität. In Mammaepithelzellen zeigte sich der Effekt auch unabhängig von einer Re-Induktion der E-Cadherin Expression. Daher wurde vermutet, dass Twist nicht nur über die Verminderung von E-Cadherin eine EMT herbeiführt, sondern weitere Signalwege beteiligt sind (Yang et al. 2004).

Neben dem epithelialen Marker E-Cadherin existieren mesenchymale Markermoleküle, die bei einer EMT vermehrt exprimiert werden. N-Cadherin wird normalerweise in mesenchymalen Zellen exprimiert, in Tumorzellen kann im Rahmen einer EMT ein „*Cadherin-Switch*“ stattfinden, mit Austausch von E-Cadherin gegen N-Cadherin (Wheelock et al. 2008). Auch bei Koexpression von E-Cadherin und N-Cadherin wurde eine gesteigerte Motilität, Invasivität und Metastasierung beobachtet (Hazan et al. 2000). Vimentin ist ein Intermediärfilament, welches Einfluss auf die Verteilung von Zellorganellen und Membran-assoziierte Proteine hat, bei einer Überexpression resultieren eine veränderte Zellmorphologie und Zellmotilität (Mendez et al. 2010). Die mesenchymalen Marker wurden bei CRC-Zellen in Kokultur mit MSC vermehrt detektiert.

Wie ist nun die scheinbar gegensätzliche Expression von epithelialen und mesenchymalen Markern zu interpretieren? In der Literatur wird eine Betrachtung der EMT als Kontinuum diskutiert, in der unterschiedliche Ausprägungen der mesenchymalen und epithelialen Stadien möglich sind (Nieto et al. 2016). Als *in vivo* Korrelat dieser partiellen EMT wird das „*tumor budding*“ vermutet, bei dem invasive Zellverbände sich vom Primärtumor lösen (Grigore et al. 2016). *In vitro* wurde bereits gezeigt, dass die Expression von E-Cadherin und Vimentin bei Induktion von Snail Zelllinien-spezifisch unterschiedlich ausgeprägt sind, und dass Migration von mehreren Faktoren abhängt (Lundgren et al. 2009). Die Veränderung der EMT-Marker in direktem Kontakt mit MSC kann daher auf eine partielle EMT hinweisen, wie sie bei Tumorzellverbänden in Kontakt mit dem Tumorstroma auch *in vivo* beobachtet wurde. Um die Akquisition von mesenchymalen Eigenschaften wie Migrationspotential und Invasivität trotz erhaltener E-Cadherin Expression bei Kontakt mit MSC beurteilen zu können, müssten weitere Untersuchungen im Sphäroidmodell und *in vivo* erfolgen.

Einschränkend bei der Interpretation der Messungen ist die geringe Fallzahl der Untersuchungen bei einer teilweise starken Schwankungsbreite innerhalb der biologischen Replikate. Dies könnte mit einer zufälligen Selektion bestimmter Eigenschaften durch den Klonierungsprozess zusammenhängen. Die große Standardabweichung ergibt sich außerdem methodenbedingt durch die Bestimmung der relativen mRNA-Expression bei sehr geringer bis fehlende Expression einiger Marker in der Monokultur (siehe 4.4.1). Weiterhin ist zu beachten, dass MSC eine hohe

Expression mesenchymaler Marker wie N-Cadherin und Vimentin aufweisen. Aufgrund der niedrigen Expression der Marker in den CRC-Zellen könnte es selbst bei einer geringen Kontamination mit MSC zu einem falsch-positiven Ergebnis kommen.

Der Verlust von α -Cat zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Veränderung der EMT-Marker. Daher wurde vermutet, dass die EMT über einen anderen, unabhängigen Mechanismus der Interaktion von MSC und CRC gesteuert wird.

5.3.3 Induktion einer TAF-Differenzierung unabhängig von der α -Catenin Expression

Es zeigte sich außerdem eine Veränderung spezifischer TAF-Marker in den MSC bei Kokultur mit CRC-Zellen unabhängig von deren α -Cat Status. Die Expression von FAP schien Zelllinien-spezifisch verändert. In MSC wurde ein erhöhtes mRNA-Level bei Kokultur mit der CRC-Zelllinie HT29 beobachtet. Weiterhin zeigte sich in der Kokultur mit dem jeweiligen Wildtyp der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 unabhängig von der Zelllinie eine unterschiedlich stark ausgeprägte Erhöhung von FAP, SMA, Calponin, MRTF-A und Marker der Kollagensynthese und -interaktion in MSC.

In Publikationen anderer Autoren wird bereits eine Differenzierung von MSC zu TAF beschrieben: Bei der Kultivierung von MSC in einem Tumor-konditioniertem Medium wurde eine myofibroblastäre Differenzierung beobachtet, die u.a. mit einer vermehrten Expression von SMA und einer Förderung des Tumorwachstums *in vivo* assoziiert war (Mishra et al. 2008). Auch in MSC-gemischten Xenograften von Ovarialkarzinomzellen wurde eine *de novo* Expression von SMA, FAP und TNC neben anderen festgestellt, die auf eine Differenzierung der MSC in Kontakt mit den Tumorzellen zurückzuführen waren (Spaeth et al. 2009). Im Mausmodell konnte eine Differenzierung von MSC zu TAF mit Expression von SMA in orthotopen CRC beobachtet werden (Shinagawa et al. 2010).

Zu betonen ist, dass es keinen spezifischen Marker für eine myofibroblastäre Differenzierung gibt. Beispielsweise wird FAP auch in einer bestimmten Untergruppe von Immunzellen exprimiert (Kalluri 2016). Auch eine Erhöhung von SMA, ein allgemein akzeptierter Marker für eine TAF-Differenzierung, ist kein definitiver Marker (Madar et al. 2013).

Ein wichtiges Kennzeichen von TAF ist auch die Produktion von ECM-Komponenten, welche zum reaktiven Stroma beitragen: Durch die gesteigerte Expression von Kollagen Typ I und Typ III wird eine Änderung der Tumorumgebung induziert, die potenziell zu einer Tumorprogression führen kann (Kalluri und Zeisberg 2006). Im CRC wurde ein vermehrtes Vorkommen von Kollagen Typ I an der invasiven Front nachgewiesen; in der Zellkultur führt Kollagen Typ I über einen β 1-Int

abhängigen Signalweg zu einer transienten Dedifferenzierung (Brabletz et al. 2004). Weiterhin reduzierte der Kontakt der Tumorzellen mit der Kollagen-reichen ECM über Integrine die Expression von E-Cadherin und induzierte einen mesenchymalen Phänotyp (Kirkland 2009). Kollagen Typ I wurde auch als relevant für die Integrin-vermittelte Wachstumsförderung von CRC-Zellen durch MSC identifiziert (Widder et al. 2016).

Daher kann die Induktion der Kollagensynthese sowie die Erhöhung einzelner anderer TAF-Marker in MSC durch die CRC-Zellen *in vitro* durchaus als Hinweis auf eine Differenzierung zu TAF gewertet werden. Um die Relevanz der gemessenen Veränderungen weiter beleuchten zu können, müsste zunächst eine Bestimmung der Marker auf translationaler Ebene folgen.

Die α -Cat Expression in den CRC-Zellen beeinflusste die Differenzierung von MSC zu TAF nicht, vergleichbar also mit dem fehlenden Einfluss des α -Cat kd auf die Expression von EMT-Markern in CRC-Zellen.

Kritisch gegenüber der Analyse der EMT- und TAF-Marker in dieser Arbeit anzumerken ist, dass die Untersuchungen in Kulturen von *Monolayern* durchgeführt wurden, mit einer Beschränkung der Zell-Zell-Interaktionen auf den zweidimensionalen Raum. Es ist möglich, dass das Fehlen von α -Cat einen Effekt ausübt, der allerdings erst im dreidimensionalen Raum deutlich wird, analog zur MSC-vermittelten Ausbildung einer Tumorarchitektur. Untersuchungen der TAF-Marker in einer Sphäroidkultur oder *in vivo* könnten diese Fragestellung erforschen.

5.4 Mechanismen der Interaktion zwischen MSC und CRC-Zellen *in vivo*

5.4.1 Wachstumsförderung von CRC-Zellen durch MSC

Durch die Arbeitsgruppe wurde bereits eine Förderung des Tumorwachstums von CRC durch Tumor-integrierte MSC beschrieben (Luetzkendorf et al. 2010). In der Literatur wurden darüber hinaus eine Wachstumsförderung von orthotopen CRC durch systemisch applizierte MSC (Shinagawa et al. 2010) und eine TGF- β vermittelte Förderung des Tumorwachstums von CRC *in vivo* festgestellt (Mele et al. 2014). MSC scheinen unter bestimmten Voraussetzungen auch die Entstehung von CRC zu ermöglichen, sowie die Etablierung von CRC-Xenograften zu unterstützen (Tsai et al. 2011). In dieser Arbeit förderten MSC ebenfalls das Tumorwachstum der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 im Mischxenograft.

Das gewählte Modell des Mischxenografts geht von Tumor-integrierten MSC aus. Ein Vorkommen von ursprünglich aus dem Knochenmark entstammenden Zellen in malignen Tumoren wurde beschrieben. Im Tiermodell stellten diese einen Anteil von bis zu 25 % an Zellen mit myofibroblastären Phänotyp dar (Direkze et al. 2004). Im humanen Organismus wurden

Zellen aus dem Knochenmark mit einem Anteil von bis zu 6 % in malignen Tumoren festgestellt (Avital et al. 2007). Inwieweit MSC einen Teil der aus dem Knochenmark stammenden Zellen darstellen, ist aufgrund eines fehlenden eindeutigen Markers bislang nicht geklärt (Fox et al. 2007). Jedoch treten MSC auch als Perizyten im Organismus auf (Crisan et al. 2008), sodass ein Kontakt von MSC mit im Blutkreislauf zirkulierenden Tumorzellen oder nach der Extravasation denkbar wäre. Als Perizyten besteht eine weitere mögliche Rolle der MSC als Bereiter einer prämetastatischen Nische, d.h. sie modifizieren das Mikromilieu des jeweiligen Organs, um so ein Anwachsen der Tumorzellen zu ermöglichen (Psaila und Lyden 2009).

5.4.2 Zelllinien-spezifische Wachstumsförderung von α -Catenin defizienten CRC-Zellen durch MSC

Der Verlust von E-Cadherin und Cateninen stellt einen bedeutenden Schritt bei der Invasion und Metastasierung dar (Tsanou et al. 2008) und im CRC ist die Expression häufig reduziert (El-Bahrawy et al. 2001). α -Cat scheint über seine Rolle als Teil des E-Cadherin/Catenin-Komplex hinaus bedeutend zu sein, sein Verlust korreliert mit invasivem Wachstum und dem Auftreten von Metastasen, die über dem bei E-Cadherin Defizienz hinaus geht (Gofuku et al. 1999). Eine E-Cadherin Defizienz findet sich auch *in vivo* am invasiven Rand des Tumors (Brabletz et al. 2005). Es wird vermutet, dass α -Cat defiziente Zellen vor allem am Tumorrand oder als metastatische Zellen mit dem Tumorstroma und MSC in Verbindung stehen. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass vor allem das frühe Xenograftwachstum der CRC-Zellen durch MSC gefördert werden. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass MSC als Perizyten die Ansiedlung von metastatischen CRC-Zellen unterstützen (Widder et al. 2016). Das Mischxenograft dient als Modell für diesen direkten Kontakt von Tumorzellen und MSC: Es basiert auf der Ansiedlung und nachfolgendem Wachstum maligner Zellen, und simuliert damit Prozesse wie Metastasierung oder lokales invasives Wachstum des Primärtumors. Im Rahmen dieser Arbeit förderten MSC spezifisch das Wachstum der α -Cat defizienten Zellen der CRC-Zelllinie DLD1 im Mischxenograft, während bei den α -Cat defizienten Zellen der HT29 keine Förderung stattfand.

Der Zelllinien-spezifische Unterschied bei der Interaktion mit MSC könnte mit dem heterogenen Mutationsstatus zusammenhängen. Insgesamt ist das CRC von multiplen Mutationen geprägt (Markowitz und Bertagnolli 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei CRC-Zelllinien mit differentiellem Mutationsstatus verwendet: DLD1 (TP53 mutiert, KRAS mutiert, BRAF WT) und HT29 (TP53 mutiert, KRAS WT, BRAF mutiert) (Ahmed et al. 2013). Beide Zelllinien wiesen jedoch initial ein funktionelles E-Cadherin-System auf: für HT29 und DLD1 wurde eine stabile Expression

von E-Cadherin und β -Catenin gezeigt (Buck et al. 2007), die α -Cat Expression wurde im Rahmen dieser Arbeit bestätigt. Einen Unterschied in der Expression von β 1-Int wurde bereits im vorherigen Kapitel diskutiert (Abschnitt 5.3.1), möglich wären aber auch andere Mutationen.

Somit wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass MSC das Tumorwachstum α -Cat defizienter CRC-Zellen *in vivo* spezifisch fördern. Pathophysiologisch wäre eine Förderung der Ansiedlung von metastatischen Tumorzellen durch perivaskuläre oder Tumor-integrierte MSC denkbar. Es wurde vermutet, dass der Mechanismus der MSC-vermittelten Förderung auf der Ausbildung einer Tumorarchitektur beruht. Analog zur Kompensation der Sphäroidbildung durch MSC zeigte sich *in vivo* eine fehlende Wachstumsförderung der α -Cat defizienten Zellen der CRC-Zelllinie HT29. An der Interaktion *in vitro* war das Zelladhäsionsprotein β 1-Integrin beteiligt, welches in den untersuchten CRC-Zelllinien differentiell exprimiert wurde. Dies könnte die Zelllinien-spezifische Förderung des Tumorwachstums α -Cat defizienter Zellen durch MSC erklären. Um die Bedeutung von β 1-Int im Rahmen des untersuchten Mechanismus abschließend zu klären, wären weitere Untersuchungen notwendig. Möglich wäre die Etablierung eines kd von β 1-Int in den bereits α -Cat defizienten Zellen der DLD1-Linie. Würde analog zu den α -Cat defizienten Zellen der HT29-Linie keine Wachstumsförderung durch MSC mehr stattfinden? In weiterführenden Untersuchungen sollte die klinische Relevanz der MSC-vermittelten differentiellen Wachstumsförderung im Fokus stehen. Hierbei wäre u.a. der Zeitpunkt und der Ort der Interaktion von α -Cat defizienten Tumorzellen mit MSC im Verlauf der Tumorprogression z.B. anhand der Untersuchung histologischer Proben von Patienten in unterschiedlichen Erkrankungsstadien zu ermitteln.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Wachstum des CRCs wird maßgeblich von einem heterogenen Mutationsstatus und durch die Interaktion mit dem Tumorstroma geprägt. Das Zelladhäsionsprotein α -Cat spielt eine wichtige Rolle bei Tumorwachstum und -progression. MSC sind Teil des Tumorstromas und als solches vermutlich in Kontakt mit den Tumorzellen. In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle von α -Cat bei der MSC-vermittelten Wachstumsförderung in CRC-Zellen mit heterogenem Mutationsstatus bestimmt werden.

In den CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 wurde mittels shRNA- und CRISPR/Cas9-System ein Modell von α -Cat defizienten CRC-Zellen mit heterogenem Mutationsstatus etabliert. Der α -Cat Status zeigte keinen Einfluss auf die Proliferation der CRC-Zellen *in vitro*. Die veränderte Morphologie der α -Cat defizienten Zellen *in vitro* war am ehesten auf defizitäre Zell-Zell-Kontakte zurückzuführen.

Im 3D-Sphäroidassay bildeten α -Cat exprimierende CRC-Zellen der DLD1 und HT29 kompakte Sphäroide. Die α -Cat defizienten CRC-Zellen verloren die Fähigkeit zur Ausbildung einer kompakten dreidimensionalen Tumorstruktur. MSC kompensierten die Bildung von Sphäroiden nur in den α -Cat kd Zellen der CRC-Zelllinie DLD1 in Abhängigkeit von funktionellem β 1-Int. In den α -Cat defizienten Zellen der Linie HT29 konnte die Sphäroidbildung durch MSC nicht wiederhergestellt werden.

Sowohl auf transkriptioneller und translationaler Ebene als auch in der Oberflächenexpression von β 1-Int in den CRC-Zellen fanden sich keine Veränderungen im Zusammenhang mit dem α -Cat kd. Die differentielle Ausprägung der β 1-Int Banden im Western-Blot könnte auf qualitativen Unterschieden in der β 1-Int Proteinexpression zwischen den CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 beruhen.

Die EMT-Induktion in den CRC-Zellen bzw. Induktion einer TAF-Differenzierung in MSC wurde auf der transkriptionellen Ebene in einer 2D-Kokultur untersucht. In der Kokultur von CRC-Zellen mit MSC waren die untersuchten Marker differentiell zur Monokultur exprimiert, was auf eine EMT-Induktion bzw. TAF-Differenzierung hinweisen könnte. Bei der Ausprägung von einzelnen Markern wurden Zelllinien-spezifische Unterschiede beobachtet. Der α -Cat kd der CRC-Zellen zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Marker.

Im murinen Xenograft-Modell förderten MSC das Wachstum der α -Cat exprimierenden CRC-Zellen. Analog zu den Ergebnissen im Sphäroidmodell wurde *in vivo* nur das Tumorwachstum

der α -Cat defizienten Zellen der Linie DLD1 durch MSC gefördert, jedoch nicht das Wachstum der HT29.

Somit wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass das Tumorwachstum von α -Cat defizienten CRC-Zellen differentiell durch MSC gefördert wird. Ein möglicher Mechanismus könnte der Aufbau einer von β 1-Int abhängigen Tumorarchitektur sein. Ein Zelllinien-spezifischer Unterschied in der β 1-Int Proteinexpression könnte die differente MSC-vermittelte Förderung α -Cat defizienter CRC-Zellen erklären.

Dieses Ergebnis trägt zum Verständnis der Tumor-Stroma-Interaktion bei Krankheitsprogression und Metastasierung bei. In zukünftigen Arbeiten sollte die Relevanz von β 1-Int bei der MSC-vermittelten Wachstumsförderung mittels β 1-Int kd in α -Cat defizienten CRC-Zellen zunächst im Sphäroidmodell und anschließend im Mischxenograft untersucht werden. Diese Beobachtungen müssten dann in Proben aus humanen Tumoren bzw. in *patient-derived xenografts* validiert werden. Hiervon ausgehend werden sich Angriffspunkte für zielgerichtete Therapien identifizieren lassen.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknæs M, Hektoen M, Lind GE, Lothe RA (2013) Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis* 2:e71. doi:10.1038/oncsis.2013.35

Aurich I, Mueller LP, Aurich H, Luetzkendorf J, Tisljar K, Dollinger MM, Schormann W, Walldorf J, Hengstler JG, Fleig WE, Christ B (2007) Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* 56:405–415. doi:10.1136/gut.2005.090050

Avital I, Moreira AL, Klimstra DS, Leversha M, Papadopoulos EB, Brennan M, Downey RJ (2007) Donor-derived human bone marrow cells contribute to solid organ cancers developing after bone marrow transplantation. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25:2903–2909. doi:10.1634/stemcells.2007-0409

Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstein B (1990) p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer research* 50:7717–7722.

Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I (2004) Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 22:675–682. doi:10.1634/stemcells.22-5-675

Bellis SL, Newman E, Friedman EA (1999) Steps in integrin beta1-chain glycosylation mediated by TGFbeta1 signaling through Ras. *Journal of cellular physiology* 181:33–44. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199910)181:1<33::AID-JCP4>3.0.CO;2-#

Bellis SL (2004) Variant glycosylation: an underappreciated regulatory mechanism for beta1 integrins. *Biochimica et biophysica acta* 1663:52–60. doi:10.1016/j.bbamem.2004.03.012

Benjamin JM, Nelson WJ (2008) Bench to bedside and back again: molecular mechanisms of alpha-catenin function and roles in tumorigenesis. *Seminars in cancer biology* 18:53–64. doi:10.1016/j.semcancer.2007.08.003

Bianconi D, Unseld M, Prager GW (2016) Integrins in the Spotlight of Cancer. *International journal of molecular sciences* 17. doi:10.3390/ijms17122037

Bolós V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano A (2016) The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions:

a comparison with Snail and E47 repressors. *Journal of Cell Science* 129:1283. doi:10.1242/jcs.188243

Böyum A (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum* 97:77–89

Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T (2001) Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:10356–10361. doi:10.1073/pnas.171610498

Brabletz T, Spaderna S, Kolb J, Hlubek F, Faller G, Bruns CJ, Jung A, Nentwich J, Duluc I, Domon-Dell C, Kirchner T, Freund J-N (2004) Down-regulation of the homeodomain factor Cdx2 in colorectal cancer by collagen type I: an active role for the tumor environment in malignant tumor progression. *Cancer research* 64:6973–6977. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1132

Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T (2005) Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nature reviews. Cancer* 5:744–749. doi:10.1038/nrc1694

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. doi:10.3322/caac.21492

Buck E, Eyzaguirre A, Barr S, Thompson S, Sennello R, Young D, Iwata KK, Gibson NW, Cagnoni P, Haley JD (2007) Loss of homotypic cell adhesion by epithelial-mesenchymal transition or mutation limits sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition. *Molecular cancer therapeutics* 6:532–541. doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0462

Byers SW, Sommers CL, Hoxter B, Mercurio AM, Tozeren A (1995) Role of E-cadherin in the response of tumor cell aggregates to lymphatic, venous and arterial flow: measurement of cell-cell adhesion strength. *Journal of cell science* 108 (Pt 5):2053–2064.

Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature cell biology* 2:76–83. doi:10.1038/35000025

- Cogle CR, Theise ND, Fu D, Ucar D, Lee S, Guthrie SM, Lonergan J, Rybka W, Krause DS, Scott EW (2007) Bone marrow contributes to epithelial cancers in mice and humans as developmental mimicry. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25:1881–1887. doi:10.1634/stemcells.2007-0163
- Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C-W, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng P-N, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring H-J, Giacobino J-P, Lazzari L, Huard J, Péault B (2008) A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell* 3:301–313. doi:10.1016/j.stem.2008.07.003
- Daugherty RL, Serebryanny L, Yemelyanov A, Flozak AS, Yu H-J, Kosak ST, deLanerolle P, Gottardi CJ (2014) α -Catenin is an inhibitor of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:5260–5265. doi:10.1073/pnas.1308663111
- Di Nicola M (2002) Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99:3838–3843. doi:10.1182/blood.V99.10.3838
- Direkze NC, Forbes SJ, Brittan M, Hunt T, Jeffery R, Preston SL, Poulson R, Hovalala-Dilke K, Alison MR, Wright NA (2003) Multiple organ engraftment by bone-marrow-derived myofibroblasts and fibroblasts in bone-marrow-transplanted mice. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 21:514–520. doi:10.1634/stemcells.21-5-514
- Direkze NC, Hovalala-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulson R, Oukrif D, Alison MR, Wright NA (2004) Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts. *Cancer research* 64:8492–8495. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1708
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315–317. doi:10.1080/14653240600855905
- Dvorak HF (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England journal of medicine* 315:1650–1659. doi:10.1056/NEJM198612253152606
- El-Bahrawy MA, Poulson R, Jeffery R, Talbot I, Alison MR (2001) The expression of E-cadherin and catenins in sporadic colorectal carcinoma. *Human pathology* 32:1216–1224. doi:10.1053/hupa.2001.28948

- Erices A, Conget P, Minguell JJ (2000) Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British journal of haematology* 109:235–242. doi:10.1046/j.1365-2141.2000.01986.x
- Fabre M, García de Herreros A (1993) Phorbol ester-induced scattering of HT-29 human intestinal cancer cells is associated with down-modulation of E-cadherin. *Journal of cell science* 106 (Pt 2):513–521
- Fearon ER (2011) Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual review of pathology* 6:479–507. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130235
- Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA, Middleton J (2007) Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *British journal of haematology* 137:491–502. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06610.x
- Franceschi N de, Hamidi H, Alanko J, Sahgal P, Ivaska J (2015) Integrin traffic - the update. *Journal of cell science* 128:839–852. doi:10.1242/jcs.161653
- Francí C, Takkunen M, Dave N, Alameda F, Gómez S, Rodríguez R, Escrivà M, Montserrat-Sentís B, Baró T, Garrido M, Bonilla F, Virtanen I, García de Herreros A (2006) Expression of Snail protein in tumor-stroma interface. *Oncogene* 25:5134–5144. doi:10.1038/sj.onc.1209519
- Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart LA (2007) Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge? *International journal of radiation biology* 83:849–871. doi:10.1080/09553000701727531
- Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park E-C, Lu N, Selig M, Nielsen G, Taksir T, Jain RK, Seed B (1998) Tumor Induction of VEGF Promoter Activity in Stromal Cells. *Cell* 94:715–725. doi:10.1016/S0092-8674(00)81731-6
- Ganguly KK, Pal S, Moulik S, Chatterjee A (2013) Integrins and metastasis. *Cell Adhesion & Migration* 7:251–261. doi:10.4161/cam.23840
- Ghadimi BM, Behrens J, Hoffmann I, Haensch W, Birchmeier W, Schlag PM (1999) Immunohistological analysis of E-cadherin, alpha-, beta- and gamma-catenin expression in colorectal cancer: implications for cell adhesion and signaling. *European journal of cancer* (Oxford, England : 1990) 35:60–65.
- Gofuku J, Shiozaki H, Tsujinaka T, Inoue M, Tamura S, Doki Y, Matsui S, Tsukita S, Kikkawa N, Monden M (1999) Expression of E-cadherin and alpha-catenin in patients with colorectal carcinoma. Correlation with cancer invasion and metastasis. *American journal of clinical pathology* 111:29–37.

Grigore AD, Jolly MK, Jia D, Farach-Carson MC, Levine H (2016) Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. *Journal of clinical medicine* 5. doi:10.3390/jcm5050051

Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R (2011) Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell communication and signaling : CCS* 9:12. doi:10.1186/1478-811X-9-12

Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA (2000) Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *The Journal of cell biology* 148:779–790. doi:10.1083/jcb.148.4.779

Heitjan DF, Derr JA, Satyaswaroop PG (1992) The multi-site tumour transplantation model for human endometrial carcinoma: a statistical evaluation. *Cell proliferation* 25:193–203. doi:10.1111/j.1365-2184.1992.tb01394.x

Hou J, Zhang Y, Zhu Z (2016) Gene heterogeneity in metastasis of colorectal cancer to the lung. *Seminars in cell & developmental biology*. doi:10.1016/j.semcdb.2016.08.034

Howe GA, Addison CL (2012) beta1 integrin: an emerging player in the modulation of tumorigenesis and response to therapy. *Cell Adhesion & Migration* 6:71–77. doi:10.4161/cam.20077

Ishii G, Sangai T, Oda T, Aoyagi Y, Hasebe T, Kanomata N, Endoh Y, Okumura C, Okuhara Y, Magae J, Emura M, Ochiya T, Ochiai A (2003) Bone-marrow-derived myofibroblasts contribute to the cancer-induced stromal reaction. *Biochemical and biophysical research communications* 309:232–240. doi:10.1016/S0006-291X(03)01544-4

Ivascu A, Kubbies M (2007) Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids. *International journal of oncology*. doi:10.3892/ijo.31.6.1403

Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, Song HY, Kim YM, Cho M, Suh D-S, Yoon M-S, Chang CL, Jung JS, Kim JH (2008) Cancer-derived lysophosphatidic acid stimulates differentiation of human mesenchymal stem cells to myofibroblast-like cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26:789–797. doi:10.1634/stemcells.2007-0742

Jiang X-X, Zhang Y, Liu B, Zhang S-X, Wu Y, Yu X-D, Mao N (2005) Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 105:4120–4126. doi:10.1182/blood-2004-02-0586

Jing Y, Han Z, Liu Y, Sun K, Zhang S, Jiang G, Li R, Gao L, Zhao X, Wu D, Cai X, Wu M, Wei L (2012) Mesenchymal stem cells in inflammation microenvironment accelerates hepatocellular carcinoma metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition. *PLoS one* 7:e43272. doi:10.1371/journal.pone.0043272

Jung Y, Kim JK, Shiozawa Y, Wang J, Mishra A, Joseph J, Berry JE, McGee S, Lee E, Sun H, Wang J, Jin T, Zhang H, Dai J, Krebsbach PH, Keller ET, Pienta KJ, Taichman RS (2013) Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis. *Nature communications* 4:1795. doi:10.1038/ncomms2766

Kalluri R (2016) The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature reviews. Cancer* 16:582–598. doi:10.1038/nrc.2016.73

Kalluri R, Zeisberg M (2006) Fibroblasts in cancer. *Nature reviews. Cancer* 6:392–401. doi:10.1038/nrc1877

Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA (2007) Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449:557–563. doi:10.1038/nature06188

Keating A (2012) Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell stem cell* 10:709–716. doi:10.1016/j.stem.2012.05.015

Khalili AA, Ahmad MR (2015) A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *International journal of molecular sciences* 16:18149–18184. doi:10.3390/ijms160818149

Kinzler KW, Vogelstein B (1996) Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell* 87:159–170. doi:10.1016/S0092-8674(00)81333-1

Kirkland SC (2009) Type I collagen inhibits differentiation and promotes a stem cell-like phenotype in human colorectal carcinoma cells. *British journal of cancer* 101:320–326. doi:10.1038/sj.bjc.6605143

Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG (1999) Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:10711–10716. doi:10.1073/pnas.96.19.10711

Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC, Fine A (2001) Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development (Cambridge, England)* 128:5181–5188. doi:10.1242/dev.128.24.5181

- Kunz-Schughart LA, Kreutz M, Knuechel R (1998) Multicellular spheroids: a three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology. *International journal of experimental pathology* 79:1–23. doi:10.1046/j.1365-2613.1998.00051.x
- Lamouille S, Xu J, Derynck R (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15:178–196. doi:10.1038/nrm3758
- Lampe B von, Stallmach A, Riecken EO (1993) Altered glycosylation of integrin adhesion molecules in colorectal cancer cells and decreased adhesion to the extracellular matrix. *Gut* 34:829–836. doi:10.1136/gut.34.6.829
- Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O (2003) HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology* 31:890–896. doi:10.1016/s0301-472x(03)00110-3
- Liotta LA, Kohn EC (2001) The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411:375–379. doi:10.1038/35077241
- Luetzkendorf J, Mueller LP, Mueller T, Caysa H, Neger K, Schmoll H-J (2010) Growth inhibition of colorectal carcinoma by lentiviral TRAIL-transgenic human mesenchymal stem cells requires their substantial intratumoral presence. *Journal of cellular and molecular medicine* 14:2292–2304. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00794.x
- Lundgren K, Nordenskjöld B, Landberg G (2009) Hypoxia, Snail and incomplete epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *British journal of cancer* 101:1769–1781. doi:10.1038/sj.bjc.6605369
- Madar S, Goldstein I, Rotter V (2013) 'Cancer associated fibroblasts'--more than meets the eye. *Trends in molecular medicine* 19:447–453. doi:10.1016/j.molmed.2013.05.004
- Maffei V, Nicolè L, Cappellesso R (2019) RAS, Cellular Plasticity, and Tumor Budding in Colorectal Cancer. *Frontiers in oncology* 9:1255. doi:10.3389/fonc.2019.01255
- Markowitz SD, Bertagnolli MM (2009) Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 361:2449–2460. doi:10.1056/NEJMra0804588
- Martin FT, Dwyer RM, Kelly J, Khan S, Murphy JM, Curran C, Miller N, Hennessy E, Dockery P, Barry FP, O'Brien T, Kerin MJ (2010) Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumour microenvironment: stimulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT). *Breast cancer research and treatment* 124:317–326. doi:10.1007/s10549-010-0734-1

Matsubara S, Ozawa M (2004) Expression of alpha-catenin in alpha-catenin-deficient cells results in a reduced proliferation in three-dimensional multicellular spheroids but not in two-dimensional monolayer cultures. *Oncogene* 23:2694–2702. doi:10.1038/sj.onc.1207423

McCrea PD, Gottardi CJ (2016) Beyond beta-catenin: prospects for a larger catenin network in the nucleus. *Nature reviews. Molecular cell biology* 17:55–64. doi:10.1038/nrm.2015.3

Mele V, Muraro MG, Calabrese D, Pfaff D, Amatruda N, Amicarella F, Kvinlaug B, Bocelli-Tyndall C, Martin I, Resink TJ, Heberer M, Oertli D, Terracciano L, Spagnoli GC, Iezzi G (2014) Mesenchymal stromal cells induce epithelial-to-mesenchymal transition in human colorectal cancer cells through the expression of surface-bound TGF- β . *International journal of cancer* 134:2583–2594. doi:10.1002/ijc.28598

Melker AA de, Sonnenberg A (1999) Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 21:499–509. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199906)21:6<499::AID-BIES6>3.0.CO;2-D

Mendez MG, Kojima S-I, Goldman RD (2010) Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24:1838–1851. doi:10.1096/fj.09-151639

Minguell JJ, Erices A, Conget P (2001) Mesenchymal stem cells. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 226:507–520. doi:10.1177/153537020122600603

Mishra PJ, Mishra PJ, Humeniuk R, Medina DJ, Alexe G, Mesirov JP, Ganesan S, Glod JW, Banerjee D (2008) Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer research* 68:4331–4339. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0943

Mueller LP, Luetzkendorf J, Mueller T, Reichelt K, Simon H, Schmoll H-J (2006) Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24:2753–2765. doi:10.1634/stemcells.2006-0108

Murtaza BN, Doak S, Morgan C, Nadeem MS, Al-Ghanim KA, Shakoori AR (2016) A Crosstalk Between K ras (Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homologue) and Adherence Molecular Complex Leads to Disassociation of Cells-A Possible Contribution Towards Metastasis in Colorectal Cancer. *Journal of cellular biochemistry* 117:2340–2345. doi:10.1002/jcb.25531

Navab R, Strumpf D, To C, Pasko E, Kim KS, Park CJ, Hai J, Liu J, Jonkman J, Barczyk M, Bandarchi B, Wang YH, Venkat K, Ibrahimov E, Pham N-A, Ng C, Radulovich N, Zhu C-Q, Pintilie M, Wang D, Lu A, Jurisica I, Walker GC, Gullberg D, Tsao M-S (2016) Integrin $\alpha 11\beta 1$ regulates cancer stromal stiffness and promotes tumorigenicity and metastasis in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 35:1899–1908. doi:10.1038/onc.2015.254

Nelson WJ (2008) Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochemical Society transactions* 36:149–155. doi:10.1042/BST0360149

Nguyen DX, Bos PD, Massague J (2009) Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature reviews. Cancer* 9:274–284. doi:10.1038/nrc2622

Nieto MA, Huang RY-J, Jackson RA, Thiery JP (2016) EMT: 2016. *Cell* 166:21–45. doi:10.1016/j.cell.2016.06.028

Nishida S, Endo N, Yamagiwa H, Tanizawa T, Takahashi HE (1999) Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *Journal of bone and mineral metabolism* 17:171–177. doi:10.1007/s007740050081

Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR (1999) Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer research* 59:5002–5011. doi:10.1186/bcr138

Paget S (1989) The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer metastasis reviews* 8:98–101

Perez-Moreno M, Jamora C, Fuchs E (2003) Sticky Business. *Cell* 112:535–548. doi:10.1016/S0092-8674(03)00108-9

Pichard V, Honoré S, Kovacic H, Li C, Prevôt C, Briand C, Rognoni JB (2001) Adhesion, actin cytoskeleton organisation and the spreading of colon adenocarcinoma cells induced by EGF are mediated by $\alpha 2\beta 1$ integrin low clustering through focal adhesion kinase. *Histochemistry and cell biology* 116:337–348. doi:10.1007/s004180100324

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)* 284:143–147

Plumb CL, Adamcic U, Shahrzad S, Minhas K, Adham SAI, Coomber BL (2009) Modulation of the tumor suppressor protein alpha-catenin by ischemic microenvironment. *The American journal of pathology* 175:1662–1674. doi:10.2353/ajpath.2009.090007

- Pokutta S, Drees F, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI (2008) Biochemical and structural analysis of alpha-catenin in cell-cell contacts. *Biochemical Society transactions* 36:141–147. doi:10.1042/BST0360141
- Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonné A, Delorme B, Héroult O, Charbord P, Domenech J (2007) The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25:1737–1745. doi:10.1634/stemcells.2007-0054
- Psaila B, Lyden D (2009) The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nature reviews. Cancer* 9:285–293. doi:10.1038/nrc2621
- Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE (2002) Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418:934. doi:10.1038/418934a
- Rasmusson I (2006) Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Experimental cell research* 312:2169–2179. doi:10.1016/j.yexcr.2006.03.019
- Rhee K-J, Lee JI, Eom YW (2015) Mesenchymal Stem Cell-Mediated Effects of Tumor Support or Suppression. *International journal of molecular sciences* 16:30015–30033. doi:10.3390/ijms161226215
- Rigot V, Lehmann M, André F, Daemi N, Marvaldi J, Luis J (1998) Integrin ligation and PKC activation are required for migration of colon carcinoma cells. *Journal of cell science* 111 (Pt 20):3119–3127
- Risio M (2010) The natural history of adenomas. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 24:271–280. doi:10.1016/j.bpg.2010.04.005
- Salicioni AM, Gaultier A, Brownlee C, Cheezum MK, Gonias SL (2004) Low density lipoprotein receptor-related protein-1 promotes beta1 integrin maturation and transport to the cell surface. *The Journal of biological chemistry* 279:10005–10012. doi:10.1074/jbc.M306625200
- Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H (2008) Mesenchymal Stem Cells Are Recruited into Wounded Skin and Contribute to Wound Repair by Transdifferentiation into Multiple Skin Cell Type. *The Journal of Immunology* 180:2581–2587. doi:10.4049/jimmunol.180.4.2581
- Scott JA, Yap AS (2006) Cinderella no longer: alpha-catenin steps out of cadherin's shadow. *Journal of cell science* 119:4599–4605. doi:10.1242/jcs.03267

- Shaikh FM, Seales EC, Clem WC, Hennessy KM, Zhuo Y, Bellis SL (2008) Tumor cell migration and invasion are regulated by expression of variant integrin glycoforms. *Experimental cell research* 314:2941–2950. doi:10.1016/j.yexcr.2008.07.021
- Shibue T, Weinberg RA (2009) Integrin beta1-focal adhesion kinase signaling directs the proliferation of metastatic cancer cells disseminated in the lungs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:10290–10295. doi:10.1073/pnas.0904227106
- Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H, Takeyama H (2015) Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers* 7:2443–2458. doi:10.3390/cancers7040902
- Shih DT-b, Lee D-C, Chen S-C, Tsai R-Y, Huang C-T, Tsai C-C, Shen E-Y, Chiu W-T (2005) Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 23:1012–1020. doi:10.1634/stemcells.2004-0125
- Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, Higashi Y, Tanaka S, Yasui W, Chayama K (2010) Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *International journal of cancer* 127:2323–2333. doi:10.1002/ijc.25440
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute* 82:1107–1112. doi:10.1093/jnci/82.13.1107
- Song J, Zhang J, Wang J, Cao Z, Wang J, Guo X, Dong W (2014) beta1 integrin modulates tumor growth and apoptosis of human colorectal cancer. *Oncology reports* 32:302–308. doi:10.3892/or.2014.3168
- Song J, Zhang J, Wang J, Wang J, Guo X, Dong W (2015) beta1 integrin mediates colorectal cancer cell proliferation and migration through regulation of the Hedgehog pathway. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 36:2013–2021. doi:10.1007/s13277-014-2808-x
- Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, Hall B, Andreeff M, Marini F (2009) Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PloS one* 4:e4992. doi:10.1371/journal.pone.0004992
- Strnad H, Lacina L, Kolár M, Cada Z, Vlcek C, Dvoránková B, Betka J, Plzák J, Chovanec M, Sáchová J, Valach J, Urbanová M, Smetana K (2010) Head and neck squamous cancer stromal fibroblasts

produce growth factors influencing phenotype of normal human keratinocytes. *Histochemistry and cell biology* 133:201–211. doi:10.1007/s00418-009-0661-6

Suzuki K, Sun R, Origuchi M, Kanehira M, Takahata T, Itoh J, Umezawa A, Kijima H, Fukuda S, Saijo Y (2011) Mesenchymal stromal cells promote tumor growth through the enhancement of neovascularization. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 17:579–587. doi:10.2119/molmed.2010.00157

Talmadge JE, Fidler IJ (2010) AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer research* 70:5649–5669. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1040

Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews. Cancer* 2:442–454. doi:10.1038/nrc822

Thiery JP, Sleeman JP (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature reviews. Molecular cell biology* 7:131–142. doi:10.1038/nrm1835

Tsai K-S, Yang S-H, Lei Y-P, Tsai C-C, Chen H-W, Hsu C-Y, Chen L-L, Wang H-W, Miller SA, Chiou S-H, Hung M-C, Hung S-C (2011) Mesenchymal stem cells promote formation of colorectal tumors in mice. *Gastroenterology* 141:1046–1056. doi:10.1053/j.gastro.2011.05.045

Tsanou E, Peschos D, Batistatou A, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K (2008) The E-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach. *Anticancer research* 28:3815–3826

Valtieri M, Sorrentino A (2008) The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis. *Journal of cellular physiology* 217:296–300. doi:10.1002/jcp.21521

van den Eynden GG, Majeed AW, Illemann M, Vermeulen PB, Bird NC, Høyer-Hansen G, Eefsen RL, Reynolds AR, Brodt P (2013) The multifaceted role of the microenvironment in liver metastasis: biology and clinical implications. *Cancer research* 73:2031–2043. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3931

Vasioukhin V, Bauer C, Degenstein L, Wise B, Fuchs E (2001) Hyperproliferation and Defects in Epithelial Polarity upon Conditional Ablation of α -Catenin in Skin. *Cell* 104:605–617. doi:10.1016/S0092-8674(01)00246-X

Vassos N, Rau T, Merkel S, Feiersinger F, Geppert CI, Sturzl M, Hohenberger W, Croner RS (2014) Prognostic value of beta1 integrin expression in colorectal liver metastases. *International journal of clinical and experimental pathology* 7:288–300

- Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL (2008) The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nature reviews. Drug discovery* 7:979–987. doi:10.1038/nrd2656
- Vermeulen SJ, Nollet F, Teugels E, Philippe J, Speleman F, van Roy FM, Bracke ME, Mareel MM (1997) Mutation of alpha-catenin results in invasiveness of human HCT-8 colon cancer cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 833:186–189
- Watabe M, Nagafuchi A, Tsukita S, Takeichi M (1994) Induction of polarized cell-cell association and retardation of growth by activation of the E-cadherin-catenin adhesion system in a dispersed carcinoma line. *The Journal of cell biology* 127:247–256. doi:10.1083/jcb.127.1.247
- Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR (2008) Cadherin switching. *Journal of cell science* 121:727–735. doi:10.1242/jcs.000455
- Widder M, Lutzkendorf J, Caysa H, Unverzagt S, Wickenhauser C, Benndorf RA, Schmoll H-J, Muller-Tidow C, Muller T, Muller LP (2016) Multipotent mesenchymal stromal cells promote tumor growth in distinct colorectal cancer cells by a beta1-integrin-dependent mechanism. *International journal of cancer* 138:964–975. doi:10.1002/ijc.29844
- Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, Andrian UH von, Deryugina EI, Strongin AY, Bröcker E-B, Friedl P (2003) Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *The Journal of cell biology* 160:267–277. doi:10.1083/jcb.200209006
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB (2000) Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of neuroscience research* 61:364–370. doi:10.1002/1097-4547(20000815)61:4<364::AID-JNR2>3.0.CO;2-C
- Xouri G, Christian S (2010) Origin and function of tumor stroma fibroblasts. *Seminars in cell & developmental biology* 21:40–46. doi:10.1016/j.semcdb.2009.11.017
- Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117:927–939. doi:10.1016/j.cell.2004.06.006
- Yoshida T, Akatsuka T, Imanaka-Yoshida K (2015) Tenascin-C and integrins in cancer. *Cell Adhesion & Migration* 9:96–104. doi:10.1080/19336918.2015.1008332
- Yu Y, Xiao C-H, Tan L-D, Wang Q-S, Li X-Q, Feng Y-M (2014) Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- β signalling. *British journal of cancer* 110:724–732. doi:10.1038/bjc.2013.768

Yuhás JM, Li AP, Martínez AO, Ladman AJ (1977) A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer research* 37:3639–3643

Zoltan-Jones A, Huang L, Ghatak S, Toole BP (2003) Elevated hyaluronan production induces mesenchymal and transformed properties in epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* 278:45801–45810. doi:10.1074/jbc.M308168200

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, Ugarte DA de, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell* 13:4279–4295. doi:10.1091/mbc.e02-02-0105

Zvibel I, Halpern Z, Papa M (1998) Extracellular matrix modulates expression of growth factors and growth-factor receptors in liver-colonizing colon-cancer cell lines. *International journal of cancer* 77:295–301. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19980717)77:2<295::AID-IJC20>3.0.CO;2-9

8 THESEN

1. Die α -Cat Expression beeinflusst die Biologie der Tumorzellen im CRC sowie deren Interaktion mit dem Tumorstroma und insbesondere MSC.
2. In den CRC-Zellen der Linien DLD1 und HT29 mit heterogenem Mutationsstatus wurde mittels shRNA- oder CRISPR/Cas9-Methode ein α -Cat kd etabliert. Die Proliferation *in vitro* war unabhängig vom α -Cat Status der CRC-Zellen.
3. Unter 3D-Kulturbedingungen verloren α -Cat defiziente CRC-Zellen ihre Fähigkeit zur Sphäroidbildung. MSC kompensierten die Sphäroidbildung in α -Cat defizienten CRC-Zellen der Linie DLD1 in Abhängigkeit von funktionellem β 1-Int. Hingegen wurde die Sphäroidbildung der α -Cat defizienten HT29-Zellen durch MSC nicht wiederhergestellt.
4. MSC förderten das Tumorstromawachstum von α -Cat exprimierenden CRC-Zellen *in vivo*. Analog zur Sphäroidbildung blieb die Förderung des Xenograftwachstums nur in α -Cat defizienten CRC-Zellen der Linie DLD1 erhalten. Das *in vivo* Wachstum von α -Cat kd Zellen der HT29 wurde nicht mehr durch MSC gefördert.
5. Die Expression von β 1-Int war unabhängig vom α -Cat Status der CRC-Zellen gegeben. Es gab Hinweise auf qualitative Unterschiede in der Proteinexpression von β 1-Int zwischen den Zelllinien DLD1 und HT29 unabhängig von der α -Cat Expression der CRC-Zellen.
6. Der α -Cat Status zeigte keinen Einfluss auf eine mögliche EMT-Induktion in CRC-Zellen bzw. eine TAF-Differenzierung in MSC in einer *in vitro* Kokultur.
7. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für eine differentielle Interaktion von MSC mit CRC-Zellen, für die α -Cat relevant ist. Die Unterschiede in der MSC-vermittelten Wachstumsförderung α -Cat defizienter CRC-Zellen könnte durch eine qualitativ veränderte β 1-Int Expression erklärbar sein.
8. Die Erkenntnisse dieser Arbeit tragen zum Verständnis der komplexen Tumor-Stroma-Interaktion bei und zeigen die wichtige Rolle, welche die transkriptionelle Signatur der CRC-Zellen bei der Stroma-vermittelten Wachstumsförderung spielt.

ANLAGEN

Abbildungen

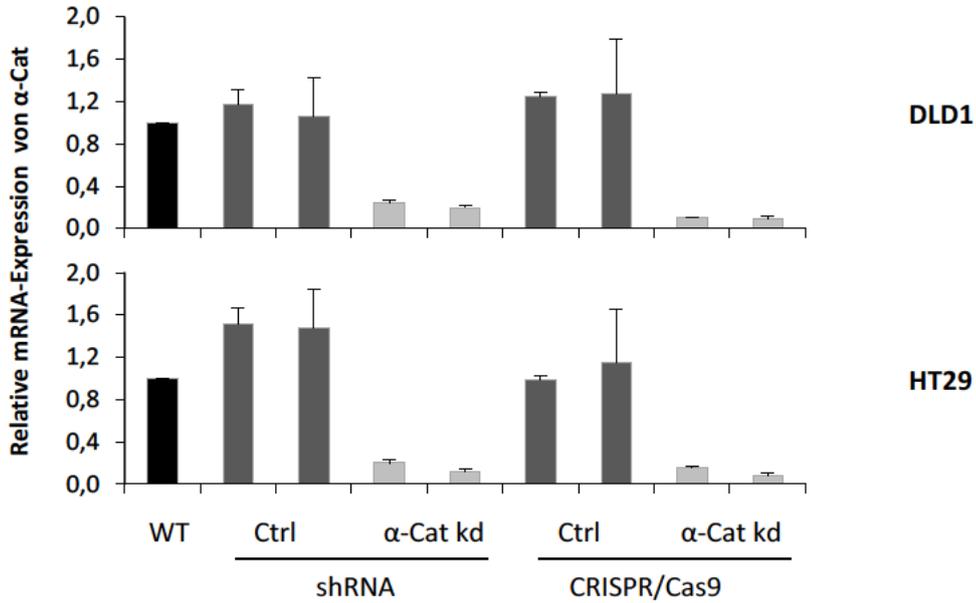


Abb. A1: Analyse der mRNA-Expression von α -Cat. Mittels qPCR ermittelte relative mRNA-Expression in α -Cat kd (mittels shRNA bzw. CRISPR/Cas9 transduzierte sowie klonierte) CRC-Zellen und Kontrollen (Ctrl) der Linien DLD1 und HT29 *in vitro*, vergleichend gegenüber dem Wildtyp (WT). MW \pm Stabw einer internen Wiederholung.

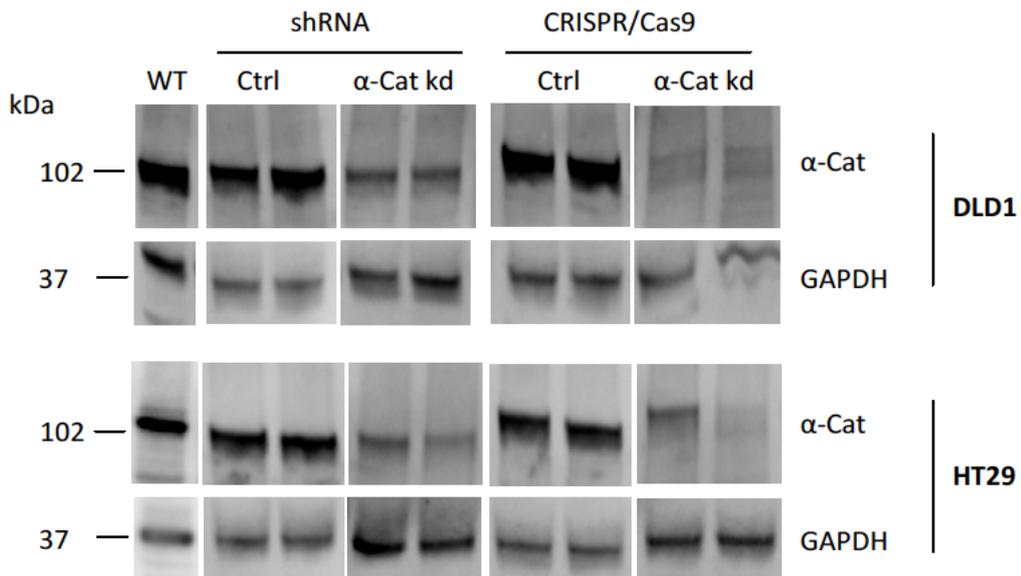


Abb. A2: Analyse der α -Cat Proteinexpression in α -Cat kd CRC-Zellen. Western-Blot Analyse der Proteinexpression von α -Cat (102 kDa) in α -Cat kd (mittels shRNA bzw. CRISPR/Cas9 transduzierte und klonierte) CRC-Zellen gegenüber der Expression in den Kontrollen (Ctrl) und Wildtyp (WT) der Linien DLD1 und HT29 *in vitro*. GAPDH (37 kDa) als Ladekontrolle.

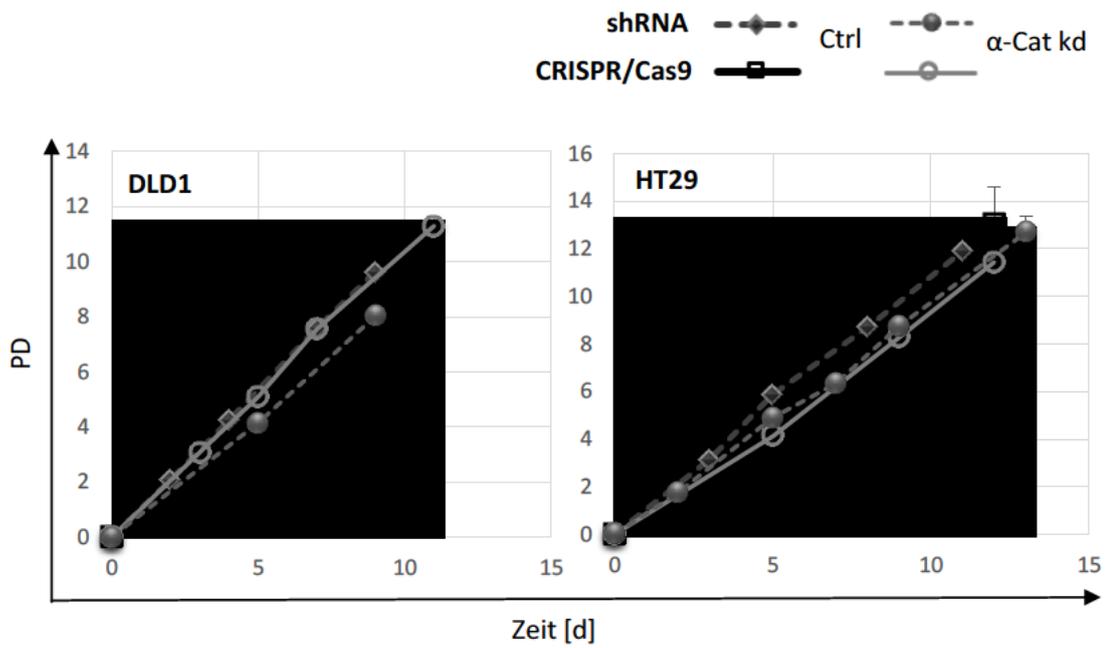


Abb. A3: Wachstumskinetik von α -Cat kd Zellen *in vitro*. Zellkulturen von Zellen mit α -Cat kd mittels shRNA- oder CRISPR/Cas9-Methode und deren Kontrollen (Ctrl) der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29, Darstellung der Populationsverdopplung (PD) als MW \pm Stabw aus 2 unabhängigen Experimenten über ≥ 4 Passagen und ≥ 9 Tage.

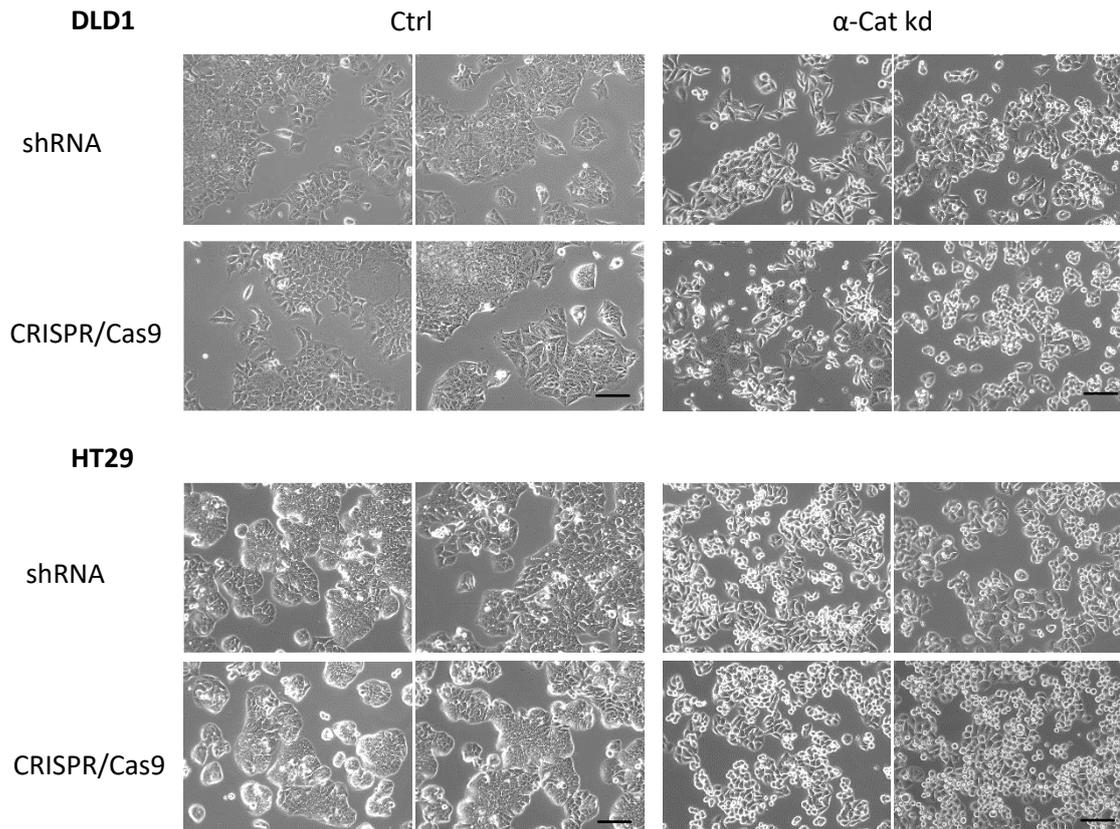


Abb. A4: Unterschiede in der Zellmorphologie *in vitro* von α -Cat kd Zellen und α -Cat exprimierenden Kontrollen. Lichtmikroskopische Aufnahmen der 2D-Kultur von α -Cat kd-Zellen via shRNA- oder CRISPR/Cas9-Methode im Vergleich zu den Kontrollen (Ctrl) der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29, Balken – 100 μ m.

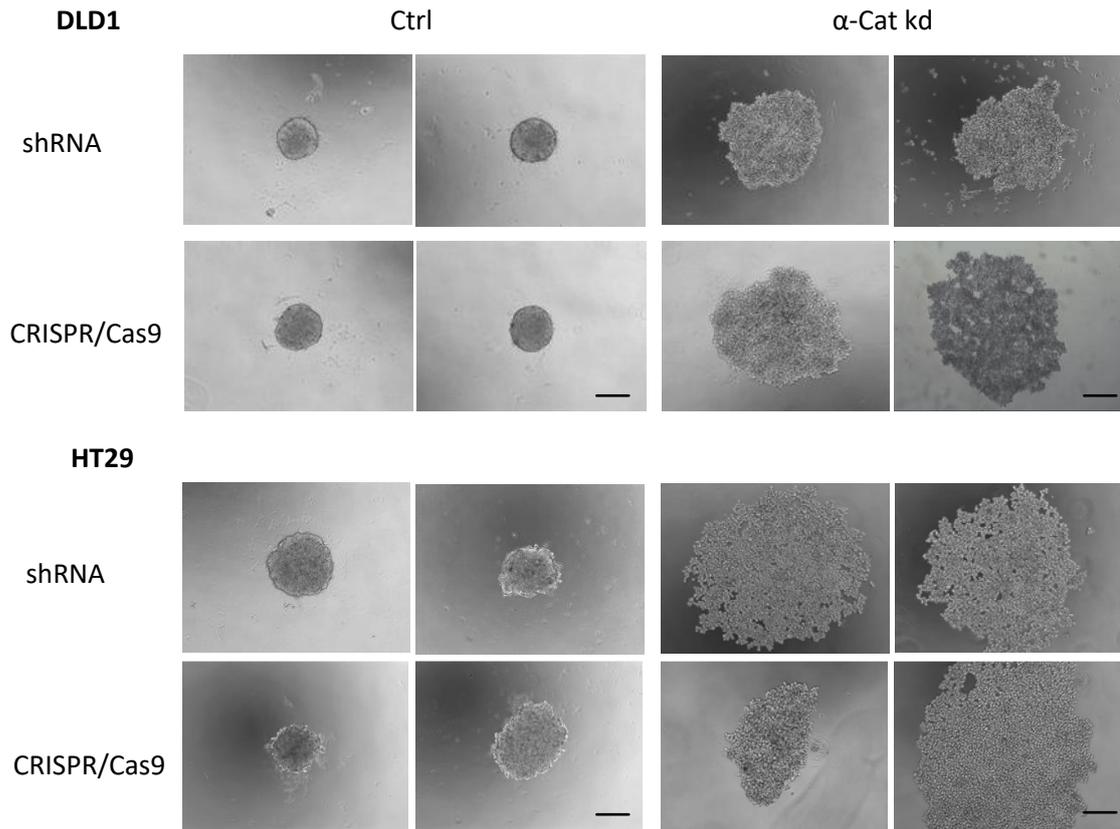


Abb. A5: Einfluss der α -Cat-Expression auf die Sphäroidbildung. Lichtmikroskopische Aufnahmen von 3D-Sphäroidkulturen von Zellen mit α -Cat kd via shRNA- oder CRISPR/Cas9-Methode und Kontrollen (Ctrl) der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29, Balken – 200 μ m, n = 4.

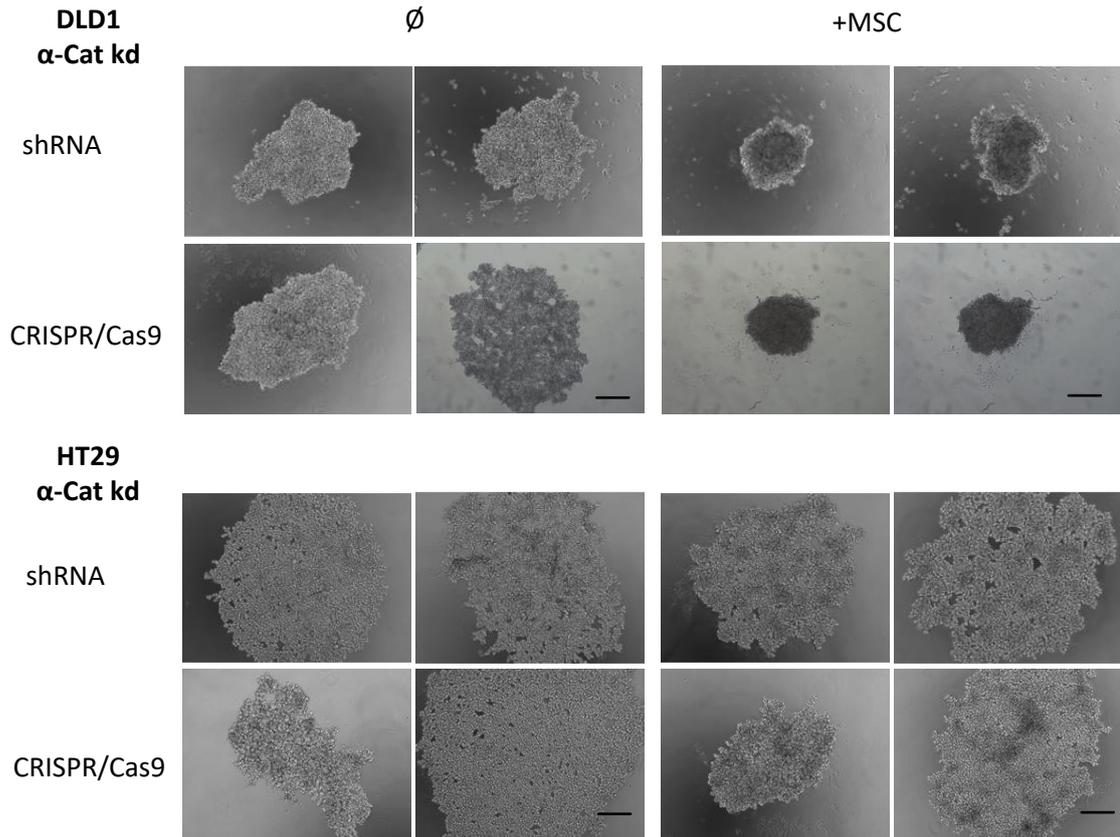


Abb. A6: Differentielle Sphäroidbildung in α -Cat kd Zellen bei Präsenz von MSC. Lichtmikroskopische Aufnahmen von MSC-gemischten (+MSC) und ungemischten (\emptyset) 3D-Sphäroidkulturen von Zellen mit α -Cat kd via shRNA- oder CRISPR/Cas9-Methode der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29, Balken – 200 μ m, n = 4.

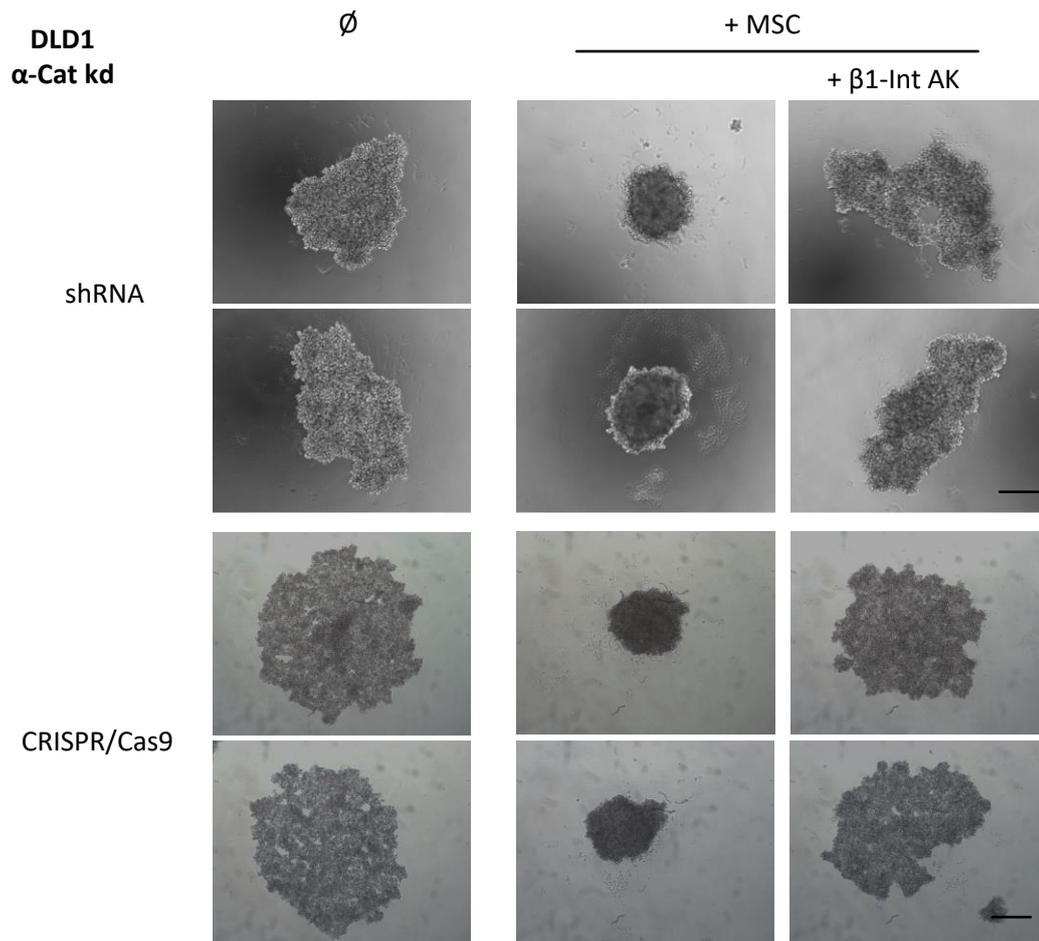


Abb. A7: Einfluss von β 1-Int auf die MSC-vermittelte Sphäroidbildung in α -Cat kd CRC-Zellen. Lichtmikroskopische Aufnahmen von MSC-gemischten (+MSC) und ungemischten (\emptyset) 3D-Sphäroidkulturen von Zellen mit α -Cat kd via shRNA- oder CRISPR/Cas9-Methode der CRC-Zelllinie DLD1 unter Zugabe von β 1-Integrin blockierenden Antikörpern (+ β 1-Int AK), Balken – 200 μ m, n = 4.

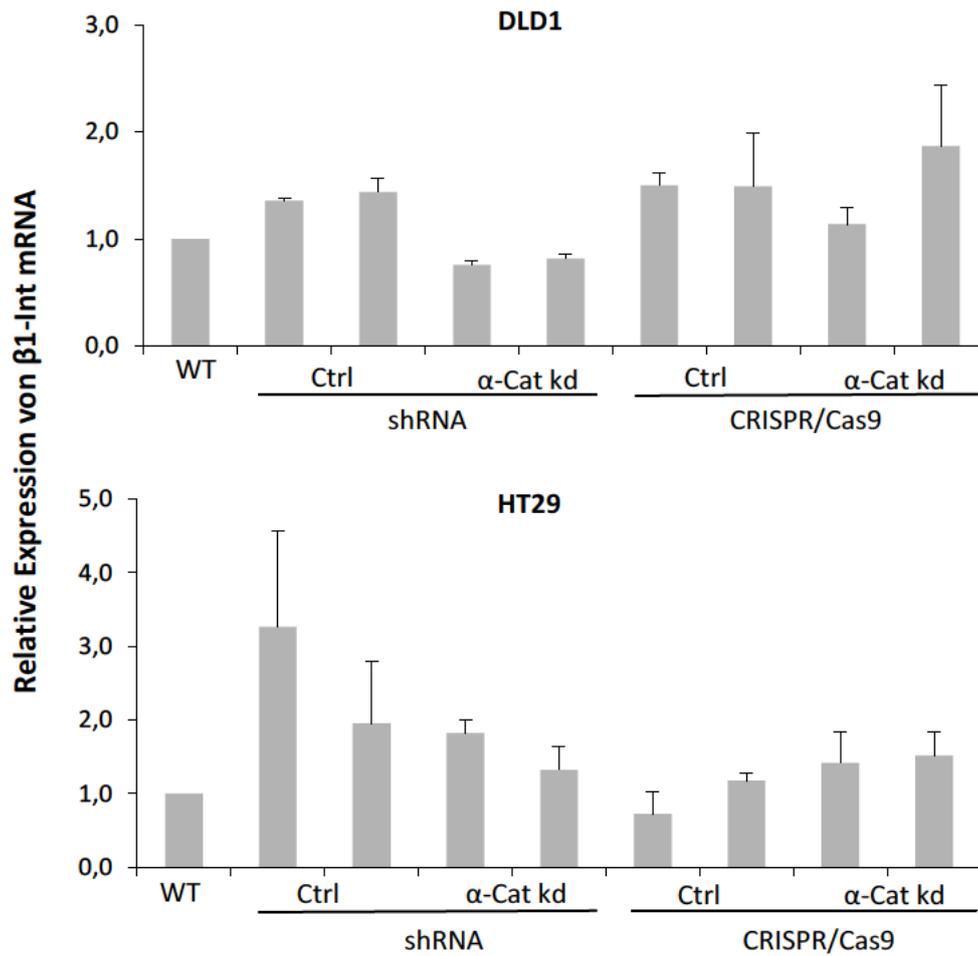


Abb. A8: Analyse der β 1-Int mRNA-Expression in α -Cat kd Zellen. Mittels qPCR ermittelte relative mRNA-Expression von β 1-Int in α -Cat kd Zellen (kd via shRNA- oder CRISPR/Cas9 gRNA-Partikeln) und deren Kontrollen (Ctrl) der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 *in vitro*, vergleichend gegenüber dem Wildtyp (WT), MW \pm Stabw einer internen Wiederholung.

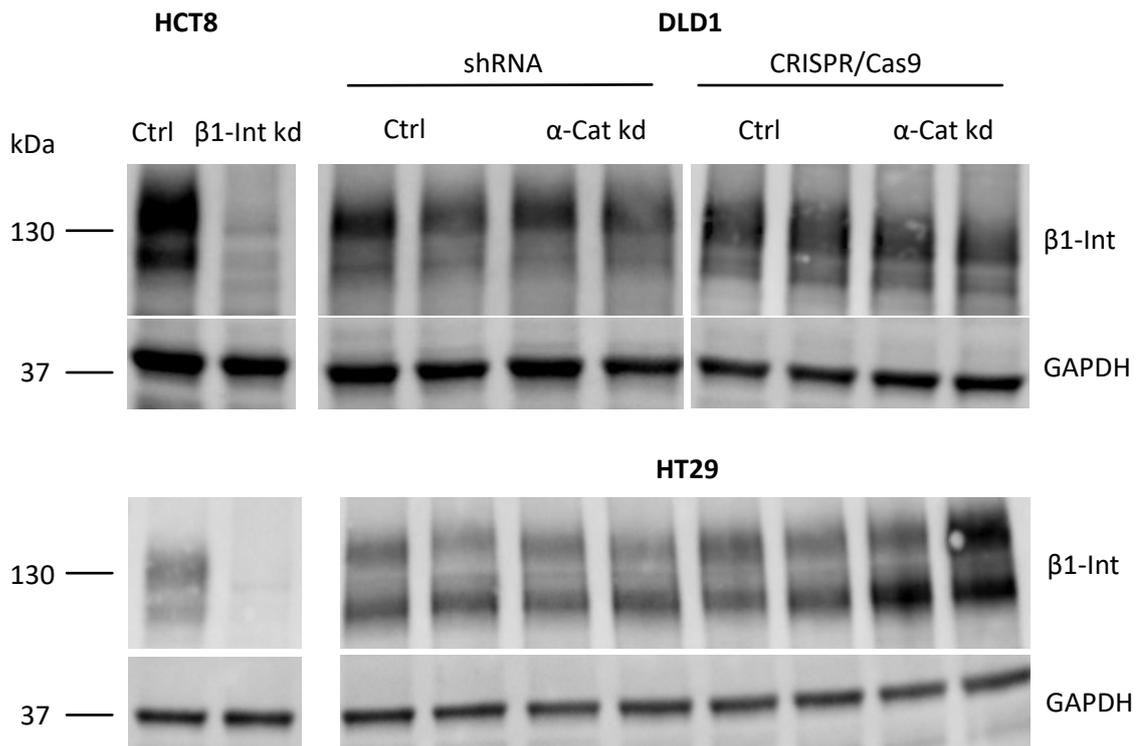


Abb. A9: Analyse der $\beta 1$ -Int Proteinexpression in α -Cat kd Zellen. Western-Blot Analyse der $\beta 1$ -Int (130 kDa) Proteinexpression von α -Cat kd Zellen der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 *in vitro* vergleichend gegenüber den Kontrollen (Ctrl) und der Negativkontrolle mit $\beta 1$ -Int kd Zellen der CRC-Linie HCT8. GAPDH (37 kDa) als Ladekontrolle.

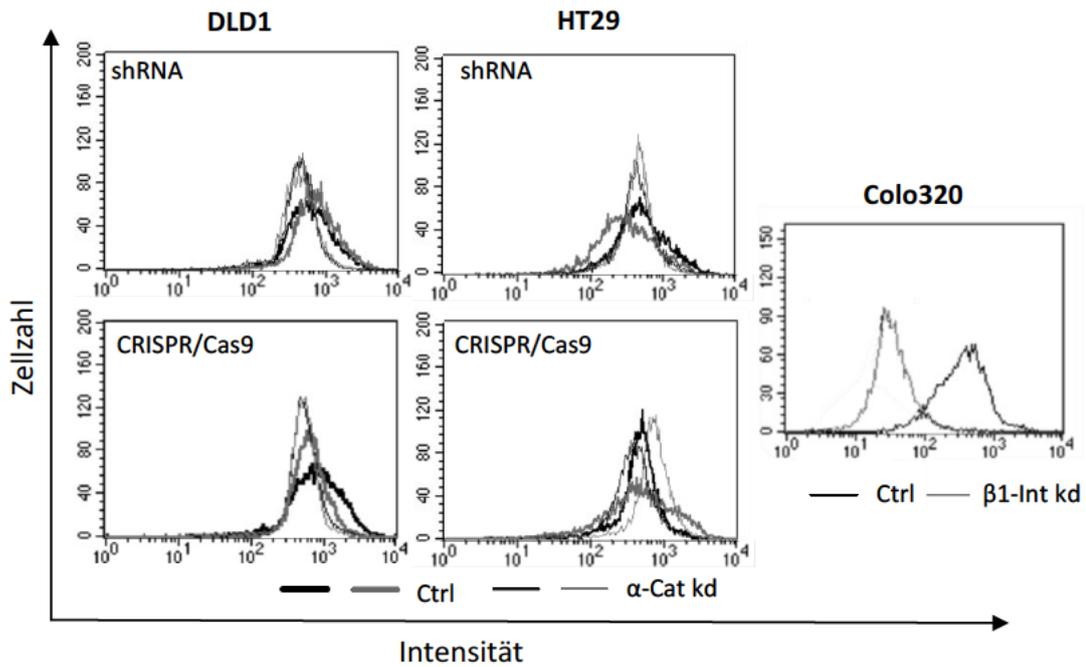


Abb. A10: Durchflusszytometrische Analyse der CD 29 (β 1-Int) - Oberflächenexpression. Overlay-Darstellung der Fluoreszenzintensität in der Durchflusszytometrie nach Inkubation mit Anti-CD 29-PE Antikörper in α -Cat kd Zellen (kd mittels CRISPR/Cas9- oder shRNA-Methode) und Kontrollen (Ctrl) der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29, gegenüberstehend dargestellt die CD 29 Oberflächenexpression von β 1-Int kd Zellen (kd via shRNA-Methode) und der Kontrolle der CRC-Zelllinie Colo320, n = 1.

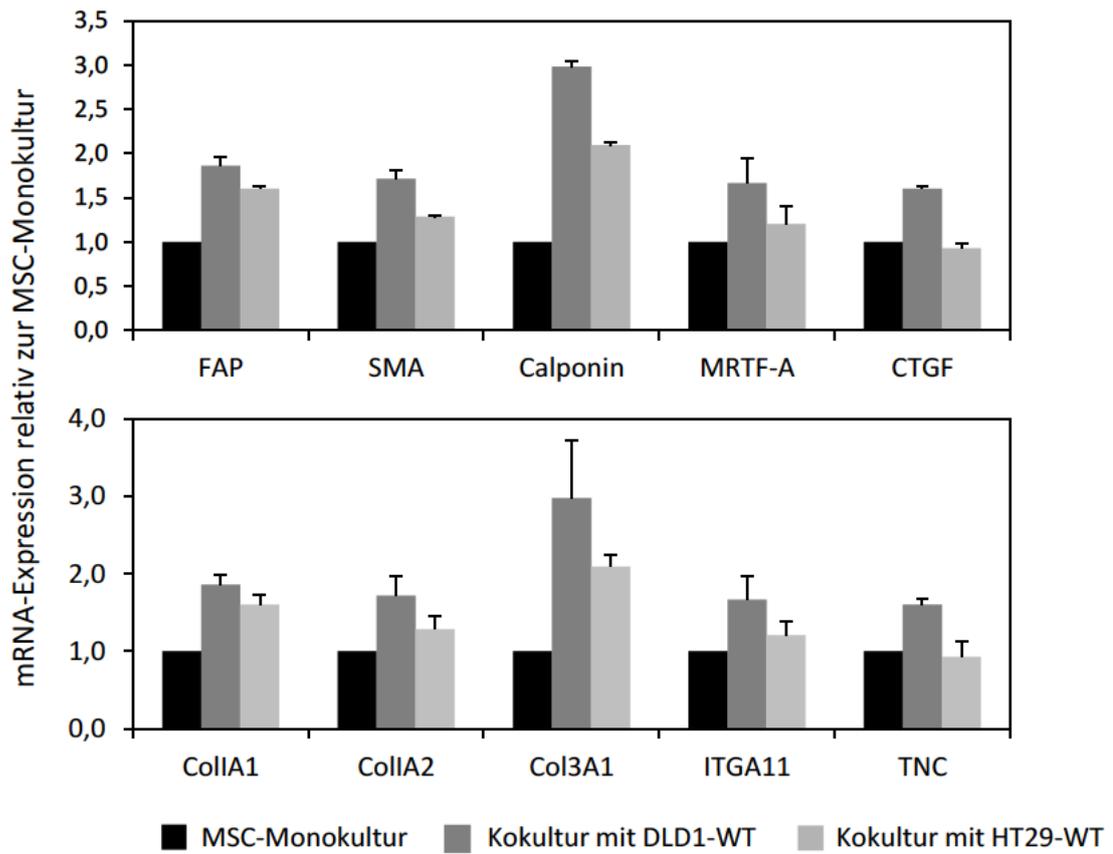


Abb. A11: Analyse der mRNA-Expression von TAF-Differenzierungsmarkern in MSC bei Kokultur mit Wildtypzellen (WT) der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29. Mittels qPCR ermittelte mRNA-Expression der TAF-Differenzierungsmarker FAP, SMA, Calponin, MRTF-A, CTGF sowie Marker der Kollagensynthese und -interaktion in CRC-gemischten MSC-Kokulturen relativ zu der MSC-Monokultur *in vitro*, MW \pm Stabw einer internen Wiederholung.

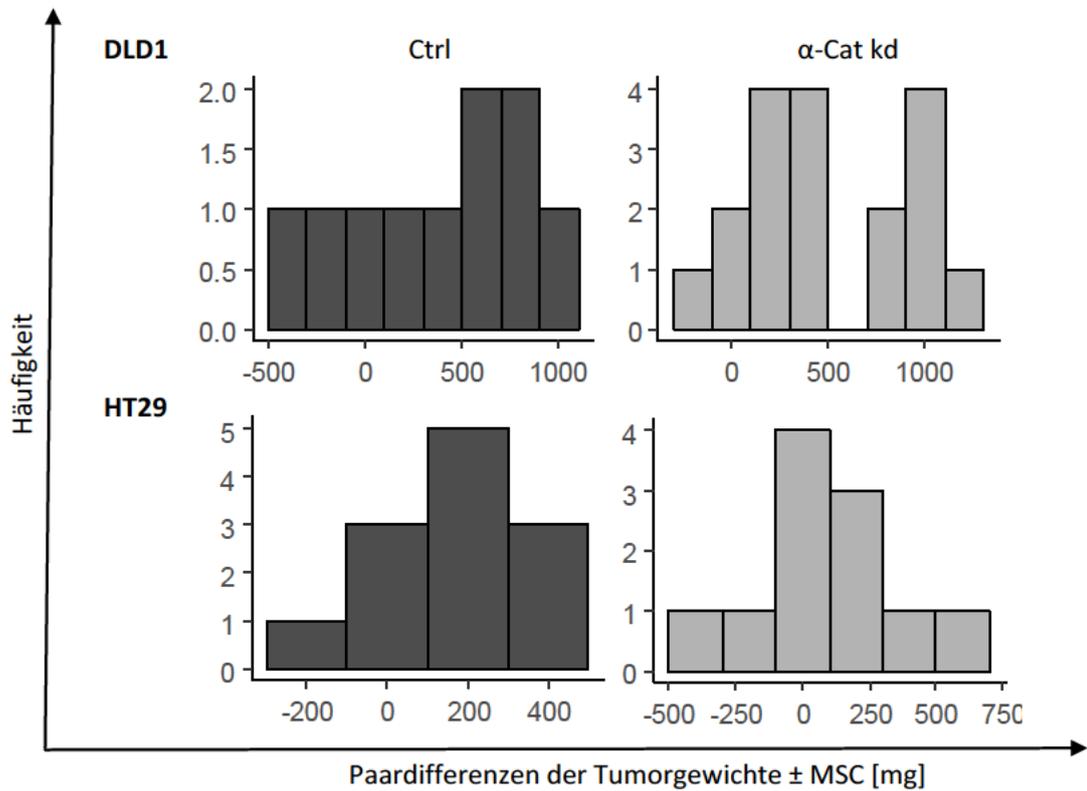


Abb. A12: Häufigkeitsverteilung der Paardifferenzen der Tumorgewichte von MSC-gemischten und ungemischten CRC-Xenograften mit α -Cat kd Zellen und Kontrollen im Mausmodell an Tag 25 nach Injektion. Darstellung im Histogramm, Balkenbreite = 200 mg.

Tabellen

Tab. A1: Mann-Whitney-U Test zur Überprüfung des Unterschieds zwischen Tumorgewichten von CRC-Xenograften nach α -Cat Expression. MW, Stabw und geschätzte Differenz der Mediane zwischen den Stichproben von Kontrollen und α -Cat kd (Md_{diff}) mit 95 % Konfidenzintervall (95% KI) von Gewichten s.c. Xenografte von Kontrollen (Ctrl) und α -Cat kd Zellen der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 im murinen Modell an Tag 25 nach Injektion. Bei fehlender Normalverteilung wurde der p-Wert mittels Mann-Whitney-U Test berechnet.

	DLD1		HT29	
	Ctrl n=10	α -Cat kd n=19	Ctrl n=12	α -Cat kd n=11
MW [mg]	849,10	717,63	455,00	736,45
Stabw [mg]	354,34	436,01	176,23	408,10
Md_{diff} [mg] (95% KI)	206,57 (-98; 474)		-199,21 (-485; -5)	
p-Wert	0,1686		0,0422	

Tab. A2: Deskriptive Statistik der Tumorgewichte von CRC-Mischxenograften mit α -Cat kd Zellen. MW, Stabw und Median (Md) von Gewichten s.c. MSC-gemischter (+MSC) und ungemischter (\emptyset) Xenografte von α -Cat kd Zellen und Kontrollen der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 im murinen Modell an Tag 25 nach Injektion.

DLD1	Ctrl		α -Cat kd	
	\emptyset n=10	+ MSC n=11	\emptyset n=19	+ MSC n=18
MW [mg]	849,10	1221,45	717,63	1230,83
Stabw [mg]	354,34	296,78	436,01	620,95
Md [mg]	937,0	1255,0	630,0	1320,5
HT29	n=12	n=12	n=11	n=11
MW [mg]	455,00	642,50	736,45	828,82
Stabw [mg]	176,23	171,59	408,10	351,58
Md [mg]	435,5	587,5	630,0	708,0

Tab. A3: Test auf Normalverteilung der Paardifferenzen von Gewichten s.c. MSC-gemischter oder ungemischter CRC-Xenografte. Durchführung des Shapiro-Wilk Test zur Prüfung der Normalverteilung der Paardifferenzen MSC-gemischter und ungemischter Xenografte von α -Cat kd Zellen und Kontrollen (Ctrl) der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 an Tag 25 nach Injektion, Annahme einer Normalverteilung bei $p > 0,05$.

	DLD1		HT29	
	Ctrl n=20	α -Cat kd n=36	Ctrl n=24	α -Cat kd n=22
p-Wert	0,435	0,112	0,642	0,909

Tab. A4: T-Test zur Überprüfung des Unterschieds zwischen Tumorgewichten von ungemischten und MSC-gemischten CRC-Xenograften mit α -Cat kd Zellen. P-Wert eines zweiseitigen T-Tests für verbundene Stichproben und geschätzter Mittelwertsunterschied (MW_{diff}) mit 95 % Konfidenzintervall (95% KI) von Gewichten ungemischter und MSC-gemischter s.c. Xenografte von α -Cat kd Zellen und Kontrollen (Ctrl) der CRC-Zelllinien DLD1 und HT29 im murinen Modell an Tag 25 nach Injektion.

	DLD1		HT29	
	Ctrl n=20	α -Cat kd n=36	Ctrl n=24	α -Cat kd n=22
p-Wert	0,0161	0,0001	0,0116	0,2660
MW_{diff} [mg]	-406	-507	-188	-92
(95% KI)	(-716; -95)	(-719; -295)	(-324; -51)	(-267; 82)

Erklärungen

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Hamburg, der 26.06.2023

Roxana Leonora Schuh

Danksagung

Das Entstehen dieser Arbeit haben viele Personen möglich gemacht, denen ich an dieser Stelle danken möchte.

Ich möchte mich herzlich bei meinem Doktorvater, Herr Professor Doktor Lutz Müller, für die fortwährende Unterstützung, fachliche Expertise und Hilfe bei Konzeption und Strukturierung, auch über meine Zeit an der Universitätsklinik Halle hinaus, bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin im Labor, Frau Doktor Jana Lützkendorf, für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit, die Einführung in die Laborarbeit und wertvollen Ratschläge sowohl bei der praktischen Durchführung als auch bei Anfertigen der Dissertation, sowie nicht zuletzt für die Durchführung der Tierversuche. Vielen Dank der gesamten Arbeitsgruppe, die mir bei kleineren und größeren Fragen im Labor zur Seite standen.

Maxime – du hast mich nicht nur auf diesem Weg begleitet, sondern auch auf allen anderen.

Und schlussendlich möchte ich meiner Familie danken, dass ihr an mich geglaubt habt, für eure Motivation und praktischen Ratschläge in allen Phasen. Ohne euch wäre ich nicht dort, wo ich bin.

Vielen Dank.