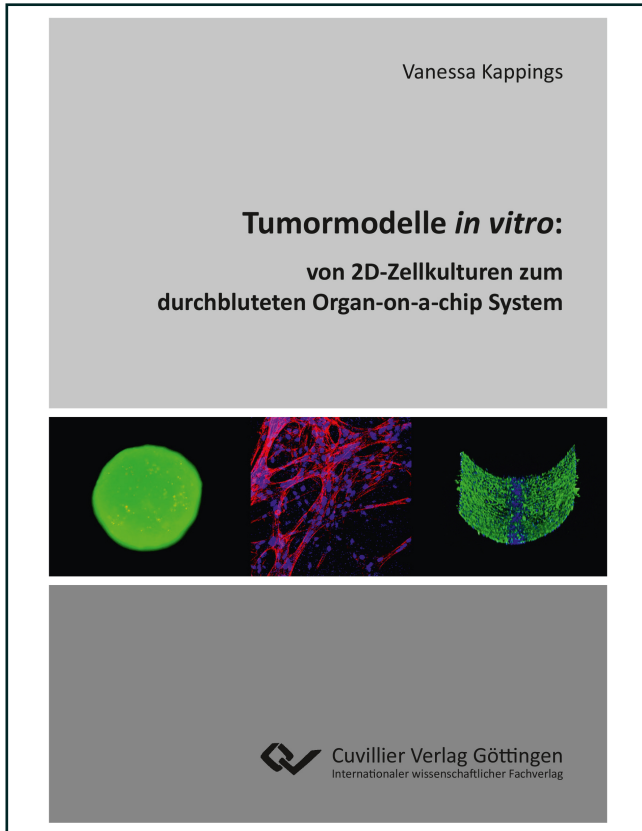




Vanessa Kappings (Autor)

**Tumormodelle in vitro**

Von 2D-Zellkulturen zum durchbluteten Organ-on-a-chip System



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/7747>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

---

# 1 Zusammenfassung

Durch enorme Fortschritte in der Wirkstoffproduktion durch die kombinatorische Synthese und die Click-Chemie ist es derzeit möglich große Mengen an Wirkstoffen zu produzieren. Diese müssen jedoch weiterhin in der konventionellen zweidimensionalen (2D) Zellkultur und in Tierversuchen getestet, charakterisiert und validiert werden, bevor sie die klinischen Phasen am Menschen erreichen. Da die Zellen im menschlichen Körper in einer dreidimensionalen (3D) Anordnung wachsen und mit der sie umgebenden extrazellulären Matrix sowie mit anderen Zelltypen interagieren, spiegelt die zweidimensionale Zellkulturtestung nicht die *in vivo* Situation wider. Auch die Tierversuche sind aufgrund ihres genetischen Hintergrunds nicht eins zu eins auf den Menschen übertragbar. Die Nachfrage an *in vivo*-ähnlichen Testsystemen ist demzufolge groß. Das *Tissue Engineering* hat sich die Rekonstruktion von *in vivo*-artigem Gewebe durch die Etablierung von dreidimensionalen Zellkulturmodellen zum Ziel gesetzt. Derzeit existieren diverse 3D-Modelle, die in drei Klassen unterteilt werden können: die Sphäroid-Modelle, die auf Hydrogelen-basierenden 3D-Zellkulturmodelle sowie die innovativen Organ-on-a-chip Systeme.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Entwicklung und Charakterisierung von 3D-Tumor-Modellen in einfachen 3D-Sphäroiden, über Hydrogel-basierte 3D-Zellkulturen bis hin zu Tumoren in komplexen Organ-on-a-chip Systemen. Dazu wurde die zelluläre Aufnahme sowie das Verhalten verschiedener Wirkstoffklassen an den verschiedenen 3D-Modellsystemen untersucht. Je ein Vertreter von Wirkstoffen mit Tumorresistenz, von Tumordiagnostika sowie Vektoren für das *Tumor-Targeting* wurden dabei evaluiert.

Beginnend mit dem Sphäroid als einfachem 3D-Modell konnten Tumor-Sphäroide mit der Hanging-Drop- sowie mit der Agarosetechnik generiert, charakterisiert und auf nekrotische Kerne untersucht werden. In der Literatur konnte bereits gezeigt werden, dass hypoxische Bedingungen in Tumoren einen wirkstoffresistenten Phänotyp induzieren, der durch die Adaption der metabolischen Aktivität an hypoxische Bedingungen geprägt wird. Um eine verstärkte Resistenz der Tumor-Modelle gegenüber Wirkstoffen zu untersuchen wurden vergleichende Behandlungen mit dem Zytostatikum Mitoxantron durchgeführt. Neben den Zytostatika wurden ebenfalls tumordiagnostische Wirkstoffe in den verschiedenen 3D-Modellen untersucht. Als dritte Klasse der tumorspezifischen Wirkstoffe wurden Vektoren für das *Tumor-Targeting* verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden als Beispiel für das *Tumor-Targeting* multifunktionale Nanomaterialien mit einer magnetischen sowie einer fluoreszenten Komponente appliziert. Nicht nur in der Wirkstofftestung können Tumor-Sphäroide eingesetzt werden, vielmehr können Fragestellungen wie die Plastizität von Makrophagen adressiert werden. Es ist bekannt, dass Tumoren Faktoren freisetzen, welche die Rekrutierung und Infiltrierung von

Immunzellen induzieren. Um solch komplexe Interaktionen vereinfacht und unter kontrollierbaren Bedingungen zu untersuchen, konnte die Rekrutierung von Immunzellen in einer Kokultur mit Tumor-Sphäroiden gezeigt werden. Detailliertere Untersuchungen der Monozyten- und Makrophagenmarker konnten über anschließende RT-qPCR realisiert werden.

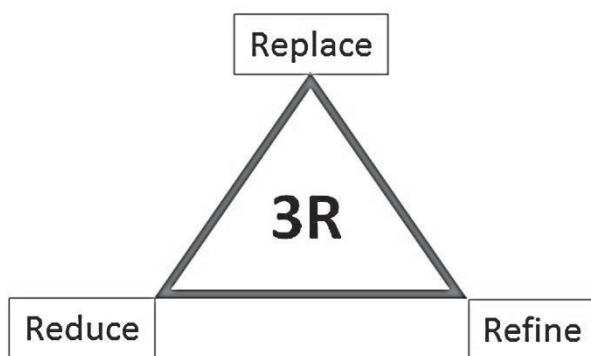
Um die Komplexität der 3D-Modelle zu erhöhen wurden die generierten Tumor-Sphäroide in eine auf Hydrogelen-basierte Stützmatrix eingebettet. Dazu wurde zunächst ein 3D-Vollhautmodell aus einer Dermis- sowie einer Epidermis-Schicht etabliert. Anschließende Integration von Melanoma-Sphäroiden ermöglichte die Testung der Tumordiagnostika an einem 3D-Melanoma-Vollhautmodell. In Analogie zu den Tumor-Sphäroiden konnte ebenso in diesem Modell die Tumorspezifität der fluoreszenten Tumordiagnostika bestätigt werden. Auch die Integration von Glioblastom-Sphäroiden in eine GelMA-gestützte 3D-Kultur aus Mikrogliazellen erlaubte die Testung des Zytostatikums Mitoxantron in einem komplexeren 3D-Modell.

Die Integration dynamischer Prozesse, wie zum Beispiel der Blutfluss, in 3D-Zellkulturen kann mit den Organ-on-a-chip Systemen realisiert werden. Das Ziel der Organ-on-a-chip Systeme ist die naturgetreue Rekonstruktion miniaturisierter Funktionalitätseinheiten der jeweiligen Organe, die im humanen Gewebe durch das Zusammenspiel mehrerer Zelltypen eine spezifische Funktion repräsentieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der, in der Arbeitsgruppe Schepers entwickelte vasQchip als Vertreter der Organ-on-a-chip Systeme verwendet. Dieser besteht aus einem porösen, gekrümmten Mikrokanal, der mit Endothelzellen ausgekleidet und mit einer Mikrofluidik versorgt werden kann. Das ihn umgebende Kompartiment ermöglicht die Kultivierung von vaskularisierten 3D-Zellkulturen. Nach der Etablierung eines Endothels im mikrofluidischen Kanalsystem, konnte durch Integration des etablierten 3D-Melanoma-Dermis-Modell in das umgebende Kompartiment und anschließende Behandlung mit dem Tumordiagnostikum, die aus den beiden anderen 3D-Modellen erhaltene Resultate, bestätigt werden. Auch die Testung des Zytostatikums Mitoxantron an einem Blut-Hirn-Schranken-Modell sowie an einem vaskularisierten Glioblastom-Modell bestätigten die Funktionalität des Hirnendothels sowie die zelluläre Aufnahme in Glioblastom-Sphäroiden.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte die Komplexität der etablierten 3D-Zellkulturmodelle vom verhältnismäßig einfachen Sphäroid-Modell, über die auf Hydrogelen-basierende 3D-Zellkulturen, bis hin zum dynamischen Organ-on-a-chip System gesteigert und demonstriert werden. Die entwickelten 3D-Zellkulturen bieten geeignetere Alternativen zu herkömmlichen 2D-Zellkulturen und können zukünftig Anwendung in pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Studien finden.

## 2 Einleitung

Durch enorme Fortschritte in der kombinatorischen Synthese sowie in der Click-Chemie ist es heutzutage möglich, große Mengen an potentiellen Wirkstoffen herzustellen.<sup>1-7</sup> Diese müssen, bevor sie in die klinischen Phasen am Menschen gelangen, in konventionellen zweidimensionalen (2D) Zellkulturen und Tierversuchen nach dem ADMET (*Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicology*)-Prinzip in toxikologischen und pharmakologische Studien charakterisiert, getestet und validiert werden.<sup>8,9</sup> Resultate aus 2D-Zellkulturen sind dennoch oft nicht aussagekräftig, da eine zweidimensionale Anordnung von Zellen auf Plastikoberflächen nicht der natürlichen dreidimensionalen (3D) Anordnung der Zellen im menschlichen Körper entspricht.<sup>10</sup> Dort kommunizieren Sie mit einer Vielzahl anderer Zelltypen und der sie umgebenden extrazellulären Matrix (ECM).<sup>11-13</sup> Neben Zellkulturmodellen spielen Tierversuche eine essentielle Rolle in der Validierung von Wirkstoffen.<sup>14</sup> Letztere sind teuer, zeitaufwändig und repräsentieren aufgrund des unterschiedlichen genetischen Hintergrunds der Versuchstiere oft nicht vollständig die physiologischen Vorgänge im Menschen.<sup>15,16</sup> Zudem sind Tierversuche ethisch bedenklich, weshalb sie bereits in Deutschland in der kosmetischen Forschung durch strikte Verbote ausgeschlossen wurden.<sup>17</sup> Bereits 1959 beschäftigte sich das von William Russell und Rex Burch entwickelte 3R-Prinzip (Abbildung 2.1) mit der Reduktion und dem Ersetzen von Tierversuchen durch Alternativen wie beispielsweise Zellkulturen und Computersimulationen.<sup>18,19</sup>



**Abbildung 2.1: 3R-Prinzip zur Verminderung von Tierversuchen.** Durch die Vermeidung (Replacement) von Tierversuchen durch das Ersetzen mit Zellkulturen oder Computersimulationen, durch die Verbesserung (Refinement), die das Leid der Tierversuche vermindert und durch die Reduktion (Reduction) der Anzahl an Versuchstieren, durch statistische Optimierung und ein sinnvolles Versuchsdesign, soll die Summe an Versuchstieren sowie deren Belastung reduziert werden.<sup>18-20</sup>

Heutzutage steht das Forschungsgebiet des *Tissue Engineerings* (TE) bei vielen Arbeitsgruppen im Fokus. Das Ziel des *Tissue Engineerings* ist es, naturgetreue 3D-Zellkulturmodelle zu entwickeln, die die Nachteile der 2D-Zellkultur und der Tierversuche überwinden und geeignetere Alternativen für die Wirkstofftestung darstellen. Die einfachste Form der 3D-Zellkulturen bilden sogenannte Sphäroid- bzw. Organoid-Modelle. Hierbei handelt es sich um Zellaggregate, die sich durch den Einfluss der

Schwerkraft oder aufgrund nicht-adhäsiver Oberflächen von selbst ausbilden.<sup>21-23</sup> Komplexere 3D-Zellkulturen basieren auf Hydrogel-gestützten Anordnungen. Hydrogele sind Polymernetzwerke bzw. Gele mit hydrophilem Charakter, die in der Lage sind, Wasser bzw. wässrige Lösungen einzulagern und somit eine attraktive Matrix für die 3D-Zellkultur darstellen.<sup>24,25</sup> Der derzeit neueste und innovativste Ansatz der 3D-Zellkulturen sind sogenannte Organ-on-a-chip Systeme. Das Ziel der Organ-on-a-chip Modelle ist die naturgetreue Rekonstruktion von spezifischen, miniaturisierten Organfunktionalitäten, die unter physiologischen, kontrollierbaren Bedingungen kultiviert werden.<sup>26</sup>

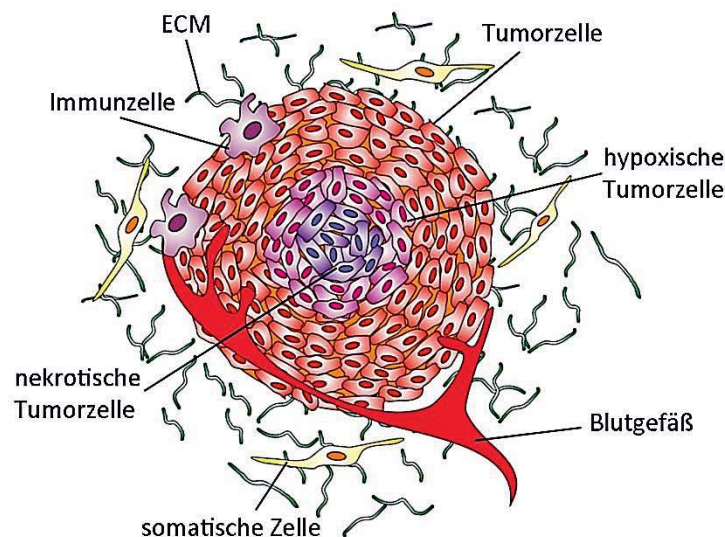
## 2.1 Sphäroide

Die einfachste Form der 3D-Zellkulturen sind sogenannte Sphäroide oder Organoide. Sphäroide werden seit 1950 in der Zellkultur verwendet dennoch erhielten sie ihren Namen erst 20 Jahre später, als V79-Lungenzellen des chinesischen Hamsters eigenständig annähernd kugelförmige Aggregate ausbildeten.<sup>27</sup> Auch Pease et al konnten 2012 zeigen, dass Krebszellen von Natur aus dazu neigen, in 2D-Zellkulturen an dichten Regionen selbstständig Sphäroide auszubilden.<sup>28</sup> Da der Trend der 3D-Zellkulturen sich stetig verbreitet, wurden alternative Techniken entwickelt um die Generierung von Sphäroiden zu induzieren. Dabei wurden sich der Einfluss der Schwerkraft sowie die Verwendung von nicht-adhäsiven Oberflächen zunutze gemacht.<sup>21-23</sup> Sphäroide können generiert werden, indem Zellen, die auf nicht adhäsiven Oberflächen, in Hanging-Drop-Techniken oder in Fermenter-Systemen kultiviert werden zu Sphäroide aggregieren.<sup>29-33</sup> Heutzutage werden sie in der regenerativen Medizin sowie in der Krebsforschung eingesetzt.<sup>34</sup> So wurden bereits Sphäroide aus multipotenten mesenchymalen stromalen Zellen generiert, die erhöhte anti-inflammatorische, angiogene und geweberenerative Eigenschaften aufweisen und somit als möglicher Ansatzpunkt für zellbasierte-Therapeutika in der regenerativen Medizin dienen.<sup>35-37</sup> In der Krebsforschung werden sogenannte multizelluläre Tumorsphäroide als Mimetika von Minimetastasen oder bestimmten Arealen von soliden Tumoren verwendet, um diese *in vitro* naturgetreu zu rekonstruieren und zu untersuchen.<sup>38</sup> Ein wesentlicher Vorteil der Sphäroide ist die Beibehaltung von *in vivo*-artigen Eigenschaften auch nach Langzeitkultivierung.<sup>23,39,40</sup>

### 2.1.1 Rekonstruktion der Tumor-Architektur

Solide Tumore wachsen in einer 3D-Architektur, die eine Vielzahl von somatischen Zellen sowie die extrazelluläre Matrix beinhaltet und die Mikroumgebung des Tumors bildet (Abbildung 2.2). Die Umgebung des Tumors hat einen wesentlichen Einfluss auf dessen Malignität.<sup>41</sup> So können Zellen hämatopoietischer Herkunft, die im Knochenmark entstehen, sowohl die Tumor-Bekämpfung<sup>42</sup>, als auch die Tumor-Progression<sup>43</sup> fördern. Des Weiteren unterstützen Zellen mesenchymaler Herkunft, wie beispielsweise Myofibroblasten oder mesenchymale Stammzellen, die Tumorprogression direkt,

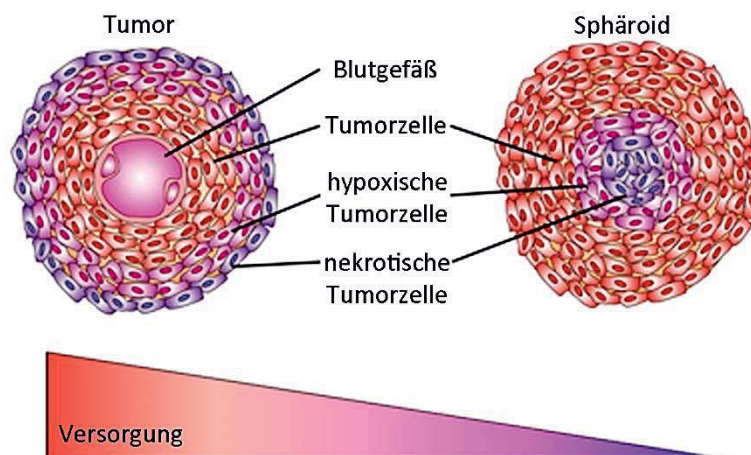
indem sie eine für Tumorzellen vorteilhafte Nische vorbereiten.<sup>44</sup> Darüber hinaus ist die Angiogenese für das Tumorwachstum essentiell. Die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Gasen durch neugebildete Blutgefäße ermöglicht ihm ein weiteres Wachstum sowie die Metastasierung in distale Organe über die Blutbahn.<sup>45</sup> Dabei werden angiogene Faktoren wie *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) oder Interleukin-8 (IL-8) von den Tumorzellen freigesetzt, welche die Angiogenese und die Metastasierung fördern.<sup>46</sup> Endothelzellen und Perizyten reagieren auf angiogene Faktoren indem sie neue Blutgefäße ausbilden und haben resultierend einen enormen Einfluss auf die Versorgung und Verbreitung von Tumoren.<sup>45,47,48</sup> Des Weiteren bestimmt die nicht zelluläre Komponente der Tumormikroumgebung, die ECM, die hauptsächlich aus Proteinen, Glykoproteinen sowie Proteoglykanen besteht, nicht nur die Gerüststruktur sondern sorgt auch für die Funktion sowie den Aufbau des Gewebes. Obwohl die ECM die Gewebestruktur aufrechterhält und die Tumordinvasion hindert, konnte festgestellt werden, dass eine abnormale ECM die Tumorprogression und Tumorangiogenese begünstigt.<sup>41,49</sup>



**Abbildung 2.2: Vereinfachte schematische Darstellung der Tumormikroumgebung.** Zu der Mikroumgebung von Tumoren zählen unter anderem somatische Zellen, wie beispielsweise Fibroblasten oder mesenchymale Stammzellen sowie Endothelzellen oder Perizyten, die in bzw. an den Blutgefäßen aufzufinden sind, welche den Tumor mit Nährstoffen und Gasen versorgen. Darüber hinaus zählen ebenso rekrutierte Immunzellen und die 3D-Struktur bestimmende extrazelluläre Matrix zu der Mikroumgebung von Tumoren (modifiziert mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Publishing Group (Junttila et al.) Copyright© (2013).<sup>50</sup>

Um die Komplexität von Tumoren auf deren 3D-Architektur zu beschränken, werden heutzutage häufig Tumor-Sphäroide verwendet. Hierbei bleiben die 3D-Anordnung der Tumorzellen sowie die Tumorspezifischen Eigenschaften auch über eine Langzeitkultivierung bestehen.<sup>23,39,40</sup> Dabei sollen Sphäroide folgendes Szenario nachstellen: vaskularisiertes Tumorgewebe wird durch Blutgefäße mit Nährstoffen und Gasen versorgt, die für das weitere Wachstum des Tumors essentiell sind. Das schnelle und unkontrollierte Wachstum limitiert jedoch deren Verfügbarkeit und setzt Tumorzellen in tieferen Bereichen einer reduzierten Sauerstoffumgebung aus.<sup>51</sup> Dies induziert unter anderem die Produktion

von angiogenen Faktoren, die Reduktion des Sauerstoffverbrauchs durch metabolische Veränderung der Tumorzellen und die Reduktion des apoptotischen Potentials. Das Anpassen von Tumoren an hypoxische Bedingungen wird als Hauptursache für die Selektion von stärker invasiven, therapieresistenten Tumorphänotypen betrachtet und wurde bereits 1955 von Thomlinson und Gray, basierend auf ihren Beobachtungen der Nekroseverteilung relativ zu Blutgefäßen bei menschlichen Tumoren, dokumentiert.<sup>52,53</sup> Diese Bedingungen verleihen Tumoren wertvolle Eigenschaften, die zu Resistenzen gegenüber Wirkstoffen bzw. Therapieansätzen führen und mit zweidimensionalen Zellkulturen nicht nachgestellt werden können.<sup>54,55</sup> In Tumor-Sphäroiden können hypoxische bzw. nekrotische Bedingungen rekonstruiert werden (Abbildung 2.3):



**Abbildung 2.3: Schematische Darstellung von vaskularisiertem Tumorgewebe sowie von Tumor-Sphäroiden.**

Die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen durch das Blutgefäß erfolgt bei dem Tumorgewebe nicht in tiefere Zellschichten, wodurch hypoxische bzw. nekrotische Zellen entstehen. Dieses Szenario kann auch bei Tumor-Sphäroiden rekonstruiert werden. Die Versorgung mit Nährstoffen und Gasen erfolgt über das Medium und versorgt die äußeren Zellschichten. Zellen in tieferen Bereichen bleiben in Analogie zu dem Tumorgewebe unversorgt. Demnach entstehen hypoxische und nekrotische Regionen (modifiziert von „The Hypoxic Cell-A target for selective cancer therapy“, Copyright© 1999, 59/23, 5863 - 5870, J. Martin Brown, Cancer Research, mit Genehmigung von AACR).<sup>56</sup>

Sphäroide entwickeln, im Gegensatz zu 2D-Kulturen, eine heterogene Population aus Tumorzellen. Im frühen Sphäroidstadium formiert sich ein Aggregat proliferierender Tumorzellen. In späteren Stadien sind diese nur noch in Randbereichen des Sphäroids zu finden, wo sie sich wie eine Schale um den histologisch veränderten Kern legen. Dieser besteht aus ruhenden, also vitalen, sich jedoch nicht mehr aktiv teilenden Zellen. Diese Subpopulation kann über Zellisolation und Durchflusszytometrie<sup>57</sup> sowie über *Imaging*-Techniken<sup>58,59</sup> nachgewiesen werden.<sup>60</sup> Im späten Sphäroidstadium beginnen die inneren Regionen abzustarben, was zur Ausbildung eines nekrotischen Kerns unter den nach wie vor vitalen Schichten aus ruhenden und aktiv proliferierenden Zellen führt.<sup>21,58,61</sup> Stetiges Wachstum des Sphäroids hat zur Folge, dass die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff in den tiefer liegenden Zellschichten nicht mehr gewährleistet werden kann. Dies führt zu hypoxischen Bedingungen (1% Sauerstoff) im Sphäroidzentrum, die den metabolischen Zustand der Zellen verändern und das



Tumorstadium induzieren.<sup>62</sup> Hypoxische Bedingungen führen zur Generierung reaktiver Sauerstoff Spezies (ROS), die wiederum zur Aktivierung der Hypoxie-induzierten Faktoren (HIF), HIF1 und HIF2, führen.<sup>63</sup> Diese sind in homöostatischen- sowie in Vaskularisierungsprozessen involviert.<sup>61</sup> Ob die Zellen vom ruhenden in den nekrotischen Zustand übergehen, ist abhängig von der Versorgung mit Nährstoffen und Gasen wie beispielsweise Sauerstoff.<sup>58,60</sup> Nekrotische Zellen senden spezifische Faktoren wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) aus, die wiederum für die Rekrutierung von Immunzellen sowie ein inhibiertes Zellwachstum verantwortlich sind.<sup>58,60,64,65</sup> Das Anpassen von Tumoren an hypoxische Bedingungen wird als Hauptursache für die Selektion von stärker invasiven, therapieresistenten Tumorphänotypen betrachtet und spielt eine Schlüsselrolle im Nachwachsen von Tumoren.<sup>52,53,60,66,67</sup>

### 2.1.2 Magnetische Nanopartikel zur medikamentösen Tumorthherapie

Krebs zählte mit 8,8 Millionen Todesfällen zu der weltweit zweithäufigsten Todesursache in 2015.<sup>68</sup> Die derzeit am häufigsten angewendeten Krebstherapien sind die Chemotherapie<sup>69</sup> und/oder die Bestrahlungstherapie.<sup>70</sup> Diese sind jedoch mit starken Nebenwirkungen wie Haarausfall, Übelkeit, Erbrechen oder Blutarmut verbunden.<sup>69</sup> Der Einsatz von Nanomaterialien in der medikamentösen Tumorthherapie soll diese Probleme überwinden. Nanopartikel sind Submikronpartikel zwischen 1 – 100 nm, die aus anorganischen oder organischen Materialien hergestellt werden können. Dabei unterscheiden sich ihre Eigenschaften von makroskopischen Materialien mit der gleichen Zusammensetzung aufgrund des Größeneffekts.<sup>71</sup> Die bemerkenswert große Oberfläche erhöht beispielsweise die katalytische Aktivität oder Reaktivität der Nanopartikel.<sup>72</sup> Abhängig vom Aufbau sind diese in der Lage die Temperatur<sup>73</sup>, die Strahlensensibilität<sup>74</sup> oder die Photosensibilität<sup>75</sup> zu erhöhen und lokal an der Tumorstelle zu wirken.<sup>72</sup> Magnetische Nanomaterialien weisen multifunktionale Eigenschaften auf. Die Kombination eines magnetischen Kerns und der potentiellen Beladung mit Wirkstoffen resultiert in einem attraktiven *Drug Delivery System*.<sup>71</sup> Durch ihre Größe von 1 – 100 nm sind sie in der Lage passiv, durch Ausnutzen des EPR-Effekts (erhöhte Permeabilität und Retention), im Tumorgewebe zu akkumulieren.<sup>76</sup> Besonders ihre magnetischen Eigenschaften sind als Kontrastmittel für Magnetresonanztomographien (MRT)<sup>77</sup> sowie als Hyperthermie-Agenzien, bei der thermischen Zerstörung des Tumors durch Anlegen eines hochfrequenten Magnetfelds,<sup>78</sup> anwendbar. Des Weiteren können sie als magnetische Vektoren, die durch einen magnetischen Gradient geleitet werden, für den gezielten Wirkstofftransport eingesetzt werden.<sup>71,79</sup> 2008 konnten Chertok et al. bereits das *Targeting* von Hirntumoren mit magnetischen Eisenoxid-Nanopartikeln zeigen.<sup>80</sup> Darüber hinaus konnten Cheng et al. 2012 die Rekrutierung von Stammzellen durch deren hohe Affinität zu Anti-CD34-Antikörper-beschichteten magnetischen Nanopartikeln ( $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{PEG-CD34}$ ) zu einem spezifischen Zielort *in vivo* durch das Anlegen eines magnetischen Felds induzieren.<sup>81</sup>

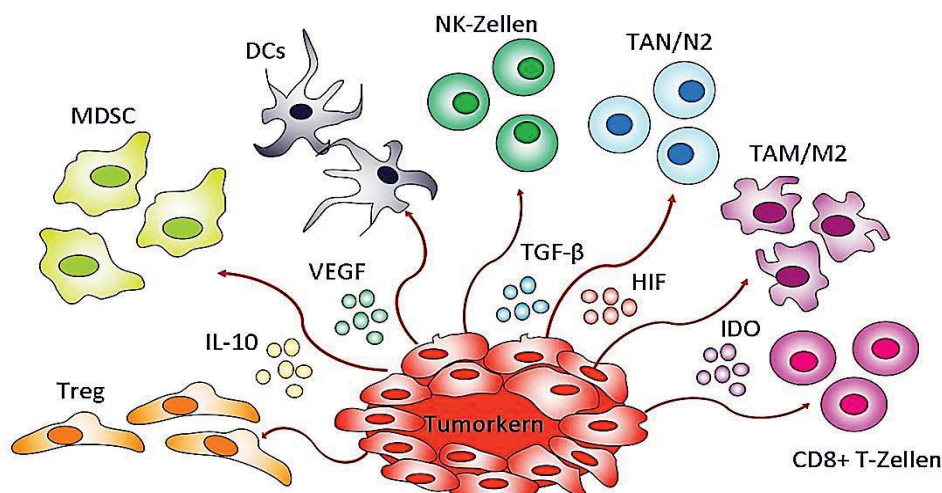




### 2.1.3 Rekrutierung von Immunzellen zur Tumorstelle

Ein weit verbreitetes Phänomen bei malignen Tumoren ist die Einwanderung von Tumorzellen in gesundes Gewebe und die Ausbildung neuer Tumore in distalen Organen. Der Prozess der Invasion und Metastasierung von Tumoren erfordert eine Reihe von Schritten, die Tumorzellen durchlaufen müssen, um entfernte Organe zu kolonialisieren.<sup>82</sup> Dabei spielt die Interaktion mit dem Immunsystem in der Tumorprogression und der Angiogenese eine wesentliche Rolle.<sup>83</sup> Immunzellen können die Bildung von Tumoren in Abhängigkeit von Signalen, die von Tumorzellen gebildet werden, sowohl verstärken als auch inhibieren. Solche Signale werden als *Danger-associated molecular patterns* (DAMPs) bezeichnet.<sup>84</sup> Sie signalisieren die Expression von Zytokinen über die Aktivierung der *Toll-like* Rezeptoren (TLR) und führen so zur Anlockung von Immunzellen (Abbildung 2.4). Histopathologische Untersuchungen von humanen Tumoren derselben Art haben Hinweise auf eine variable Anzahl an Tumor-infiltrierenden Immunzellen gegeben, die in unterschiedlichen Bereichen des Tumors nachgewiesen wurden. Makrophagen, Mastzellen, Granulozyten und *Myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs) wurden meist in oder um den Tumorkern sowie an der invasiven Vorderseite des Tumors vorgefunden.<sup>85</sup> Dabei ist die Plastizität ein weitläufig anerkanntes Merkmal von Myeloidzellen und besonders bei Monozyten/Makrophagen ausgeprägt. Die Plastizität zeichnet sich durch ein breites Spektrum von Aktivierungsstadien als Reaktion auf verschiedene Signalvorgänge aus. Klassische M1 und alternative M2 Makrophagen repräsentieren diese Plastizität. Im menschlichen Körper werden Monozyten im Falle von Infektionen oder Entzündungen zu den klassischen M1 Makrophagen differenziert.<sup>86</sup> Stimuli wie Lipopolysaccharide (LPS) auf Zellwänden von Bakterien, oder Zytokinen, wie Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und TNF- $\alpha$ , spielen eine Schlüsselrolle in deren Aktivierung. Dieser Makrophagensubtyp wird über die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6) und -12 (IL-12) charakterisiert.<sup>87</sup> Neben M1 Makrophagen existieren alternativ aktivierbare Makrophagen, die sogenannten M2 Makrophagen. Der M2 Subtyp wird durch Stimuli, wie Interleukin-4 (IL-4) und/ oder Interleukin-13 (IL-13), Interleukin-10 (IL-10) sowie über TLR, aktiviert.<sup>86,88,89</sup> M2 Makrophagen senden im Vergleich zu M1 Makrophagen anti-inflammatorische Zytokine, wie IL-10, *macrophage inflammatory protein-4* (MIP-4, auch als CCL18 bekannt) und CCL22, aus. Weiterhin sind sie über die Expression von Mannoserezeptoren (auch als CD206 bekannt) oder dem Scavengerrezeptor CD163 charakterisiert.<sup>86,89-91</sup> Auch in soliden Tumoren konnten infiltrierende Makrophagen, die sogenannten Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) nachgewiesen werden. Diese zeigen hauptsächlich anti-inflammatorische M2 Charakteristiken und weisen immunosuppressive Eigenschaften auf, die die Tumorprogression und die Metastasierung unterstützen und fördern.<sup>92-95</sup> Während lange angenommen wurde, dass Neutrophile terminal zu Effektorzellen differenzieren, häufen sich neuerdings Publikationen, die beschreiben, dass auch tumorassoziierte Neutrophile (TANs) einen pro-inflammatorischen, hoch zytotoxischen N1 Phänotyp

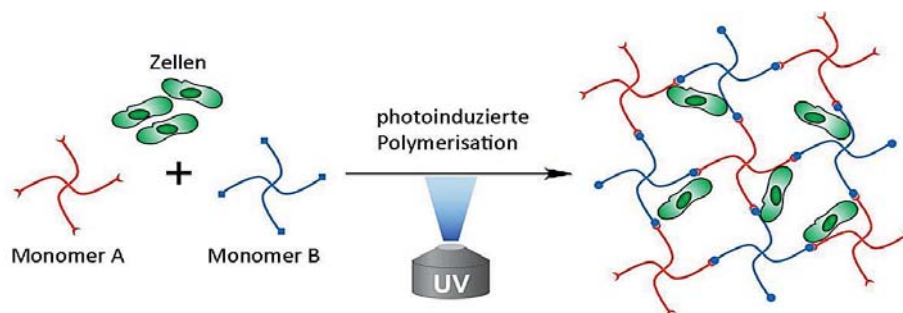
und einen anti-inflammatorischen, Tumor-fördernden N2 Subtyp, einnehmen können. Dabei kommt die Umwandlung durch den anti-inflammatorischen zytokintransformierenden Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) zustande. Die Differenzierung ist abhängig von der Art des Kontakts mit endogen entstehenden Tumorzellen.<sup>96</sup> Lymphozyten sind nicht willkürlich in den Tumorregionen verteilt, sondern können in spezifischen Arealen nachgewiesen werden. So werden natürliche Killerzellen (NK Zellen) im Stroma aufgefunden und stehen nicht mit den Tumorzellen in direktem Kontakt.<sup>85</sup> T-Helferzellen, insbesondere CD8<sup>+</sup> T-Zellen, konnten dagegen am invasiven Tumorrand, aber auch im Tumorkern detektiert werden.<sup>85</sup> Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass aufgrund der verschiedenen, funktionellen Immunzellpopulationen, die in den unterschiedlichen Tumorbereichen nachgewiesen werden konnten, eine gewisse Rollenverteilung der jeweiligen Subpopulationen in der Tumorkontrolle existiert. Auch in solch einem komplexen Kontext lassen sich Tumor-Sphäroide einsetzen. Durch einen vereinfachten Versuchsaufbau können Interaktionen zwischen Tumor- und Immunzellen sowie spezifische Signalwege und Rekrutierungsvorgänge unter kontrollierbaren Bedingungen untersucht und analysiert werden. Es besteht die Möglichkeit, wichtige Aspekte, wie die Plastizität von Makrophagen des klassischen M1 bzw. des alternativen M2 Subtyps zu charakterisieren, die wiederum wichtige Erkenntnisse für die Immunotherapie liefern können.



**Abbildung 2.4 Vereinfachte Darstellung der Immun- und Tumorzell-Interaktionen.** Tumore senden Faktoren wie IL-10, VEGF, TGF- $\beta$ , HIF undIDO aus, die auf verschiedene Subpopulationen der Immunzellen wie Treg, MDSC, DCs, NK-Zellen, TAN/ N2, TAM/ M2 und CD8<sup>+</sup> Zellen wirken und unter anderem die Rekrutierung dieser zu der Tumorstelle induzieren (modifiziert von „Nanoparticulate immunotherapy for cancer“, 219, Kapadia et al., J Control Release, 167-180., Copyright<sup>®</sup> (2015), mit Genehmigung von Elsevier).<sup>20,97,98</sup>

## 2.2 Hydrogel-basierte 3D-Zellkulturmodelle

Neben den Sphäroiden als einfache 3D-Zellkulturmodelle, bilden die auf Hydrogelen-basierenden 3D-Kokulturen ein komplexeres 3D-Zellkultursystem. Humane Zellen wachsen in einer komplexen 3D-Mikroumgebung, in der verschiedene Zelltypen organisiert und von der extrazellulären Matrix umgeben sind. Dabei spielen die Zell-Zell- sowie die Zell-Matrix-Interaktionen eine wesentliche Rolle in der zellulären Differenzierung, der Proliferation und der Funktion des Gewebes *in vivo*.<sup>99</sup> Das naturgetreue Nachahmen und Simulieren von nativem Gewebe bzw. dessen Funktionalitäten stellt dabei das Ziel der auf Hydrogelen-basierenden 3D-Zellkulturen dar. Die Rekonstruktion von physiologisch authentischen Zellkulturen, beeinflusst zum einen die Grundlagenforschung und Wirkstoffentwicklung, zum anderen die Regeneration von bösartigen oder verwundetem Gewebe, in den Bereichen der modernen Biologie, der Biotechnologie, der regenerativen Medizin und der *Life Sciences*.<sup>100-103</sup> Hydrogele sind natürliche oder synthetische Polymernetzwerke, deren zentrale Eigenschaften von physikalischer (z.B. Oberflächenspannung<sup>104</sup>, Viskosität<sup>105</sup>), von chemischer (z.B. Quervernetzbarkeit<sup>105,106</sup>, Adhäsionsstellen<sup>107</sup>) und von biologischer Natur (Biokompatibilität<sup>107</sup>, Abbau<sup>108</sup>) geprägt sind. Die Fähigkeit Wasser oder wässrige Lösungen einzulagern macht diese Moleküle für die 3D-Zellkultur besonders attraktiv.<sup>24</sup> Natürliche Hydrogele werden unter anderem aus Proteinen der extrazellulären Matrix wie Kollagen<sup>109,110</sup>, Fibronectin<sup>111</sup>, Gelatin<sup>112</sup>, Hyaluronsäuren<sup>113,114</sup>, Laminin<sup>115,116</sup> oder Matrigel<sup>TM</sup> <sup>117,118</sup> gebildet. Weitere natürliche Hydrogele stammen aus der Alge (Alginate)<sup>119,120</sup>, aus Seegras (Agarose)<sup>121,122</sup> oder aus der Seide (Fibroin).<sup>123,124</sup> Zu synthetischen Hydrogelen zählen unter anderem Polymere wie Polyethylenglykol (PEG)<sup>100,125,126</sup> oder GelMA<sup>100,127</sup>, die beispielsweise durch bioorthogonale Click-Reaktionen oder durch photochemische Reaktionen mit funktionellen Gruppen wie Thiolen<sup>128</sup>, Aldehyden<sup>119</sup> oder Methacrylaten<sup>129,130</sup> in Kombination mit Zellen zu einem 3D-Netzwerk verknüpft werden können (Abbildung 2.5). Dies ermöglicht ein einheitliches Vernetzen unter kontrollierbaren Bedingungen einer 3D-Zellkultur.



**Abbildung 2.5: Generierung von 3D-Zellkulturen in synthetischen Hydrogelen.** Die Monomere werden mit den Zellen vermischt und durch photoinduzierte Polymerisationsreaktionen zu einem 3D-Hydrogel, mit eingeschlossenen Zellen quervernetzt (modifiziert mit Genehmigung aus „Photoregulated Hydrazone-Based Hydrogel Formation for Biochemically Patterning 3D-Cellular Microenvironment“ von Malar A. Azagarsamy, Ian A. Marozas, Sergio Spaans und Kristi S. Anseth Copyright © (2015) American Chemical Society).<sup>126</sup>