

Aus der Klinik für Universitätsklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Entwicklung eines orthotopen NOD/SCID-Mausmodells zur
Untersuchung des Cholangiokarzinoms und einer möglichen
Therapie mit genetisch modifizierten mesenchymalen
Stammzellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. med.
(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von
aus
Magdeburg

Arvid Sen Gupta
Berlin
2020/21

Bibliografische Beschreibung:

Sen Gupta, Arvid: Entwicklung eines orthotopen NOD/SCID-Mausmodells zur Untersuchung des Cholangiokarzinoms und einer möglichen Therapie mit genetisch modifizierten mesenchymalen Stammzellen.- 2020.-82 Bl. 33 Abb., 5 Tab., 3 Anl.

Kurzreferat:

Das Cholangiokarzinom ist noch immer eine schwer zu behandelnde Tumorentität, welche annäherungsweise zehn Prozent der primär in der Leber lokalisierten Tumoren darstellt und mit einer hohen Mortalitätsrate einhergeht. Neben der chirurgischen Intervention, welche für ausgewählte Fälle eine Verbesserung des Gesamtüberlebens bietet, sollten allerdings weitere Therapieoptionen erarbeitet werden. Hier setzt die vorgelegte Arbeit an. Im Vordergrund stand die Entwicklung eines Mausmodells zur Untersuchung eines intrahepatischen Cholangiokarzinoms. Zudem stand die Evaluation einer möglichen Therapie mit genetisch modifizierten humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) und die wechselseitige Beeinflussung mit Cholangiokarzinomzelllinien (CCC) im Fokus. Es ist gelungen, mit dem orthotopen NOD/SCID-Mausmodells eine Grundlage zur Untersuchung des Cholangiokarzinoms zu entwickeln und ausgewählte Aspekte der Interaktion von hMSC und CCC herauszuarbeiten.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	- 6 -
1.1	EPIDEMIOLOGIE, PATHOGENESE UND RISIKOFAKTOREN	- 8 -
1.2	LOKALISATIONEN UND KLASSIFIKATIONEN	- 9 -
1.3	DIAGNOSTIK IM RAHMEN EINES CCC	- 9 -
1.4	THERAPIE UND PROGNOSE	- 10 -
1.4.1	<i>Die chirurgische Intervention einschließlich Lebertransplantation</i>	- 11 -
1.4.2	<i>Chemotherapien und adjuvante, radiologisch, interventionelle Therapien</i>	- 13 -
1.5	DER TUMOR UND SEIN MIKROMILIEU	- 14 -
1.6	MESENCHYMALE STAMMZELLEN	- 15 -
1.7	GEDANKE HINTER DEM EINSATZ VON MSCs ZUR TUMORTHERAPIE	- 16 -
1.8	CHOLANGIOKARZINOM-MODELLE	- 18 -
1.9	DAS ORTHOTOPE-NOD/SCID-MAUSMODELL	- 18 -
2	ZIELE DER ARBEIT	- 20 -
3	METHODEN	- 21 -
3.1	<i>IN-VIVO</i> -METHODEN	- 21 -
3.2	METHODEN ZUR ORTHOTOPEN INJEKTION DER TUMORZELLEN	- 21 -
3.2.1	<i>Vorbereitung der Tumorzellen zur orthotopen Injektion</i>	- 22 -
3.2.2	<i>Isolation der hMSC</i>	- 22 -
3.2.3	<i>Differenzierungs-Assays</i>	- 23 -
3.2.4	<i>Markierung der hMSC</i>	- 24 -
3.2.5	<i>Injektion der hMSCs</i>	- 24 -
3.2.6	<i>Sonographische Untersuchung</i>	- 25 -
4	IN-VITRO-METHODEN	- 25 -
4.1	DIE ZELLKULTUR	- 25 -
4.2	DAS KULTURMEDIUM	- 26 -
4.3	SUBKULTIVIERUNG DER CHOLANGIOKARZINOMZELLINIEN UND hMSC	- 26 -
4.4	BESTIMMUNG DER ZELLZAHL	- 26 -
4.5	KRYOKONSERVIERUNG	- 27 -
4.6	REKULTIVIERUNG NACH KRYOKONSERVIERUNG	- 27 -
4.7	ERMITTLUNG DER ZELLVIABILITÄT MIT HILFE EINES ZELLPROLIFERATIONS-ASSAYS	- 27 -
4.7.1	<i>Zellviabilität ohne weitere Behandlung</i>	- 27 -
4.7.2	<i>Zellviabilität unter Einfluss von Sorafenib, Gemcitabin und Cisplatin Behandlung</i>	- 28 -
4.7.3	<i>Zellviabilität unter Einfluss von hMSC-Überstand</i>	- 28 -
4.7.4	<i>Zellviabilität unter hMSC-Überstand und Sorafenib, Gemcitabine und Cisplatin</i>	- 29 -
4.8	ADHÄSIONS-ASSAY	- 29 -
4.9	TRANSMIGRATION-ASSAY (BOYDEN-CHAMBER)	- 29 -
4.10	ANGIOGENESE-ASSAY	- 30 -
4.11	TRANSFEKTION VON hMSC	- 30 -
4.12	PCR ZUM NACHWEIS DES WOODCHUCK-HEPATITIS-POST-TRANSCRIPTIONAL-REGULATORY-ELEMENT (WPRE)	- 31 -
4.13	HERSTELLUNG DER HISTOLOGISCHEN SCHNITTE	- 31 -
4.14	FÄRBUNGEN	- 31 -
4.14.1	<i>DAPI-Färbung</i>	- 31 -
4.14.2	<i>Kryoschnitte</i>	- 32 -
4.14.3	<i>Paraffinschnitte CD31, CK-7, KI-67, Hep-Par-1</i>	- 32 -
5	MATERIALIEN	- 34 -
5.1	TECHNISCHE GERÄTE	- 34 -
5.2	MATERIAL FÜR DIE ZELLKULTUR	- 35 -
5.3	MEDIEN, PUFFER FÜR DIE ZELLKULTUR	- 35 -
5.4	MEDIUM FÜR DIE KRYOKONSERVIERUNG	- 35 -
5.5	MATERIALIEN FÜR TRANSMIGRATION	- 35 -
5.6	MATERIALIEN FÜR CCK-8-ASSAY	- 36 -
5.7	MATERIALIEN FÜR ANGIOGENESE-ASSAYS	- 36 -
5.8	MATERIALIEN FÜR DIE ISOLIERUNG DER hMSCs	- 36 -

5.9	MATERIALIEN FÜR IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN	- 37 -
5.10	MATERIAL FÜR QRT-PCR, IN KOOPERATION MIT APCETH	- 37 -
5.11	MATERIAL FÜR DIE TIEREXPERIMENT	- 38 -
5.11.1	<i>Tiere</i>	- 38 -
5.11.2	<i>Op-Instrumente und Zubehör</i>	- 38 -
5.11.3	<i>Medikamente</i>	- 38 -
5.12	WEITERE MATERIALIEN	- 39 -
5.13	SOFTWARE	- 39 -
5.14	DIE ZELLINIEN	- 40 -
5.14.1	<i>Cholangiokarzinomzelllinien</i>	- 40 -
5.14.2	<i>hMSC</i>	- 40 -
5.14.3	<i>Transfizierte hMSC</i>	- 40 -
6	ERGEBNISSE	- 41 -
6.1	ERGEBNISSE AUS DEM ORTHOTOPEN NOD/SCID -MODELL	- 41 -
6.1.1	<i>Zyklus 1 (CL-6 induzierter Tumor)</i>	- 41 -
6.1.1.1	PCR von Lungen- und Tumorgewebe	- 42 -
6.1.1.2	Charakterisierung des gewonnenen Tumorgewebes	- 43 -
6.1.2	<i>Zyklus 2 (CL-6 induzierter Tumor)</i>	- 45 -
6.1.2.1	Gewicht und Sonografie	- 46 -
6.1.2.2	Detektion von Aszites	- 47 -
6.2	IN-VITRO ERGEBNISSE	- 51 -
6.2.1	<i>Proliferation über 48h sowie Wirkung von Cisplatin, Gemcitabine und Sorafenib</i>	- 51 -
6.2.2	<i>Proliferation nach Behandlung mit hMSC-Überstand</i>	- 52 -
6.2.3	<i>Proliferation nach Behandlung mit hMSC-Überstand und Cisplatin, Gemcitabine und Sorafenib</i>	- 52 -
6.2.4	<i>Zelladhäsions-Assay</i>	- 54 -
6.2.5	<i>Transmigration</i>	- 56 -
7	DISKUSSION	- 57 -
7.1	EINLEITUNG	- 57 -
7.2	INDUKTION DER TUMOREN	- 59 -
7.3	IMMUNHISTOLOGISCHER UND HISTOCHEMISCHER NACHWEIS DES CHOLANGIOKARZINOMS	- 59 -
7.4	HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG	- 59 -
7.5	SONOGRAPHIE UND EVALUATION DER TUMORGRÖßE	- 60 -
7.6	DER EINSATZ VON MESENCHYMALEN STAMMZELLEN	- 61 -
7.7	IN-VIVO-DYNAMIK DER HMSC: EINFLUSS AUF TUMORWACHSTUM UND METASTASIERUNG	- 62 -
7.8	IN-VITRO-EXPERIMENTE	- 63 -
7.9	PROLIFERATION VON CL-6 UND HUCCT-1	- 63 -
7.10	BEEINFLUSSUNG DER ADHÄSION VON HMSCS DURCH CL-6 UND HUCCT-1	- 64 -
7.11	INVASIONSVERHALTEN DER HMSC	- 64 -
7.12	EINFLUSS VON HMSC AUF DIE PROLIFERATION VON CL-6 UND HUCCT-1	- 65 -
8	ZUSAMMENFASSUNG	- 67 -
9	AUSBLICK	- 68 -
10	LITERATURVERZEICHNIS	- 69 -
11	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	- 79 -
12	TABELLENVERZEICHNIS	- 80 -
13	DANKSAGUNGEN	- 81 -
14	EHRENERKLÄRUNG	- 82 -
15	DARSTELLUNG DES BILDUNGSWEGS	- 83 -
16	PUBLIKATIONEN UND VORTRÄGE:	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Serumalbumin
CCC	Cholangio Cellular Carcinoma
CCK-8	Cell-Counting-Kit-8
CCL5	Chemokine C-C motif ligand 5 (s. a. RANTES)
CCR5	Chemokine C-C motif receptor 5
CD	Cluster of differentiation
CL-6	Cholangiokarzinomzelllinie, welche aus Aszites isoliert wurde
CT	Computertomografie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol- Fluoreszenzfarbstoff
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
ERCP	Endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie
EUS	Endosonographie
FBS	Fetales-Bovines-Serum
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
HuCCCT-1	Human liver bile duct carcinoma cell line
i.v.	Intra venös
KMP	Knochenmarkpunktion
LK	Lymphknoten
MRT	Magnetresonanztomografie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n.s.	nicht signifikant
PCR	Polymerase chain reaction
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
PSC	Primär Sklerosierende Cholangitis
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RPMI	Roswell Park Memorial Institute- Medium
RT	Raumtemperatur
SBRT	Stereotactic Body Radiotherapy
SIRT	Selective Internal Radiation Therapy
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TACI	Transarterielle Chemoinfusion
TME	Tumor microenvironment

1 Einleitung

Das Cholangiokarzinom (CCC) stellt eine Tumorentität dar, die mit einer epithelialen Differenzierung aus dem hepatobiliären System hervorgeht. Bei der Diagnose zeigen sich die Tumoren zumeist in einem fortgeschrittenen Stadium, das eine kurative Behandlung nicht mehr zulässt (Ustundag 2008; Ustundag und Bayraktar 2008; Mosconi et al. 2009; Rizvi und Gores 2013; Razumilava und Gores 2014; Rizvi et al. 2018). Für die sich meist als Adenokarzinom präsentierenden Tumoren stellt die chirurgische Intervention die einzige Möglichkeit dar, den Patienten von seiner Erkrankung zu heilen (DeOliveira et al. 2007; Neuhaus und Thelen 2008; DeOliveira et al. 2013; Wang et al. 2014; Doussot et al. 2015; Kambakamba et al. 2015; Neumann und Schmeding 2015). Allerdings bleiben die chirurgischen Erfolge aufgrund der ausgeprägten Neigung zu Rezidiven weit hinter den gewünschten Erwartungen an eine erfolgreiche Therapie zurück (Razumilava und Gores 2014).

Bei dem Cholangiokarzinom (CCC) handelt es sich um die häufigste neoplastische Veränderung des Hepatobiliären-Systems und um den zweithäufigsten malignen Primärtumor der Leber. Cholangiokarzinome umfassen einen Anteil von circa 3 % der gastrointestinalen Tumoren (Rizvi und Gores 2013, S. 1215; Rizvi et al. 2018) und machen damit weltweit 10 -25 % der primär hepatischen malignen Tumoren aus (Tyson und El-Serag 2011). Das CCC ist eine Erkrankung des höheren Alters, da es selten vor dem 40. Lebensjahr auftritt. Eine Ausnahme stellt hier indes die autoimmune primär sklerosierende Cholangitis (PSC) dar, bei der ein Auftreten eines CCC vor dem 40. Lebensjahr möglich ist (Rizvi und Gores 2013, S. 1).

Die Fünfjahresüberlebensrate von Patienten mit einem CCC hat sich seit 1979 nicht wesentlich verbessert, sie bleibt auf einem sehr niedrigen Niveau und rangiert im Mittel um 10 % (Everhart und Ruhl 2009, S. 1138–1139). Tyson und El-Serag 2011 beschreiben sogar, dass die Mortalitätsrate der Inzidenzrate gleichzusetzen sei.

CCC präsentieren sich mit seltenen Ausnahmen histologisch als Adenokarzinome, die im Gallengangepithel entstehen und als gut, mittel und schlecht differenziert eingeteilt werden können (Nakanuma und Kakuda 2015).

Die Einteilung des Cholangiokarzinoms erfolgt an der Leber orientiert und kann als proximal und distal beschrieben werden. Diese Beschreibung richtet sich nach dem Gallenfluss, wobei eine Subklassifizierung möglich ist. So wird das intrahepatische vom hilär (Klatskin-Tumor) auftretenden Karzinom unterschieden (Razumilava und Gores 2014, S. 1; Nakanuma und Kakuda 2015, S. 278).

Klinisch präsentiert sich das CCC meist mit sehr unspezifischen Symptomen, die allgemein von Gewichtsverlust, Nachtschweiß und Oberbauchbeschwerden über ikterische Verläufe hin zu vagen Laborwertveränderungen reichen. Bei letzteren kann es zu einem Anstieg der Transaminasen, Cholestaseparametern und eventuell zu einer Erhöhung des Tumormarkers CA 19-9 kommen (Ercolani et al. 2015, S. 1163).

Trotz intensiver Forschung ist es bisher nicht gelungen, eine adäquate Therapie zu entwickeln, die zu einer deutlichen Lebensverlängerung führt oder eine frühere Diagnose ermöglicht, da die meisten Cholangiokarzinome in einem Stadium entdeckt beziehungsweise diagnostiziert werden, das einen kurativen Ansatz nach heutigen Möglichkeiten ausschließt. Dies ist vor allem der Ursache geschuldet, dass sich erst spät Symptome zeigen, die auf die Erkrankung hinweisen könnten. Treten dann Symptome auf, sind diese meist nicht charakteristisch und können vielfältiger Natur sein, was eine schnelle Diagnose erschwert. Aus diesem Grund ist eine interdisziplinäre Zusammenarbeit in Diagnostik und Therapie unerlässlich und der Schlüssel zu einer optimalen Versorgung des Patienten. In den letzten Jahren ist das Mikromilieu des Tumors (TME) vermehrt in den Fokus des Interesses gerückt. Viele Errungenschaften in der Behandlung von konsumierenden Erkrankungen sind auf das bessere Verständnis der im Tumorstroma vorliegenden Bedingungen und des diffizilen Zusammenspiels von Zellen und der bestimmenden zellulären und entzündlichen Reaktion zurückzuführen. Dabei kommen neben T- und B-Zellen tumorassoziierte Makrophagen, Adipozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und im Speziellen auch mesenchymale Stammzellen (MSC) vor. Den MSC kommt dahingehend eine entscheidende und vielversprechende Rolle zu, da ihnen eine Beeinflussung der Tumorzellen im Hinblick auf Proliferation, Adhäsion, Invasion sowie auf die Resistenzbildung gegenüber chemotherapeutischen Regimen zugesprochen wird (Pittenger et al. 1999; Liechty et al. 2000; Spaeth et al. 2009; Bruyn et al. 2011; Barcellos-de-Souza et al. 2013). Damit stellen MSC einen vielversprechenden Angriffspunkt einer antitumoralen Therapie dar. Im Tiermodell wurden MSC bereits erfolgreich zur Behandlung verschiedenster maligner Tumoren eingesetzt (Conrad et al. 2007; Zischek et al. 2009; Niess et al. 2011; Bao et al. 2012; Kim und Cho 2013; Moniri et al. 2014; Uchibori et al. 2014). Eine breite klinische Anwendung von MSC an Patienten konnte allerdings bis dato nicht realisiert werden. Einzig mit einer Phase-I-II-Studie (Niess et al. 2015) erfolgte die erste klinische Erprobung, wobei zum Abschluss dieser Arbeit endgültige Ergebnisse abzuwarten waren.

Vor diesem Hintergrund ist eine eingehende weitere Erforschung unerlässlich, um Fortschritte auf dem Gebiet der MSC-basierten Tumorthherapie zu erzielen. An diesem Punkt setzt die vorliegende Arbeit an. Zur Untersuchung der möglichen Behandlung des Cholangiokarzinoms mit mesenchymalen Stammzellen wurde ein orthotopes Mausmodell entwickelt und die wechselseitige Interaktion von hMSC mit den Cholangiokarzinomzelllinien CL-6 und HuCCT-1 untersucht. Im Fokus standen dabei die Rekrutierung der hMSC zum TME und ihre Verteilungsdynamik sowie die Beeinflussung von Apoptose, Adhäsion, Proliferation, Transmigration und die Auswirkung auf die Behandlung mit zytoreduktiven und zytostatischen Agenzien.

1.1 Epidemiologie, Pathogenese und Risikofaktoren

Die Prävalenz des Cholangiokarzinoms divergiert bezogen auf die Kontinente und einzelne Regionen stark (Shaib und El-Serag 2004; Blechacz 2017). Dies lässt sich durch das Auftreten von regionalen Einfluss- und Risikofaktoren erklären (Bergquist und Seth 2015, S. 222).

Im Jahr 2004 wurden in den USA 6200 Patienten mit einem CCC gemeldet, wobei in mehr als 74 % der Fälle die Patienten das 65. Lebensjahr bereits überschritten hatten (Everhart und Ruhl 2009, S. 1138). Dies entspricht einer Inzidenzrate von 1,6 pro 100.000 Einwohner (Khan et al. 2019). Demgegenüber ist in Deutschland die Inzidenz des Cholangiokarzinoms mit rund 3 Fällen auf 100.000 Einwohner geringfügig erhöht (Khan et al. 2019; Banales et al. 2016).

Die alters- und genderabhängige Verteilung der Inzidenz des CCC zeigt, dass es selten vor dem 40. Lebensjahr (Tyson und El-Serag 2011, S. 1) auftritt und Männer etwas häufiger betroffenen sind als Frauen (Bergquist und Seth 2015, S. 222; Blechacz 2017).

Anhand verschiedener Metaanalysen lässt sich erkennen, dass es zum einen durch eine Fehlklassifikation von hilär beziehungsweise intrahepatisch wachsenden Tumoren und zum anderen durch eine späte Diagnosestellung, die eine Unterscheidung der einzelnen Manifestationsorte nicht mehr zulässt, zu Schwierigkeiten in der Interpretation und Unterteilung des CCC kommen kann (Welzel et al. 2006; Khan et al. 2012b; Bergquist und Seth 2015, S. 222).

Studien, die die Entwicklung der weltweiten Inzidenz des CCC analysieren, kamen selten zu einem einheitlichen Ergebnis, abgesehen von der Aussage, dass es einen Anstieg der intrahepatischen CCC zu verzeichnen gab (Saha et al. 2016; Bergquist und Seth 2015; Khan et al. 2012b; Shaib und El-Serag 2004).

Auch bezogen auf Deutschland musste in den letzten Jahren ein Anstieg der Inzidenz des intrahepatischen CCC festgestellt werden (Hahn et al. 2011, S. 1093).

Bei der Behandlung des CCC konnte in den letzten Jahren eine dezente Verbesserung bezüglich der Einjahresüberlebensrate erreicht werden. Eine Fünfjahresüberlebensrate von ~10 % bleibt aber unverändert schlecht und spiegelt die Aggressivität und den zu lokalen Rezidiven neigenden Phänotyp des CCC wider (Everhart und Ruhl 2009, S. 1138; Ustundag 2008). Hinzu kommt, dass das CCC meist in einem Stadium diagnostiziert wird, in dem für den betroffenen Patienten kein kurativer Ansatz angestrebt werden kann. Demgegenüber zeigen sich nur circa 30 % der Tumoren in einer Ausdehnung, die eine chirurgische Resektion und damit einen kurativen Ansatz zulassen, wobei damit Fünfjahresüberlebensraten von bis zu 50 % erreicht werden können (Neumann und Schmeding 2015, S. 296). Im Mittel überleben 40 % der Patienten die ersten fünf Jahre nach einer chirurgischen Resektion (Ustundag und Bayraktar 2008, S. 6461).

Es sind verschiedenste Risikofaktoren für die Entwicklung eines Cholangiokarzinoms bekannt. Neben diesen werden viele weitere begünstigende Faktoren für die Entstehung dieser Tumorentität

vermutet, wenngleich es bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht gelungen ist, einen direkten Nachweis für diese Zusammenhänge zu erbringen.

Zunächst muss festgestellt werden, dass es in Bezug auf das Cholangiokarzinom zwar etablierte Risikofaktoren gibt, es aber nur selten gelingt, diese im individuellen Fall zu identifizieren (Tyson und El-Serag 2011, S. 1).

Der Risikofaktor, der mit der höchsten Wahrscheinlichkeit verbunden ist, ein Cholangiokarzinom zu begünstigen, ist der Befall mit den Parasiten *Opisthorchis viverrini* und *Clonorchis sinensis*. Diese treten vor allem in Asien auf und haben regional dazu geführt, dass das Cholangiokarzinom in der Inzidenz das hepatozelluläre Karzinom (HCC) von der ersten Stelle der primären Leberkarzinome verdrängt hat (Sriamporn et al. 2004, S. 590–592; Tyson und El-Serag 2011, S. 1). Ein Befall mit *O. viverrini* und *C. sinensis* geht mit einem fünffach erhöhten Risiko, an einem Cholangiokarzinom zu erkranken, einher (Songserm et al. 2012).

Bezogen auf Europa sind die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) und zystische Veränderungen der Gallengänge als größte Risikofaktoren zu nennen (Tyson und El-Serag 2011, S. 3–4; Kirstein und Vogel 2016, S. 397).

Weitere mögliche Risikofaktoren für die Entwicklung eines Cholangiokarzinoms sind Colitis Ulzerosa, M. Crohn, Infektionen mit dem Hepatitis-B- und Hepatitis-C-Virus, Leberzirrhose, Diabetes, Adipositas per magna sowie Alkohol- und Nikotinabusus.

Zu den genannten Faktoren liegen zahlreiche Studien vor, die durch Tyson und El-Serag 2011 zusammengefasst wurden.

1.2 Lokalisationen und Klassifikationen

Das Cholangiokarzinom ist nach der WHO grob in zwei verschiedene Typen gegliedert (Ercolani et al. 2015, S. 1162–1163). Diese Einteilung bezieht sich auf die Lage des Tumors zur Leber und wird entweder als intrahepatisch oder extrahepatisch beschrieben, wobei eine genauere Unterteilung der beiden Gruppen möglich ist. Liegt der Tumor extrahepatisch, so wird der hilär wachsende Tumor von den distal wachsenden Tumoren abgegrenzt. Dieser wird auch als Klatskin-Tumor bezeichnet und seine Subunterteilung orientiert sich an der Anatomie der Hepatikusgabel (Nakeeb et al. 1996; Suarez-Munoz et al. 2013). Klatskin-Tumoren machen circa 50 % der CCC aus (Suarez-Munoz et al. 2013). Die entsprechende Einteilung von Bismuth und Corlette umfasst vier Typen, wobei Typ III in eine A und B Form untergliedert wird (Suarez-Munoz et al. 2013).

1.3 Diagnostik im Rahmen eines CCC

Das Cholangiokarzinom manifestiert sich allgemein durch die für konsumierende Erkrankungen typischen Symptome wie Gewichtsverlust, Abgeschlagenheit und Nachtschweiß. Daneben treten je

nach Manifestationsort Zeichen einer Cholestase, abdominelle Beschwerden und allgemeines Unwohlsein auf (Blechacz et al. 2011). Bei der Labordiagnostik können zum einen die Cholestaseparameter wie γ -GT, Bilirubin und alkalische Phosphatase erhöht sein (Khan et al. 2002). Des Weiteren lassen sich Beeinträchtigungen des Leberstoffwechsels detektieren, die zum einen mit einer Erhöhung der Transaminasen GPT und GOT (ALAT, ASAT) einhergehen können, zum anderen finden sich erniedrigte Werte von Albumin und den Vitaminen A, D, E und K. Je nach Fortschritt der Tumorerkrankung lassen sich eine ausgeprägte Anämie und erhöhte LDH-Werte als Marker für einen gesteigerten Zellzerfall feststellen (Khan et al. 2002).

Bei der Diagnose eines Cholangiokarzinoms kommt der Bildgebung eine wesentliche Rolle zu. Da ein CCC vielfach mit einer Cholestase einhergeht, ist zumeist die sonographische Untersuchung die erste Modalität (Fábrega-Foster et al. 2017). Wie Fábrega-Foster et al. beschreiben, kann die Spezifität durch eine Kontrastmittelgabe erhöht werden. Daneben ist die Computertomographie (CT) ein auch für den routinemäßigen Einsatz bedeutendes Bildgebungsverfahren, das die oft zufällig diagnostizierten CCC gut in ihrem Ausmaß darstellen kann (Fábrega-Foster et al. 2017; Guro et al. 2017). Zusätzlich zu CT und Sonografie kommt die Magnetresonanztomografie zur detaillierten Darstellung der Infiltration etwa von Gallenwegen zum Einsatz (Fábrega-Foster et al. 2017, S. 69). Ergänzung finden die genannten Untersuchungstechniken durch die Positronen-Emissions-Tomografie (PET) und die Magnetresonanztomografie-Cholangiopankreatikographie (MRCP), die zur Abschätzung einer Resektabilität am besten geeignet sind (Brandi et al. 2016, S. 233). Die endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie (ERCP) und die Endosonografie (EUS) komplettieren die Möglichkeiten zur Darstellung des Tumors (Brandi et al. 2016, S. 233; Khan et al. 2002).

Tumormarker spielen in der Diagnostik des CCC, wie bei vielen malignen Erkrankungen, nur eine untergeordnete Rolle. Sie sind zwar in vielen Fällen erhöht, bleiben in ihrer Spezifität allerdings auf einem niedrigen Level und sind hier nur der Vollständigkeit erwähnt. CA 19-9 ist dabei der am häufigsten genannte Parameter mit einer Spezifität von 63 % (Blechacz et al. 2011; Benavides et al. 2015, S. 983). Daneben existieren eine Reihe weiterer Marker: CEA, CYFRA 21-1, CA 242 (Uenishi et al. 2003; Khan et al. 2002; Blechacz et al. 2011).

1.4 Therapie und Prognose

Die zurzeit einzige Möglichkeit für eine kurative Therapie des Cholangiokarzinoms ist die komplette chirurgische Entfernung des Tumors und seiner eventuell aufgetretenen lokalen Metastasen (Khan et al. 2012; Bridgewater et al. 2014). Jegliche weitere Therapie wird noch immer nur unter der Maxime einer Lebensverlängerung durchgeführt, wodurch das Ziel einer kurativen Behandlung nicht erreicht wird. Zur groben Orientierung kann gesagt werden, dass die Therapie auf zwei Säulen fußt und auf

der einen Seite die chirurgische Intervention und auf der anderen alle weiteren Therapien beinhaltet. Unter diesen weiteren Therapien sind zu verstehen: die Chemotherapie mit ihren verschiedenen Facetten (zum Beispiel systemisch, aber auch lokal verabreicht), Brachytherapie, Kryotherapie, Chemoembolisation sowie die Phototherapie.

Als prognostischer Marker gilt in der Therapie zum einen der Resektionsrand (Mosconi et al. 2009; Wang et al. 2015a, 2015b), der den höchsten prognostischen Wert nach einer chirurgischen Intervention besitzt, zum anderen geben die mikrovaskuläre Invasion, lokale beziehungsweise Lymphknoten-Metastasen (Klempnauer et al. 1997; Bagante et al. 2015) und eventuelle intraoperative Gefäßrekonstruktionen einen Anhaltspunkt für das Langzeitüberleben.

Daneben ist ein in der Histologie hochdifferenzierter Tumor als prognostisch günstiger anzusehen (Mosconi et al. 2009; Mao et al. 2015).

1.4.1 Die chirurgische Intervention einschließlich Lebertransplantation

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, stellt die chirurgische Intervention noch immer die einzige Therapieoption dar, die in kurativer Intention durchgeführt werden kann (Khan et al. 2012a; Bridgewater et al. 2014). Obwohl die chirurgischen Möglichkeiten in den letzten Jahren eine stete Weiterentwicklung erfahren haben und viele intra-, peri- und postoperative supportive Maßnahmen entwickelt wurden, sind die Ergebnisse und erreichbaren Ziele noch immer begrenzt (Wang et al. 2014; Neumann und Schmeding 2015, S. 296). Zudem ist anzumerken, wie auch Ercolani et al. 2015 berichten, dass es nur wenige ausführliche Studien gibt, die alle Tumorlokalisationen und ihren unterschiedlichen Outcome vergleichen.

Absicht der chirurgischen Intervention sollte eine R0-Resektion sein, da dies direkt mit dem Outcome der Therapie korreliert und eine R1-Resektion im Gegenzug keine Therapievorteile gegenüber einem chemotherapeutischen Regime mit sich bringt.

Die chirurgische Intervention orientiert sich in ihrer Ausführung und Radikalität zum einen an der Ausdehnung und zum anderen an der Lokalisation des Tumors in Bezug auf die Leber und das Gallengangsystem. Dabei stellen mögliche positive Lymphknoten keine absolute Kontraindikation mehr dar (Razumilava und Gores 2014, S. 10). Jeder Operation sollte stets eine exakte Darstellung des Tumors und der infiltrierten Strukturen vorausgehen. Dies kann durch eine MRT- oder CT-Aufnahme erfolgen. Ergänzend kommt die Gallengangdarstellung durch MRCP oder ERC zum Einsatz, um zum Beispiel eventuell vorhandene Strikturen, die durch das Tumorwachstum verursacht werden, zu erfassen, und, wenn nötig, mit Hilfe einer Stentimplantation zu beheben. Zudem eignet sich die ERC-Untersuchung, um mittels einer Bürstenzytologie einen Hinweis auf das Vorhandensein von Tumorzellen zu erlangen (Razumilava und Gores 2014, S. 9). Ergänzend kann eine Darstellung mit Hilfe der Sonografie versucht werden, wobei eine Abgrenzung zum normalen Lebergewebe durch

das diffus-infiltrative Wachstum jedoch oftmals erschwert ist. Auf eine Nadelbiopsie sollte aufgrund der möglichen Tumoraussaat indes verzichtet werden, wenn eine kurative R0-Resektion möglich scheint (Razumilava und Gores 2014).

Die chirurgische Intervention sollte für jeden Patienten individuell angepasst und nach onkochirurgischen Gesichtspunkten durchgeführt werden. Hierzu zählen allgemein der Versuch einer En-Bloc-Resektion sowie die No-Touch-Technik. Des Weiteren erfolgt eine chirurgische Therapie unter dem Gesichtspunkt der anatomischen Ausbreitung, die nachfolgend kurz zusammengefasst ist. Bei distal wachsenden Cholangiokarzinomen wird häufig eine Duodenopankreatektomie im Sinne einer Operation nach Whipple durchgeführt (Neumann und Schmeding 2015).

Das hilär wachsende Cholangiokarzinom präsentiert sich durch seine anatomische Lage in ca. 90 % der Patienten initial mit einer Cholestase (Razumilava und Gores 2014, S. 9) und zum Zeitpunkt der Diagnose ist nur eine geringe Anzahl an Tumoren dieser Lokalisation resezierbar (Kambakamba et al. 2015). Eine R0-Resektion eines hilär wachsenden Cholangiokarzinoms ist häufig nur durch eine ausgedehnte Resektion zu erreichen, da diese Tumoren eine ausgeprägte Tendenz zeigen, sich perineural, vaskulär sowie lymphatisch auszubreiten. Je nach Ausdehnung des hilär wachsenden Tumors ist das chirurgische Vorgehen anzupassen. Dieses Vorgehen beinhaltet allgemein eine En-Bloc-Resektion, Resektion infiltrierter Gefäße und Lymphknoten, Entnahme der infiltrierten Gallengänge sowie Mitnahme von im Anschluss unzureichend drainierten Lebersegmenten und die anschließende Reanastomosierung verbleibender anatomischer Strukturen. Dies geschieht unter dem Gesichtspunkt, dass postoperativ ein sicherer Gallenabfluss und eine adäquate Blutversorgung sichergestellt sind (Neumann und Schmeding 2015).

Bei intrahepatisch wachsenden CCC ist das Leberparenchym infiltriert, meist auch diffus und in einer größeren Ausbreitung. Oftmals kann allerdings durch eine anatomische, nichtanatomische oder gegebenenfalls eine Hemihepatektomie eine R0-Situation geschaffen werden, vgl. hierzu Doussot et al. 2015, S. 297. Diese Studie zeigt, dass in 80,4 % der Fälle ein tumorfreier Rand erreicht werden konnte, der als relevantester prognostischer Faktor maßgebend für das Langzeitüberleben ist (s. o.). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass im Vergleich zu den anderen Lokalisationen eine perineurale Infiltration und der Befall von Lymphknoten reduziert auftreten (vgl. Ercolani et al. 2015). Zusätzlich kann eine präoperative Portalvenenembolisation erwogen werden, was zu einer Atrophie des betroffenen Lebersegments führt und kompensatorisch eine Hypertrophie des gesunden Leberparenchyms bewirkt. Gelegentlich kommt es dabei zu einer unzureichenden Hypertrophie des gesunden Leberparenchyms. In dieser Situation kann über ein operatives Verfahren nachgedacht werden, wobei mittels Ligatur der portalvenöse Zustrom unterbunden wird. Zudem kann eine perkutane Gallenableitung erwogen werden (Neumann und Schmeding 2015, S. 296).

Die Lebertransplantation stellte früher gerade in Deutschland aufgrund des Mangels an möglichen Organen primär keine Therapieoption dar. Zudem ließen schlechte Überlebensraten und eine hohe Quote an Rezidiven die Lebertransplantation nicht als mögliche Option erscheinen. Erst in den letzten Jahren wurden auf diesem Gebiet größere Fortschritte erzielt, was vermutlich auf eine bessere Selektion und die Einführung einer neoadjuvanten Therapie zurückzuführen ist (Sapisochín et al. 2015). Die Verfügbarkeit von Organen und die späte Diagnose eines CCC bleiben allerdings weiterhin eine große Herausforderung. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass bessere Resultate mit Patienten erzielt wurden, die an einer primär sklerosierenden Cholangitis erkrankt waren (Rosen et al. 2012). Iwatsuki et al. und Sapisochín et al. machen als ungünstige prognostische Marker ein hohes Alter, eine lange Wartezeit auf ein Spenderorgan, einen hohen CA-19-9-Spiegel sowie eine vorangegangene Cholezystektomie mit starker Inflammation aus.

Clavien et al. beschreibt 2012, dass die Lebertransplantation als mögliche Behandlungsoption erst Zuspruch finde, wenn eine Fünfjahresüberlebensrate erreicht werden könne, die über 50 % liege.

Die bereits erwähnte neoadjuvante Therapie beinhaltet die Gabe von 5-Fluoruracil, Radiatio, Brachytherapie und die orale Gabe von Capecitabin nach einem bestimmten Schema (Darwish Murad et al. 2012). Sapisochín et al. zeigen auf, dass die Rate an Rekurrenz von 20 % bei neoadjuvant behandelten Patienten im Vergleich zu unbehandelten signifikant niedriger ist. Zudem stellen sie fest, dass bei intrahepatisch wachsenden CCC das Outcome im Vergleich zur hilären Lokalisation nach wie vor unbefriedigend ist und eine genauere Selektion vielleicht zu einem verbesserten Gesamtergebnis führen könnte.

1.4.2 Chemotherapien und adjuvante, radiologisch, interventionelle Therapien

Da sich die Mehrzahl der Patienten, bei denen die Diagnose eines CCC gestellt wird, bereits in einem fortgeschrittenen Stadium befindet, stellt die systemische Chemotherapie zumeist eine Behandlungsoption dar, um die mediane Überlebenszeit zu verlängern.

Als palliative Therapie kommt hierbei eine Kombinationstherapie aus Gemcitabin und einem Platinderivat zum Einsatz. Valle et al. 2010 fanden in ihrer Studie heraus, dass eine Kombination aus Cisplatin und Gemcitabin im Durchschnitt eine Verbesserung der Überlebenszeit zur Folge hatte (11,7 vs. 8,1 Monate im Vergleich zu Gemcitabin als Monotherapie). Zudem konnte mit dieser Kombination in der Studie das progressionsfreie Überleben von 5,0 auf 8,0 Monate erhöht werden. Ein Nachteil in der Toxizität konnte dabei nicht festgestellt werden. Gleichwohl zeigte sich eine höhere Rate an Neutropenie, die allerdings keinen zusätzlichen negativen Effekt bezüglich vermehrter Infektionen zur Folge hatte. Platinderivate wirken hierbei über die Quervernetzung der DNA durch Bindung an Purinbasen, was zur Apoptose führt (Ghosh et al. 2019). Die Wirkungsweise von Gemcitabin auf Cholangiokarzinome ist noch immer nicht abschließend untersucht. Toyota et al.

2019 konnten nachweisen, dass Gemcitabin zu einem G1-Arrest durch die Reduzierung von Cyclin D1 führt; zudem wird eine Hochregulation von antitumoralen miRNA beschrieben.

Studien mit dem Multikinaseinhibitor Sorafenib fanden in Einzelfällen (Pinter et al. 2011) einen möglichen Vorteil für das Gesamtüberleben, weshalb dieser Inhibitor in den Versuchsansätzen dieser Arbeit eingesetzt wurde. Sorafenib wirkt über Rezeptorthyrosinkinasen sowie auf dem RAF-MEK-ERK-Signalweg (Abdelgalil et al. 2019).

Eine Kombination von Cisplatin und Gemcitabin mit weiteren antikörperbasierten Therapieoptionen, wie zum Beispiel Cetuximab (Malka et al. 2014) konnten keine Verbesserungen der Überlebensraten bewirken.

Chemotherapeutische Regime können zudem in einem adjuvanten Setting nach einem chirurgischen Eingriff in Betracht gezogen werden, worüber jedoch in einem multidisziplinären Team entschieden werden sollte. Maßgebende Faktoren hierfür sind eine R1-Resektion, positive Lymphnoten und mikrovaskuläre Invasion (Doussot et al. 2015, S. 453). Dabei kommt ebenfalls häufig die Kombination aus Cisplatin und Gemcitabin zum Einsatz. Dies beruht auf dem Wirkungsnachweis in Patienten, die keine Resektion erhalten hatten und einer primären Chemotherapie zugeführt wurden. Ein einheitliches Schema diesbezüglich ist aufgrund mangelnder Datenlage allerdings nicht etabliert. Wie die o. g. Aufführung möglicher Therapieregime zeigt, ist die Datenlage zu einzelnen chemotherapeutischen Therapieoptionen uneinheitlich und mit wenig suffizienten Studien belegt.

Aus diesem Grund muss festgestellt werden, dass kein chemotherapeutisches Therapieregime größere Fortschritte hin zu einer möglichen Wachstumskontrolle garantieren kann. Vor diesem Hintergrund sollte eine chemotherapeutische Behandlung kritisch betrachtet werden, da das Cholangiokarzinom damit nicht immer effektiv behandelt werden kann.

Neben der Chemotherapie stellt die radiologische Intervention gerade für nicht resezierbare CCC eine Therapiemöglichkeit dar. Neben TACE, TACI und SIRT (Yang et al. 2015) existieren zahlreiche weitere Methoden zur lokalen Behandlung eines CCCs. Es können SBRT (Mahadevan et al. 2015), RFA (Patel et al. 2015) und eine Brachytherapie in Erwägung gezogen werden (Sahai und Kumar 2017), um dem Patienten ein angepasstes Therapieregime zu ermöglichen.

1.5 Der Tumor und sein Mikromilieu

In den letzten Jahren konnten der Einfluss und die Bedeutung des Mikromilieus von Tumoren, auch Tumor microenvironment (TME) genannt, herausgearbeitet werden. Vor diesem Hintergrund verwundert es nicht, dass die Einflüsse des TME auf das Wachstum, die Invasion, die Metastasierung und die Rezidivraten von Tumoren immer besser verstanden werden. Ferner stellt das TME mehr und mehr einen bedeutsamen Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer Therapien dar, die sich aus den gewonnenen Erkenntnissen über das diffizile Zusammenspiel der enthaltenen zellulären Bestandteile

und den bestimmten Einflussfaktoren ableiten. Eine große Herausforderung besteht allerdings in der Komplexität des TME, die zumeist eine individuelle Herangehensweise in der Entwicklung von neuartigen Therapieansätze erfordert. Hinzu kommt, dass das TME einen unterschiedlichen Einfluss auf die Proliferation, Invasion und Metastasierung von Tumoren ausübt. Eine zentrale Rolle spielt hierbei die chronische Inflammation als Bestandteil einer Immunantwort, die der Tumorentwicklung voraus- oder mit dieser einhergeht. Zum einen kann eine chronische Inflammation zu einer erhöhten Inzidenz von Tumoren führen (beispielhaft bei kolorektalen Karzinomen als Folge einer chronischen Darmerkrankung oder auch dem HCC, dem häufig eine chronische Leberzirrhose vorausgeht). Zum anderen stellt eine Immunsuppression einen erheblichen Risikofaktor dar, einen Tumor zu entwickeln. Prominentestes Beispiel ist die Infektion mit dem HI-Virus, die im Stadium AIDS zu einer erheblichen Suppression der Immunantwort führt und Grundlage für die Entstehung AIDS-assoziiierter Tumoren ist (Quail und Joyce 2013).

Im TME kommen einzelnen Zellgruppen entscheidende Aufgaben zu, die die Immunantwort regulieren. Hierzu zählen neben einer Vielzahl anderer Zellarten die mesenchymalen Stammzellen, die in der vorliegenden Arbeit im Fokus stehen.

Die Wirkungen der MSC im TME sind vielfältig. So kommen zahlreiche Untersuchungen zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich deren Wirkung auf das Wachstum sowie die Apoptose, Inflammation und Metastasierung von Tumoren (vgl. Sun et al. 2014; Kim und Cho 2013).

In Studien konnte nachgewiesen werden, dass mesenchymale Stammzellen in der Behandlung von Tumoren aussichtsreich eingesetzt werden können (Niess et al. 2011; Moniri et al. 2014; Uchibori et al. 2014).

Fundament hierfür ist eine genetische Veränderung der MSC, die auch die Grundlage für die bereits initiierte Phase-I/II-Studie zur Behandlung von fortgeschrittenen gastrointestinalen Tumoren darstellt (Niess et al. 2015).

1.6 Mesenchymale Stammzellen

Die mesenchymalen Stammzellen (MSC) sind in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus der Forschung gerückt, da sie eine vielversprechende Quelle möglicher therapeutischer Optionen sowohl in der regenerativen Medizin als auch bei immunvermittelten Erkrankungen darstellen. Dabei sind MSC eine leicht zu gewinnende Zellart, die zumeist aus dem Knochenmark, Fettgewebe oder Blut isoliert wird (Niess et al. 2011, S. 767; Uchibori et al. 2014). Zudem besitzen sie durch Multipotenz die Fähigkeit, sich unter einem bestimmten Selektionsdruck in Adipozyten, Chondrozyten, Endothelzellen, Fibrozyten, Myozyten sowie im Binde- und Sehnengewebe zu differenzieren (Pittenger 1999; Silva 2005).

Mesenchymale Stammzellen dienen im adulten Gewebe zur Aufrechterhaltung der Homöostase, auf

die sie durch verschiedene Wechselwirkungen Einfluss nehmen. Dabei handelt es sich bei den MSC um eine leicht zu gewinnende Zellart. Die Schwierigkeit besteht allerdings in der eindeutigen Identifizierung dieser Zellen, da noch kein singulärer und eindeutiger Zellmarker gefunden werden konnte, der spezifisch für die MSC ist. Dies hat zur Folge, dass verschiedene Eigenschaften herangezogen werden müssen, um mit Hilfe eines komplexen Musters an Markerproteinen eine sichere Identifizierung zu ermöglichen. Dabei kommen verschiedene Zelloberflächen-Markerproteine zum Einsatz, wie zum Beispiel CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 und STRO-1. Außerdem ist das Fehlen von bestimmten Markerproteinen für MSC charakteristisch. Hierzu zählen: CD34, CD45 sowie HLA-DR (Tsai et al. 2011a, S. 1047; BUHRING et al. 2007, S. 263).

Die in dieser Arbeit genutzten humanen MSC wurden aus dem Knochenmark von Spendern (hbMSC) gewonnen, isoliert und durch die Firma apceth Biopharma GmbH bereitgestellt.

1.7 Gedanke hinter dem Einsatz von MSCs zur Tumorthherapie

Wie lassen sich nun MSC zur Tumorthherapie einsetzen? Eine direkte antiproliferative Wirkung der MSC kann zum jetzigen Zeitpunkt weder ausgeschlossen noch bestätigt werden, da unterschiedliche Arbeitsgruppen diesbezüglich zu verschiedenen Ergebnissen kommen. Von einigen Arbeitsgruppen wird in diesem Zusammenhang eine antiproliferative und antiangiogene Wirkung diskutiert (vgl. hierzu Djouad 2003; Khakoo et al. 2006; Qiao et al. 2008; Gabashvili et al. 2016). Andere Studien zeigen auf eine proliferative Wirkung von MSCs (Zhu et al. 2006)(Karnoub et al. 2007; Xu et al. 2009; Tsai et al. 2011b; Wu et al. 2016).

Grundlage für den Einsatz von MSC für eine antitumorale Therapie ist die Fähigkeit, in das TME zu migrieren. Dieser Vorgang wird auch als Homing bezeichnet (Studený et al. 2004; Karnoub et al. 2007; Kidd et al. 2009; Kim und Cho 2013; Sun et al. 2014, S. 2; Serakinci et al. 2014, S. 1526). Dabei spielen zahlreiche Chemokine, Zytokine, Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren eine Rolle, die durch das TME ausgeschüttet werden und zur Bildung eines inflammatorischen Mikromilieus beitragen. In der Zusammenschau kann gesagt werden, dass IL-1 β , IL-6, TNF- α , VCAM-1, TGF- β SDF-1 und sein Rezeptor CXCR4, um die relevantesten zu nennen, einen entscheidenden Einfluss auf das Homing haben (Studený et al. 2004; Kidd et al. 2009; Uchibori et al. 2013; Kim und Cho 2013; Serakinci et al. 2014). Daneben existieren zahlreiche weitere Faktoren, die einen Einfluss auf die Migration der MSC in das TME besitzen.

Diese aufgezeigten Eigenschaften bilden den Ausgangspunkt, MSC nach genetischer Modifikation in der Tumorthherapie einzusetzen. In diesem Zusammenhang wurden bereits einige Ansätze unter Nutzung von MSC zur Therapie von Tumoren entwickelt, die durch (Bao et al. 2012; Gamba et al. 2015) zusammengefasst wurden.

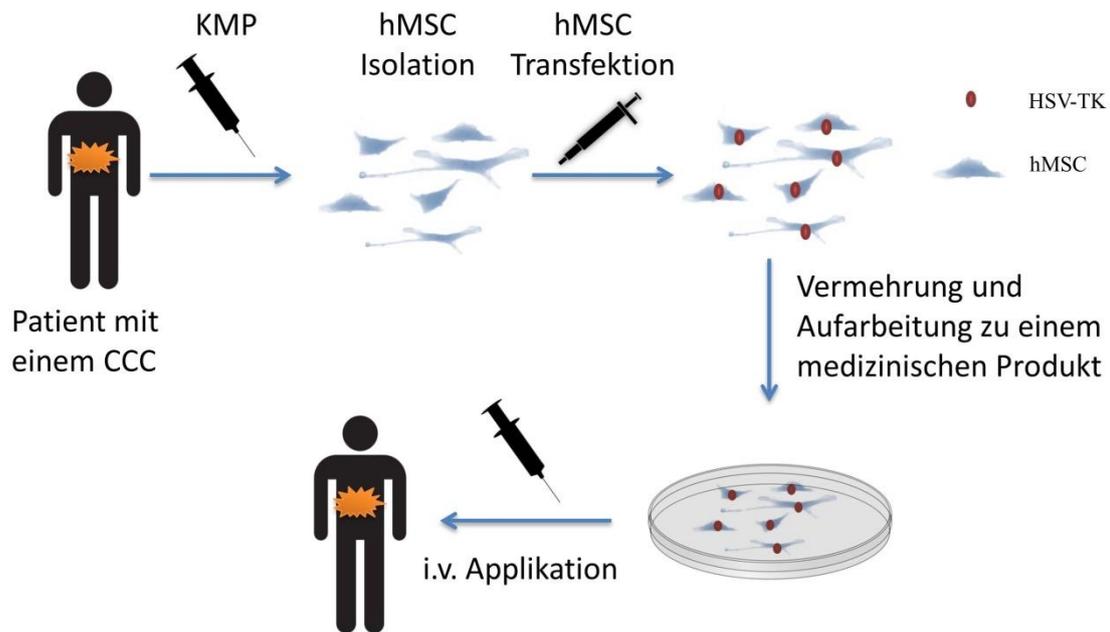


Abbildung 1: Klinikalalgorithmus der hMSC-Therapie (Abkürzungen: HSV-TK: Herpes-Simplex Thymidinkinase, hMSC: humane mesenchymale Stammzellen, KMP: Knochenmarkpunktion)

Das vorliegende Modell basiert auf der Verwendung von genetisch veränderten mesenchymalen Stammzellen, die ein Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase exprimierendes Genkonstrukt enthalten, das mit Hilfe eines Plasmides durch Transfektion in das Genom der humanen MSC eingebracht wurde. Die Expression dieser HSV-Thymidinkinase steht unter der Kontrolle eines CCL5-Promotors. Bei CCL-5 (auch RANTES) handelt es sich um ein Chemokin mit einer Größe von 8 kDa (Khalid et al. 2015), das in der Umgebung von Tumoren durch mesenchymale Stammzellen ausgeschüttet wird und mit einer verstärkten Metastasierung in Verbindung gebracht wird (Karnoub et al. 2007; Aldinucci und Colombatti 2014). Dabei wirkt CCL5 über die Rezeptoren CCR1, CCR3 sowie CCR5 (Tanaka et al. 2005).

Die Kontrolle durch einen CCL5-Promoter hat zur Folge, dass die HSV-Thymidinkinase nur in der Umgebung von Tumoren exprimiert wird (Karnoub et al. 2007) und so als tumorselektiver Aktivator von Ganciclovir zur antiproliferativen Therapie eingesetzt werden kann (Gamba et al. 2015).

In der Klinik folgt nach der Selektion der Patienten zunächst eine Knochenmarkpunktion. Das so gewonnene Knochenmark wird aufbereitet und die mesenchymalen Stammzellen werden isoliert und aufgereinigt, bevor die mesenchymalen Stammzellen im Anschluss transfiziert werden. Nach entsprechender Vermehrung der transfizierten MSC werden diese nach vorher bestimmten Qualitätskriterien zu einem medizinischen Produkt aufgearbeitet und überprüft. Im Anschluss erfolgt die i. v. Gabe in mehrfachen Zyklen, jeweils gefolgt von einer Applikation von Ganciclovir. Dieses Prinzip ist in Abbildung 2 zusammengefasst, wobei in Abbildung 1 die klinische Anwendung skizziert ist.

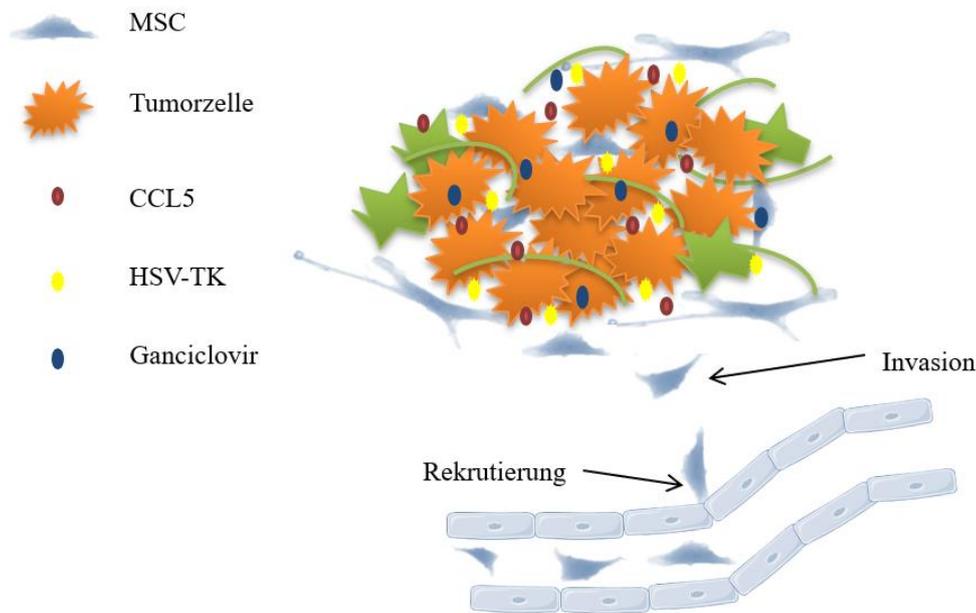


Abbildung 2: Prinzip der genetisch veränderten hMSC zur Tumorthherapie (Abkürzungen: MSC: mesenchymale Stammzellen, HSV-TK: Herpes-Simplex-Thymidinkinase, CCL-5: Chemokine C-C motif ligand 5)

1.8 Cholangiokarzinom-Modelle

In der Literatur wurden bereits verschiedene Modelle zur Untersuchung des Cholangiokarzinoms beschrieben (Lai et al. 2005; Sirica et al. 2008; Blechacz et al. 2009; Zhang et al. 2010; Saborowski et al. 2013), die durch Ko et al. 2013 zusammengefasst wurden.

In der zur Verfügung stehenden Literatur fehlte bisher allerdings ein geeignetes CCC-Mausmodell, um die Effektivität einer möglichen MSC-Tumorthherapie eines Cholangiokarzinoms zu untersuchen. Um den realen Gegebenheiten eines humanen Cholangiokarzinoms nahe zu kommen, wurde daher ein orthotopes NOD/SCID-Mausmodell entwickelt, wobei die Tumorzelllinien CL-6 und HuCCT-1 zur Induktion eines intrahepatischen Cholangiokarzinoms direkt in die Mäuseleber eingebracht wurden, um im Anschluss das Tumorstadium zu charakterisieren. Zur Untersuchung und Abschätzung einer erfolgreichen therapeutischen Behandlung eines CCC wurden die wie in Abbildung 2 beschriebenen modifizierten humanen MSC in diesem Mausmodell eingesetzt.

1.9 Das orthotope-NOD/SCID-Mausmodell

In der Praxis wurde dazu orthotope NOD/SCID-Mäuse genutzt, denen die Tumorzellen direkt in die Leber injiziert wurden. Als Grundlage wurde ein B- und T-Zell-defizitärer und an einem Diabetes Mellitus Typ I leidender NOD/SCID-Mäusestamm eingesetzt. Zusätzlich ist dieser Mäusestamm nicht in der Lage, natürliche Killerzellen zu bilden. Diese beschriebenen Eigenschaften bildeten die Voraussetzung, um xenogene Zellen in einem In-vivo-Versuch zu untersuchen, da die Implantation

humaner Tumorzellen zu keiner Immunantwort führt und körperfremde Strukturen in diesem Mäusestamm nicht erkannt werden (Shultz et al. 2014).

Bei der NOD/SCID-Maus handelt es sich um eine Albinomaus mit der Bezeichnung NOD/SCID NOD.CB17/AlhnRj-Prkdc^{scid}/R, die angesichts ihrer Immundefizienz unter besonders keimarmen Bedingungen gehalten wird.

Im orthotopen NOD/SCID-Mausmodell werden die oben beschriebenen Eigenschaften der NOD/SCID-Maus genutzt, um Tumoren der Leber zu untersuchen.

In unserem Modell wurden die Cholangiokarzinomzelllinien der CL-6- (Wongkajornsilp et al. 2009, S. 141; Chajjaroenkul et al. 2011, S. 56) und der HuCCT-1-Reihe (Miyagiwa M 1989) direkt in die Leber injiziert, um somit ein intrahepatisches Cholangiokarzinom zu induzieren und anschließend zu analysieren. Da die Maus sehr anfällig für exogene mikrobiologische Noxen war, erfolgte eine möglichst keimarme Haltung im Tierstall. Es wurden maximal fünf Mäuse mit einem zwölfstündigen Tagnachtrhythmus und bei konstant 21 °C in einem Käfig gehalten.

Der Versuchsaufbau und die sich daran anschließenden Ziele der Arbeit sind in Abbildung 3 zusammengefasst.

2 Ziele der Arbeit

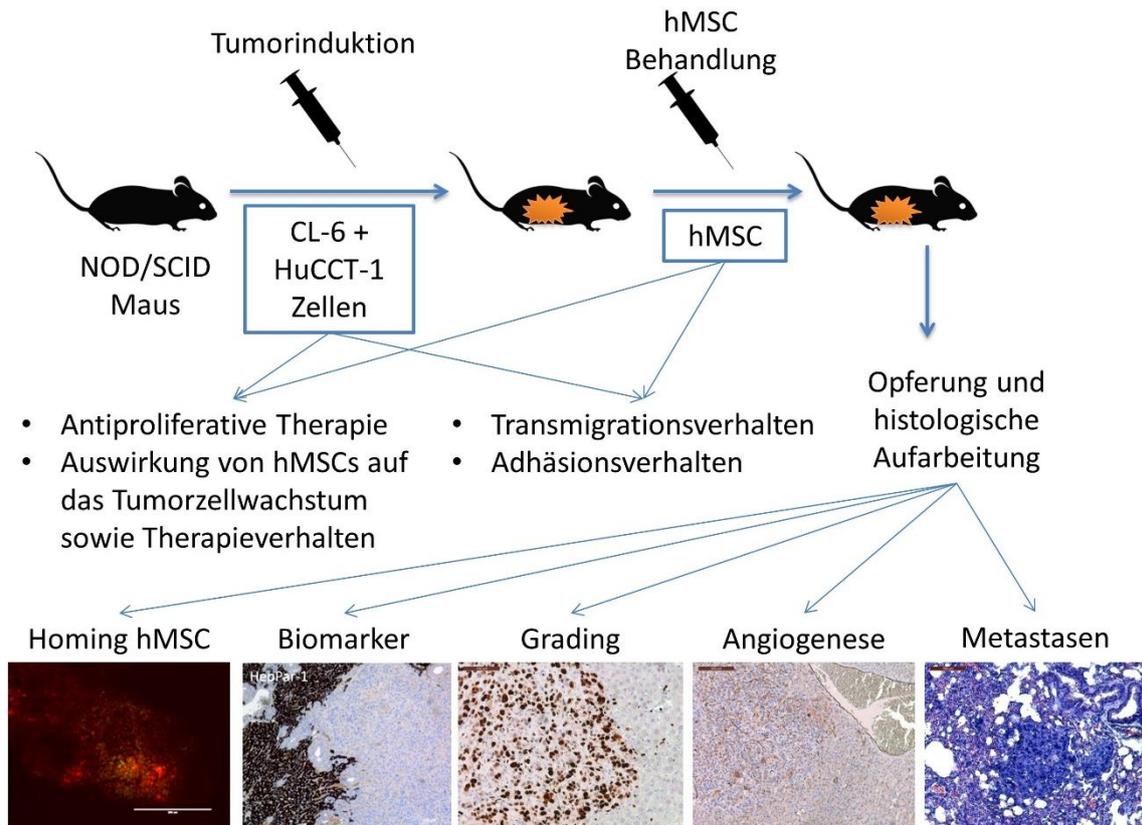


Abbildung 3: Arbeitsübersicht

Das Cholangiokarzinom mit seinem aggressiven Wachstum und zu lokalen Rezidiven neigenden Phänotyp stellt im klinischen Alltag trotz intensiver Forschung weiterhin eine schwer zu behandelnde Tumorentität dar. Geeignete Tiermodelle, um eine effektive Simulation des Tumormikromilieus zu erreichen, sind rar und bleiben vor dem Hintergrund unzähliger möglicher Interaktionen des Wirtsgewebes sowie der Tumorzellen stets fehlerbehaftet. Zunächst ist es daher das Ziel der vorliegenden Arbeit, ein Tiermodell zu entwickeln, das die bestmögliche Interaktion von Tumor- und Lebergewebe im Tiermodell simulieren kann. Im Anschluss soll die wechselseitige Beeinflussung von Tumorzellen und mesenchymalen Stammzellen sowie deren Einfluss auf antiproliferative Therapien untersucht werden. Im Detail wird dabei das Transmigrations- und Adhäsionsverhalten der hMSC als indirekte Marker für die Invasion des Tumormilieus erforscht. Die Wirkung der Chemotherapeutika Cisplatin und Gemcitabin sowie des Multikinaseinhibitors Sorafenib auf die Tumorzelllinien und eine mögliche Beeinflussung des Therapieansprechens durch hMSC sind weiterhin Gegenstand und Ziel dieser Arbeit.

3 Methoden

3.1 *In-vivo*-Methoden

Die Tierversuche wurde nach Genehmigung durch das Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt, unter der Antragsnummer 42502-2-1266 UniMD, durchgeführt. Die Tierhaltung erfolgte in Gruppen zu maximal fünf Tieren sowie mit uneingeschränktem Zugang zu Wasser und Nahrung und in einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus.

3.2 Methoden zur orthotopen Injektion der Tumorzellen

Vor Durchführung einer Injektion der Tumorzellen wurden die Mäuse durch intraperitoneale Instillation von Ketamin in einer Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht narkotisiert. Nach anschließender kompletter Rasur des Abdomens und einer lokalen Desinfektion wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt und so weit bis an das Sternum heran präpariert, bis die Leber ohne Mühe mit einem Wattestäbchen exponiert werden konnte. Bei der Darstellung der Leber war ein vorsichtiges Vorgehen erforderlich, da es hierbei leicht zu einer Schädigung der großen Gefäße kommen konnte.



Abbildung 4: Injektion der Tumorzellen in den exponierten Leberlappen

Die vorbereitete Menge an Tumorzellen (s. Tabelle 1) wurde direkt in den freigelegten Leberlappen injiziert, wobei darauf geachtet werden musste, nicht zu tief, aber auch nicht zu oberflächlich zu stechen, da bei einer zu oberflächlichen Injektion die Gefahr einer peritonealen Aussaat und damit der Instillation einer ungenügenden Menge an verbliebenen Tumorzellen in das Lebergewebe bestand (vgl. Abbildung 4). Bei einer zu tiefen Einbringung hätte es zu Verletzungen tieferliegender Strukturen kommen können, was zu einem Verlust der Maus oder einer ungewollten Lokalisation des Tumors hätte führen können.

Nachdem die Injektion erfolgt war, musste die Injektionsstelle für einige Minuten unter leichtem Druck verschlossen werden, um ein Herausfließen von Tumorzellen zu verhindern. Anschließend wurde die Maus Schicht für Schicht zugenäht und lokal nochmals desinfiziert. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter einer Wärmelampe, um eine zu starke Auskühlung der Maus zu verhindern.

Eventuelles Austrocknen der Maus wurde durch die direkte intraabdominelle Gabe von 0,9 % NaCl-Lösung verhindert.

3.2.1 Vorbereitung der Tumorzellen zur orthotopen Injektion

Die Tumorzellen wurden nach dem Standardprotokoll (s. u.) aus den Zellkulturflaschen herausgelöst. Nach Bestimmung der Zellanzahl und zweimaliger Waschung mit DPBS wurden $1 \cdot 10^6$ Zellen mit 20 μ L DPBS und 20 μ L Matrigel verdünnt, wobei zu beachten war, dass eine homogene Zellsuspension hergestellt wurde. Für den folgenden Transport zum Tierstall wurde die Zellsuspension bis zum Zeitpunkt der Injektion auf Eis gelagert. Den Mäusen wurden nach der oben beschriebenen Präparation der Leber 40 μ L der Zellsuspension, was einer Zellzahl von $1 \cdot 10^6$ Zellen entsprach, direkt in die Leber injiziert. Im Anschluss erfolgte eine engmaschige Überwachung der Versuchstiere.

Tabelle 1: Tumorinduktion durch CL-6

Gruppe	Tumor Zellen/Tier	App.-Volume; μ L	App.-Art	Tierart	Tiere (n)	Behandlungstag
1	1×10^6	40 μ L PBS + 40 μ L Matrigel	Intra-hepatic	SCID/NOD	4	1
2	1×10^6	40 μ L PBS + 40 μ L Matrigel	Intra-hepatic	SCID/NOD	4	1
3	1×10^6	40 μ L PBS + 40 μ L Matrigel	Intra-hepatic	SCID/NOD	4	1
4	1×10^6	40 μ L PBS + 40 μ L Matrigel	Intra-hepatic	SCID/NOD	4	1
5	1×10^6	40 μ L PBS + 40 μ L Matrigel	Intra-hepatic	SCID/NOD	4	1

3.2.2 Isolation der hMSC

Die Isolation, Qualitätssicherung und Bereitstellung der hMSC erfolgten aus humanem Knochenmark und wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Professor P. Nelson sowie der Firma Apceth realisiert. In diesem Rahmen wurde uns für diese Arbeit ein Grundstock an MSC durch Apceth GmbH & Co. KG, Munich, Germany zur Verfügung gestellt.

Die Aufarbeitung durch Apceth erfolgte jeweils nach den gleichen Protokollen, wie sie durch Niess et al. 2015 und Einem et al. 2019 beschrieben wurden. Hierzu erfolgte die Isolation der MSC aus Knochenmark welches 1:1 mit Lysepuffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur gemischt wurden. Bei unzureichender Lyse wurde der Überstand abgenommen und der Bodensatz mit Lysepuffer erneut resuspendiert und für weitere 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde alles zentrifugiert und die Pellets wurden mit DPBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und

Resuspension mit DMEM erfolgte die Aussaat in 75-ml-Kulturflaschen. Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt und bei einer Konfluenz von 80–90 % wurden die hMSC in einem Verhältnis von maximal 1:4 gesplittet.

3.2.3 Differenzierungs-Assays

Die Differenzierungs-Assays der MSC erfolgten als Qualitätssicherung vor dem Start der Versuchsreihe und vor Bereitstellung durch Apceh GmbH & Co. KG. Neben den genannten Kriterien von Niess et al. BMC Cancer (2015) wurden die Zellen zudem auf eine adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierung überprüft, wobei die Aussaat in 6-Well-Platten und 3 ml Medium vorgenommen wurde. Bei einer Konfluenz von 80 % begann die Differenzierung und es wurden die jeweiligen Medien hinzugegeben (s. Tabelle 3: Medien für hMSC Differenzierung).

Zur chondrogenen Differenzierung erfolgte die Zentrifugation von 2×10^5 Zellen, die anschließend mit Medium überschichtet wurden und nach 24 h Inkubation im Wärmeschrank in eine 96-Well-Platte überführt werden konnten (s. Tabelle 3: Medien für hMSC-Differenzierung).

Der Nachweis der adipogenen Differenzierung wurde mit der Oil-Red-Färbung (unten beispielhaft aufgeführt) erbracht. Dazu wurde das Medium abgesaugt und anschließend erfolgte die Fixierung mit 4 % Formalin für 20 Min. bei Raumtemperatur. Nach einmaliger Waschung mit DPBS wurde eine 0,03 % Oil-Red-Lösung hinzugegeben und für weitere 20 Min. inkubiert. Anschließend folgte erneut eine dreimalige Waschung mit DPBS.

Der Nachweis der osteogenen Differenzierung wurde mit der Alizarinrot-Färbung vorgenommen. Dazu wurde das Medium abgesaugt, um anschließend die Fixierung mit 4 % Formalin für 20 Min. bei Raumtemperatur durchzuführen. Nach einmaliger Waschung mit NaCl-Lösung wurde 1 % Alizarinrot-Lösung hinzugegeben und für weitere 10 Min. inkubiert. Anschließend erfolgte die nochmalige dreimalige Waschung mit NaCl-Lösung.

Zum Nachweis der chondrogenen Differenzierung wurde die Alcianblau-Färbung verwendet. Nach der Fixierung in Formalin wurde das Pellet in Paraffin eingebettet. Nach der Deparaffinierung erfolgte die 30-minütige Inkubation mit 0,5 % Alcianblau-Lösung. An die Waschung mit H₂O schloss sich die Überschichtung mit Kernechtrot für 5 Min. an, um anschließend erneut mit H₂O gewaschen zu werden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Mikroskops.

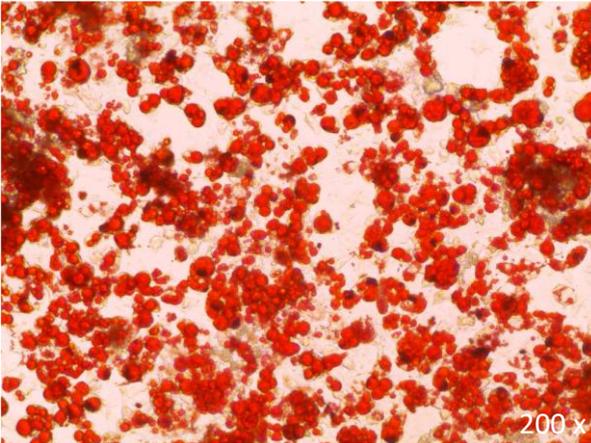


Abbildung 5: Beispiel der Oil-Red-Färbung nach adipogener Differenzierung

3.2.4 Markierung der hMSC

Zur späteren Detektion bei der histologischen Aufarbeitung wurden die hMSC im 2. Zyklus mit dem CellTracker Red CMTPX markiert. Dazu wurden die Zellen aus den Kulturflaschen nach dem Standardprotokoll (s. 4.3, 4.4) herausgelöst und gezählt. Nach der ersten Waschung wurden die Zellen abzentrifugiert. Nach Verdünnung des Farbstoffes mit DMEM (1X) ohne Phenol Red im Verhältnis 1:100 wurden die Zellen für 30 Min. inkubiert. Nach der Zentrifugation und zweimaliger Waschung mit DPBS wurde eine Verdünnung der Zellen mit dem Injektionsmedium auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/300 μ l Medium eingestellt. Die Effektivität der Färbung wurde mit einem FACS-Gerät überprüft, wobei im Mittel 90 % der Zellen als angefärbt nachgewiesen werden konnten (vgl. Abbildung 6).

3.2.5 Injektion der hMSCs

Die Injektion der hMSC erfolgte über die Schwanzvenen der Versuchstiere. Dazu wurden die Mäuse in einer Halterung fixiert, um mögliche Verletzungen durch Bewegungen der Maus so gering wie möglich zu halten. Ein Auskühlen der Tiere wurde durch eine Wärmelampe verhindert. Nachdem die Spritze luftleer gemacht wurde und sichergestellt war, dass sich keine Verklumpungen im Injektionsmedium befanden, erfolgte die langsame und vorsichtige Injektion von $1 \cdot 10^6$ Zellen/300 μ l Medium.

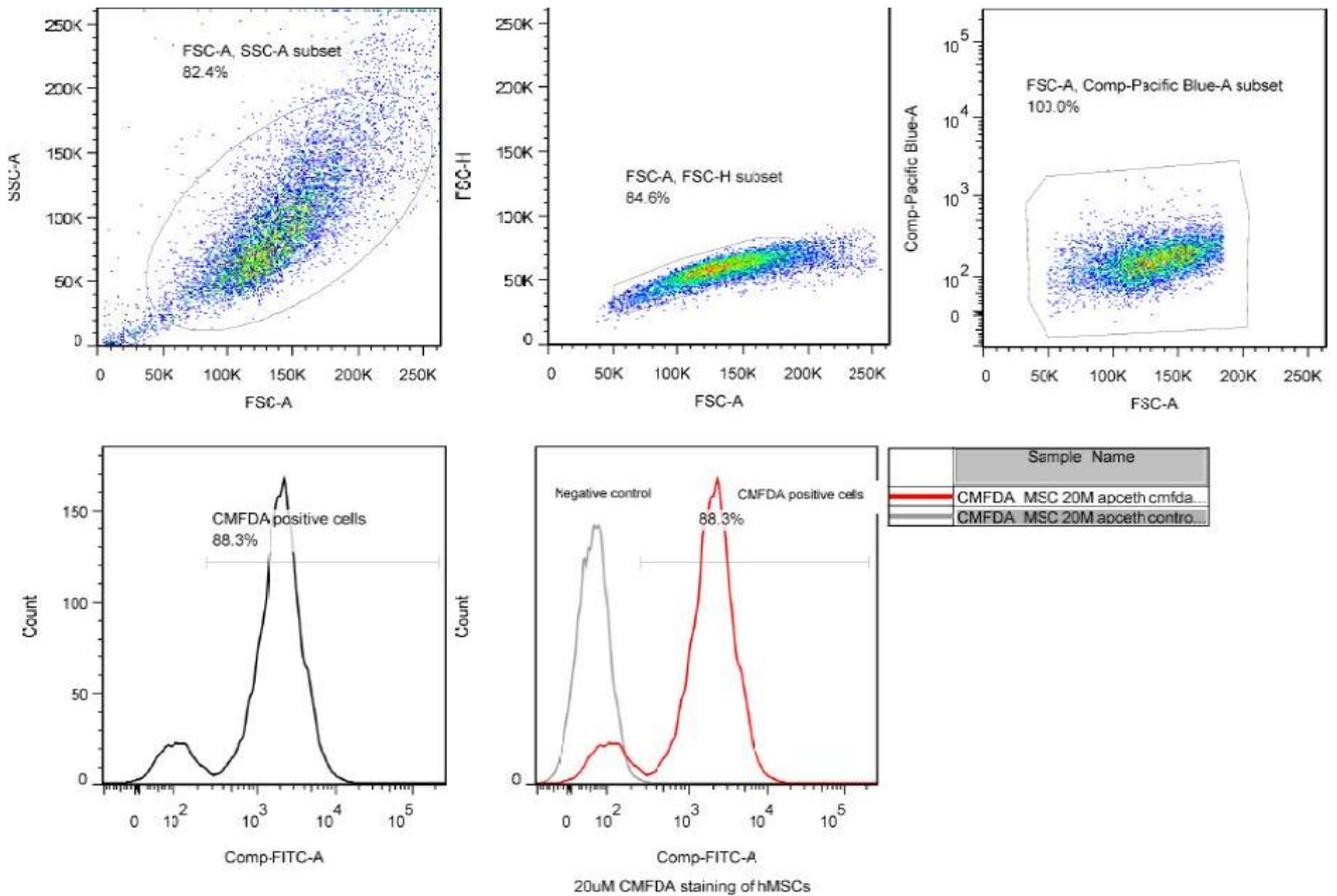


Abbildung 6: Beispiel FACS gestützter Nachweis der markierten hMSCs

3.2.6 Sonographische Untersuchung

Zwei Tage vor der Operation erfolgte im 2. Tierversuchszyklus eine Sonographie zur möglichen Tumordetektion sowie Abschätzung der Tumorgöße und des Tumorwachstums. Hierzu wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn PD Dr. Udelnow die Mäuse kurzzeitig in einem Maus-Restrainer teilfixiert, um mit Hilfe des Sonographiegerätes LOGIQ E9 von GE die Untersuchung durchführen zu können. Als Ultraschallkopf wurde der MS5-D-Schallkopf von GE verwendet.

Nach der Fixierung der Mäuse wurde das Abdomen rasiert und etwas Ultraschallgel aufgetragen. Hauptproblem der Untersuchung war die Beweglichkeit der Mäuse, was eine genaue Einstellung der zu untersuchenden Region teilweise erschwerte. Es wurden jeweils Einzelbilder im Bereich der größten Tumorausdehnung gemacht und am Gerät direkt vermessen.

4 In-vitro-Methoden

4.1 Die Zellkultur

Für *CL-6*, *HuCCT-1* und *hMSC*

Jede Arbeit mit den genannten Zelllinien wurde unter einer sterilen Werkbank mit Absaugvorrichtung durchgeführt. Soweit es nötig war (Ausnahme: Trypsin/EDTA), wurden die verwendeten Substanzen vor ihrem Gebrauch in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

4.2 Das Kulturmedium

Für CL-6 und HuCCT-1 wurden RPMI (Roswell Park Memorial Institute) Medium 1640 (1X) + GlutaMAX mit 10 % FBS, 1-prozentige Penicillin-Streptomycin- und 1-prozentige Normocin-Lösung verwendet.

Für die hMSC wurden DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium, 1g/L D-Glucose, L-Glutamin, Pyruvat) mit 10 % FBS und 1-prozentige Penicillin-Streptomycin-Lösung eingesetzt.

Die verwendeten Medien und Supplemente, mit Ausnahme der verwendeten Trypsin/EDTA-Lösung, wurden vor ihrem Einsatz in den Zellkulturen in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Das Kulturmedium in den Zellkulturen wurde alle zwei Tage durch frisches Medium ersetzt.

4.3 Subkultivierung der Cholangiokarzinomzelllinien und hMSC

Alle verwendeten Zelllinien wurden weitgehend nach der nachfolgend aufgeführten Vorgehensweise angesetzt und kultiviert. Eine Ausnahme bildeten hierbei die hMSC, die von einem Grundstock kultiviert und nach Bezug nur einmalig passagiert wurden, um keine Eigenschaften zu verändern und die Zellen nicht in ihrem Wachstum zu beeinträchtigen.

Die Zellen wurden geteilt, wenn eine Konfluenz von > 85 % in den Kulturflaschen erreicht wurde. Nach dem Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen mit DPBS wurde 0,05 % Trypsin-EDTA (0,5 ml für T-25-, 1,5 ml für T-75-, beziehungsweise 3,5 ml für T-175-Zellkulturflaschen) hinzugegeben und die Kulturen wurden bis zum Ablösen der Zellen für ca. drei bis 7 Min. inkubiert. Dabei zeigte sich, dass die HuCCT-1-Zelllinie eine stärkere Adhärenz aufwies, was sich in längeren Einwirkzeiten des Trypsin/EDTA im Vergleich zur CL-6- Zelllinie niederschlug. Durch die Zugabe von frischem Medium in die Kulturgefäße (2 ml je T-25-, 4 ml je T-75- beziehungsweise je 8 ml T-175-Zellkulturflasche) wurde die Reaktion gestoppt, um im Anschluss die Zellen in ein 15-ml-Falcon-Röhrchen zu überführen und nach der Bestimmung der Zellzahl bei 1200 rpm für 5 Min. zu zentrifugieren. Das Zellpellet wurde in 5 ml des jeweiligen Mediums resuspendiert. Die Rekultivierung erfolgte nach den experimentellen Erfordernissen und richtete sich nach der Anzahl an Zellen, die für die jeweiligen Experimente benötigt wurde.

4.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet.

Nach Herstellung einer homogenen Zellsuspension, unter Vermeidung der Bildung von Konglomeraten, wurden 50 µl der Suspension mit 50 µl Trypanblau vermengt (Verhältnis 1:1), um anschließend unter dem Mikroskop ausgezählt zu werden. Dazu wurden 10 µl der Suspension blasenfrei unter ein Deckgläschen der Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter 200-facher Vergrößerung betrachtet. Anschließend wurden alle vitalen Zellen gezählt, die ein nicht blaufärbtes Zytoplasma aufwiesen, da die Blaufärbung für einen Membrandefekt spricht und damit ein

entscheidender Hinweis für eine tote Zelle ist.

4.5 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung orientierte sich an einer Methode, die die Bildung von Eiskristallen in den Zellen, die zu einer Zerstörung der Zellstrukturen führen, verhindert und damit eine Langzeitlagerung der Zellen ermöglicht. Die Zellen wurden dafür wie unter dem Punkt der Subkultivierung beschrieben durch Trypsinisierung aus den Zellkulturflaschen abgelöst. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurde der Zelltiter auf 2–4 Mio. Zellen/ml unter Verwendung eines leicht modifizierten Mediums, das 20 % FBS und 5 % DMSO enthielt, eingestellt und die erhaltene Zellsuspension in sterile 2 ml-Kryotubes überführt. Die Kryotubes wurden dann in einen speziellen Einfrierbehälter überführt, der anschließend bei -80 °C über Nacht gelagert wurde, um ein langsames Einfrieren mit einer Abkühlrate von 1 K/Min. zu gewährleisten. Am nächsten Tag wurden die eingefrorenen Zellen in einem Tiefkühlschrank bei -150 °C eingelagert.

4.6 Rekultivierung nach Kryokonservierung

Die erneute Rekonditionierung der Zellen nach einer Kryokonservierung erforderte eine zügige Vorgehensweise, um eine nachfolgende Schädigung der aufzutauenden Zellen durch enthaltenes DMSO zu verhindern. Die Kryotubes wurden dazu aus dem Tiefkühlschrank entnommen und für circa 1 Min. in das auf 37 °C vorgewärmte Wasserbad gegeben. Nachdem die gesamte Flüssigkeit aufgetaut war, schloss sich die Zentrifugation für 5 Min. bei 1100 rpm an. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Resuspension der Zellen erfolgte in je 2 ml frischem Kulturmedium. Danach wurden die Zellen in einer T-75-Zellkulturflasche ausgesät und für 24 h kultiviert, bevor schließlich das Medium gewechselt wurde.

4.7 Ermittlung der Zellviabilität mit Hilfe eines Zellproliferations-Assays

Die Zellviabilität wurde unter Verwendung eines Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays ermittelt, das für die einzelnen Versuche modifiziert eingesetzt wurde. Zur Bestimmung der Zellproliferation wurde das Cell-Counting-Kit-8 (CCK-8) der Firma Dojindo Laboratoris, Japan, eingesetzt.

4.7.1 Zellviabilität ohne weitere Behandlung

Für die Vorbereitung des Proliferationsassays wurden die beiden Zelllinien CL-6 und HuCCT-1 für 24 h in einer 96-Well-Platte in aufsteigender Konzentration ($1 \cdot 10^3$, $2 \cdot 10^3$, $3 \cdot 10^3$... $10 \cdot 10^3$) kultiviert. Die jeweilige Anzahl an Zellen wurde in 200 µl FBS-freiem RPMI-Medium ausgesät, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch das FBS zu verhindern.

Die Zellproliferation wurde nach Inkubation der Zellen mit Hilfe eines Cell-Counting-Kit-8 (CCK-8) detektiert. Der Nachweis der vorhandenen Anzahl oder der metabolischen Aktivität der Zellen

wurde über das Ausmaß der Reduktion des wasserlöslichen Tetrazoliums Salzes WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-Disulfophenyl)-mono-Natriumsalz] durch intrazelluläre Dehydrogenasen unter Beteiligung der Reduktionsäquivalente NADH/NAD bestimmt, die mit der Bildung eines Formazan-Farbstoffes durch einen Farbumschlag von Gelb zu Orange reagiert. Dieser Farbumschlag ist proportional zur Zellviabilität und kann durch eine photometrische Bestimmung ausgewertet werden. Hierzu muss das Medium, das sich in den Wells befindet, entfernt und durch die nach Anleitung hergestellte CCK-8-Lösung ersetzt werden. Als Verdünnungsmittel wurde farbloses RPMI-Medium 1640 verwendet. Nach Herstellung der CCK-8-Lösung wurden 110 µl der Lösung in ein Well pipettiert. Nach einer Inkubation bei 37 °C für eine Stunde in einem Zellkulturschrank erfolgte die Auswertung bei 450 nm durch den Infinite M200 Pro Multimode Reader.

4.7.2 Zellviabilität unter Einfluss von Sorafenib, Gemcitabin und Cisplatin Behandlung

Der Versuch wurde nach dem in Punkt 4.7 genannten Prinzip durchgeführt. Dazu wurden $4 \cdot 10^3$ Zellen pro Well ausgesät und die Zellen zum Anwachsen für 24 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen einer Chemotherapeutika-Behandlung unterzogen. Hierfür wurden in parallelen Ansätzen in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe 1, 2, 5, 10 mM/ml Sorafenib sowie 1, 10, 100, 1000 ng/ml Gemcitabin beziehungsweise 10, 20, 40, 60 µg/ml Cisplatin in die Wells pipettiert. Es wurden 200 µl der so hergestellten Lösung appliziert, was dem Volumen bei der Aussaat entsprach.

4.7.3 Zellviabilität unter Einfluss von hMSC-Überstand

Die oben beschriebene Vorbereitung zur Bestimmung der Zellviabilität wurde mit Hilfe eines kommerziell verfügbaren Cell-Counting-Kit(CCK-8)-Assays durchgeführt. Zum Einsatz kamen $4 \cdot 10^3$ Zellen pro Well. Nach 24 h wurde das Medium entfernt und durch den hMSC-Überstand (Supernatant; Herstellung s. u.) ersetzt. Als Kontrolle kam das RPMI zum Einsatz. In drei zeitlichen Stufen (24 h, 48 h, 72 h) erfolgte die Färbung der Zellen mit Hilfe des CCK-8-Assays und einer anschließenden kolorimetrischen Bestimmung des intrazellulär umgesetzten Formazanfarbstoffes bei einer Wellenlänge von 450 nm unter Nutzung eines Mikrotiterplattenreaders.

Zur Herstellung des hMSC-Überstands wurden hMSC in einer T-75- oder T-175-Kulturflasche mit DMEM, 10 % FBS und 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung ausgesät (abhängig von der erforderlichen Menge an hMSC-Überstand). Nachdem eine Konfluenz von 70–80 % erreicht wurde, wurde das DMEM durch RPMI ausgewechselt, das ohne FBS und PS zum Einsatz kam. Vor diesem Schritt wurde eine zweimalige Waschung mit DPBS vorgenommen, um eventuellen Verunreinigungen mit dem eingesetzten DMEM entgegenzuwirken. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurde der Überstand entnommen und durch eine Filter Unit Millex-OR 0,22 µm filtriert. Der so gewonnene Überstand wurde danach entweder direkt in einem angeschlossenen Experiment

verwendet oder für maximal zehn Tage bei -20 °C in 15-ml-Falcon-Tubes eingelagert, um bei entsprechenden Erfordernissen aufgetaut zu werden.

4.7.4 Zellviabilität unter hMSC-Überstand und Sorafenib, Gemcitabine und Cisplatin

Für diesen Versuch wurden am ersten Tag des Experiments $4 \cdot 10^3$ Zellen pro Well in 200 μ l RPMI ausgesät und über Nacht kultiviert. Nach 24 h wurde das Kulturmedium entfernt, durch den zuvor gewonnenen hMSC-Überstand ersetzt und für weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurde der hMSC-Überstand entnommen und die Therapie mit den genannten Substanzen konnte durchgeführt werden. Die Zellviabilität wurde dann nach nochmaliger 24-h-Inkubation ausgewertet.

4.8 Adhäsions-Assay

Die Tumorzelllinien (CL-6 und HuCCT-1) wurden für das Zelladhäsionsassay in einer 96-Well-Platte ausgesät und über 24 h inkubiert. Pro Well wurden hierfür $1 \cdot 10^4$ Zellen in 200 μ l RPMI verwendet. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen und es wurden $5 \cdot 10^3$ hMSC, die mit CellTracker Red CMTPX markiert waren, hinzu pipettiert (Protokoll zur CMTPX-Markierung siehe oben). Als Kontrolle wurde DMEM eingesetzt. Nach 5, 15 und 30 Min. wurde der Überstand entnommen und die Zellen wurden mit 4 % Formalin fixiert.

Die Auswertung wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop vorgenommen, wobei fünf repräsentative Felder des jeweiligen Wells ausgezählt wurden. Für eine genauere Auswertung wurden die Bilder mit ImageJ bearbeitet.

4.9 Transmigrations-Assay (Boyden-Chamber)

Die Transmigration von hMSC wurde mit einem Doppelkammersystem untersucht. In der unteren Kammer befand sich dabei der Tumorzell-Überstand, in die obere Kammer wurden die hMSC pipettiert. Abgetrennt waren beide Kammern durch eine Membran, die den direkten Austausch verhinderte. Der für die Transmigration benötigte Tumorzell-Überstand wurde gewonnen, indem die jeweilige Tumorzelllinie in eine T-75-Zellkulturflasche ausgesät und bis zu einer Konfluenz von > 80 % kultiviert wurde. Dies war nach zwei bis drei Tagen der Fall. Anschließend wurde das RPMI-Medium, das 10 % FBS enthielt, nach dreimaligem Waschen mit DPBS durch ein FBS-freies RPMI-Medium ersetzt. Die Zellen wurden daraufhin über 24 h erneut kultiviert. Nach der Kultivierung wurde das Medium entnommen und durch einen Filter mit 0,22 μ m großen Poren filtriert, um eventuelle zelluläre Bestandteile abzutrennen. 500 μ l dieses Überstands wurden dann in eine 24-Well-Platte pipettiert und es wurde der spezielle Transmigrationseinsatz aufgesetzt. In die obere Kammer dieses Einsatzes erfolgte die Pipettierung von $5 \cdot 10^4$ hMSC in 200 μ l DMEM. Diese Anordnung wurde wiederum für 24 h inkubiert. Danach wurde der Transmigrationseinsatz entnommen, die

verbliebende Flüssigkeit abgesaugt und die obere Kammer dreimal mit DPBS gespült sowie mit einem Wattestäbchen vorsichtig trocken gesaugt. Anschließend erfolgte die Fixierung in 4 % Formalin für 30 Min. Daraufhin wurden die Zellen nach Entfernen des Formalins mit Crystal-violet-Solution-Färbelösung beschichtet und für 20 Min. inkubiert.

Zur Auswertung wurde ein Mikroskop verwendet, indem fünf repräsentative Felder der Transmigrationsmembran ausgezählt wurden. Dafür wurden die Membranen aus den Einsätzen herausgeschnitten, mit 40 µl Kaiser's Glycerol-Gelatine auf einem Objektträger fixiert und mit einem Deckgläschen eingedeckt.

4.10 Angiogenese-Assay

Bei diesem Experiment wurde getestet, ob CL-6 und HuCCT-1 in der Lage sind, sogenannte Gefäßvorläuferstrukturen in einem Angiogeneseassay auszubilden. Dazu wurden 1×10^4 HUVECS-Zellen auf einer µ-Slide-Angiogenese-Platte pipettiert und nach 24 h Inkubation mit Sorafenib (5 µM/ml, 10 µM/ml), Gemcitabin (10 ng/ml, 100 ng/ml) sowie einem FBS-freien RPMI-Kontrollmedium analysiert. Die Auswertung wurde mit Hilfe eines Auflichtmikroskops durchgeführt.

4.11 Transfektion von hMSC

Die Bereitstellung und Gewinnung der verwendeten mesenchymalen Stammzellen erfolgte in Zusammenarbeit mit der Firma Apceth Biopharma GmbH (Munich, Großhadern). Die Entnahme beinhaltete eine Knochenmarkentnahme im Bereich des Beckenkamms bei Patienten, die einer wissenschaftlichen Nutzung zugestimmt hatten. Das gewonnene Knochenmark wurde im Anschluss in Zellkultur gebracht und die mesenchymalen Stammzellen wurden zunächst durch ihre Plastikadhärenz selektiert (Niess et al. 2015). Daran schloss sich die genetische Modifikation mit Hilfe einer retroviralen Transfektion an (s. Abbildung 7: Vektor in msc_Apceth_101 (nach Niess et al. 2015) vereinfacht nach Niess et al. 2015). Hierbei wurde unter anderem ein Genabschnitt eingebracht, der eine Herpes-Simplex-Thymidinkinase kodiert. Diese Thymidinkinase sollte dann im Tumor durch die hMSC sekretiert werden und Ganciclovir phosphorylieren, um über einen Bystander-Effekt die Tumorzellen zu bekämpfen.



Abbildung 7: Vektor in msc_Apceth_101 (nach Niess et al. 2015)

Die selektive Aktivierung und Expression der HSV-TK konnte durch die Kontrolle des RANTES/CCL5-Promoters erreicht werden (vgl. Abbildung 2: Prinzip der genetisch veränderten hMSC zur Tumortherapie). Diese selektive Aktivierung konnte erstmalig in Brustkrebszellen nachgewiesen werden (Karnoub et al. 2007), wobei Effekte auf das Invasions- und

Metastasenverhalten belegt werden konnten. Weitere Studien konnten einen ähnlichen Nachweis in Pankreaskarzinomen (Zischek et al. 2009) wie auch im hepatozellulären Karzinom (Niess et al. 2011) erbringen.

4.12 PCR zum Nachweis des Woodchuck-hepatitis-post-transcriptional-regulatory-element (WPRE)

Der Nachweis der hMSCs in den untersuchten Geweben erfolgte mit der Hilfe der PCR-Methode und eines in die hMSCs eingebrachten Reportergens und wurde in Kooperation mit der Firma Apceth durchgeführt. Bei diesem transduzierten Reportergen handelt es sich um das WPRE, ein cis-wirkendes Element, das eine entscheidende Rolle in der Regulation von Transgenen spielen kann (Klein et al. 2006; Powell et al. 2015).

Tabelle 2: Primer und Sonde zum WPRE-Nachweis

	Name	Sequenz
Forward Primer	WPRE for (Roche)	5'-TCATGCTATTGCTTCCCGTA-3'
Reverse Primer	WPRE rev (Roche)	5'-AAAGAGACAGCAACCAGGATTT-3'
Sonde	Universal Probe	5'-AGGAGGAG-3'

4.13 Herstellung der histologischen Schnitte

Die Paraffinschnitte wurden nach einer 20-minütigen Lagerung in einem -20 °C-Kühlschrank auf Eis zum Schneiden vorbereitet. Nach dem Entfernen der oberen Paraffinschicht und der ersten Anschnitte des Gewebes wurde die Schnittdicke von 20 µm auf 5 µm reduziert, bevor anschließend die endgültigen Schnitte angefertigt wurden, die nach dem Schneiden vorsichtig in ein vorgewärmtes Wasserbad gegeben wurden. Von diesem Wasserbad aus wurden sie auf einen Objektträger überführt, der dann zum Trocknen auf eine vorgeheizte Wärmeplatte gelegt wurde. Nach dem vollständigen Abtrocknen der Objektträger konnten die so angefertigten Schnitte bei Raumtemperatur gelagert werden.

4.14 Färbungen

4.14.1 DAPI-Färbung

Bei der Färbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) handelt es sich um eine Färbung, die eingesetzt wird, um die DNA in lebenden oder toten Zellen darzustellen.

Hier wurde eine Verdünnung von 1:100 (DAPI: DPBS) verwendet, die in 2-ml-Eppendorfröhrchen angesetzt wurde. Die einzelnen Schnitte wurden dann mit circa 100 µl der Lösung bedeckt und für 15–20 Min. in einer lichtundurchlässigen Färbewanne inkubiert. Anschließend erfolgte die

dreimalige Waschung mit DPBS. Um die Kryoschnitte auf den Objektträgern zu fixieren, wurden diese mit einem Tropfen Mounting-Medium beschickt und unter leichtem Druck wurde ein Deckgläschen darauf gelegt

4.14.2 Kryoschnitte

Zunächst wurden die Schnitte für 20 Min. bei Raumtemperatur erwärmt. Anschließend erfolgte die Fixierung mit 4 % Formalin, wobei die Schnitte erst mit DPBS gewaschen und dann 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Darauf folgte die dreimalige Waschung mit DPBS.

Im nächsten Schritt wurden 50 µl 8-%-Serum und 1 % Triton in DPBS auf die Schnitte gegeben, um sie bei Raumtemperatur für 30 Min. einwirken zu lassen, wobei bei KI-67, CD31 und VEGF kein Triton zum Einsatz kam. Um die genaue Stelle der Schnitte auf dem Objektträger zu lokalisieren und ein ‚Weglaufen‘ der Flüssigkeit zu verhindern, wurde ein Ölstift verwendet.

Der erste Antikörper wurde in seiner jeweilig anzuwendenden Verdünnung in 4 % Serum, bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag schloss sich eine dreimalige Waschung mit DPBS bei Raumtemperatur an. Der zweite Antikörper wurde anschließend 60 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Färbung mit DAPI für 15 Min.

4.14.3 Paraffinschnitte CD31, CK-7, KI-67, Hep-Par-1

Da die histologischen Schnitte in Paraffin eingebettet waren, wurde ein Deparaffinierungsschritt der eigentlichen Färbung vorangestellt, dem sich eine Rehydrierung der Schnitte anschloss. Für die Deparaffinisierung wurden die Paraffinschnitte für 10 Min. bei 60 °C in einem Wärmeschrank erwärmt, um dann für 2 x 8 Min. in Xylol eingetaucht zu werden. Es folgten 2 x 5 Min. in 100 % Alkohol, 1 x 3 Min. in 90 % Alkohol und zum Abschluss weitere 3 Min. in 70 % Alkohol. Anschließend wurden die Schnitte für 5 Min. in Milliporewasser gewaschen. Nach diesen Arbeitsschritten folgten die eigentlichen Färbungen. Nach der Deparaffinierung und Rehydrierung wurde die Demaskierung vorgenommen. Dazu wurden die Schnitte für 30 Min. in Dako, Target Retrieval Solution gekocht. Nach angeschlossener fünfminütiger Abkühlung wurden die Schnitte für 2 x 3 Min. in TRIS-CL gewaschen. Es folgte der endogene Peroxidaseblock, für den die Schnitte für 10 Min. in 7,5-prozentige H₂O₂-Lösung getaucht wurden. Anschließend wurden sie für weitere 10 Min. unter Leitungswasser sowie 2 x 5 Min. in DPBS gewaschen. Darauf folgend wurde für 20 Min. der Serumblock mit 8 % Goatserum und 3 % BSA in DPBS durchgeführt. Bevor der 1. AK auf die Schnitte gebracht wurde, wurde der Blocking-Puffer entfernt. Der 1. AK wurde in einem Verhältnis von 1:100 mit DPBS und 3 % BSA verdünnt auf die Schnitte gegeben (ca. 50 µl pro Gewebeschnitt) und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Paraffinschnitte für 2 x 5 Min. in DPBS gewaschen. Es folgte der Avidin/Biotin-Block. Hierbei wurde zunächst ein Tropfen der Avidinlösung auf die Schnitte gebracht und für 15 Min. inkubiert, bevor anschließend ein

Tropfen Biotin für 15 Min. aufgebracht wurde. Es folgte dreimaliges Waschen mit DPBS für jeweils 1 Min. Der sekundäre AK wurde, wie der erste AK, mit DBPS und 3 % BSA verdünnt und für 30 Min. inkubiert. Im Anschluss wurde dann für 2 x 5 Min. mit DPBS abgewaschen. Darauffolgend wurde der ABC-Komplex in DPBS aufgebracht und wiederum nach 30 Min. durch eine Waschung mit DPBS entfernt. Die Schnitte wurden dann mit DAB⁺-Chromogen für 15 Min. gefärbt und danach ca. 5 Min. unter fließendem Leitungswasser gespült sowie 2 x 3 Min. in DPBS gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte, indem die Schnitte für 30 Sekunden in Hämatoxylin-Lösung eingetaucht wurden. Als Kontrolle, damit keine falschpositiven Ergebnisse entstanden, wurde der 1. AK weggelassen und die Schnitte wurden auf eine eventuelle unspezifische Bindung des 2. AK untersucht.

5 Materialien

5.1 Technische Geräte

Applied Biosystems 7000 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, USA
Automatic Tissue Processors Model 2065/2	MDS Group GmbH, Buseck, Germany
AxioCam MRc5 camera	Carl Zeiss GmbH, Germany
CO ₂ -Inkubator HERAcell 150i 12326	ThermoFischer Scientific, Germany
CO ₂ -Inkubator BBD 6220	ThermoFischer Scientific, Germany
Handstückzähler	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Herasafe KS EN12469 2000 Class II Safety Cabinet	Thermo Fisher Scientific Inc, Germany
Infrarotlampe	Philips Consumer Lifestyle, Drachten, Netherlands
Kühlschrank 4°C	Liebherr
Labor-Trockenschrank	Kendro Laboratory Products, Osterode, Germany
Leica DFC 450 C-Kamera	Leica Microsystems CMS GmbH, Germany
Leica RM2255, Fully Motorized Rotary Microtome	Leica Microsystems, Nussloch, Germany
Mikroskop 1	Carl Zeiss GmbH, Germany
Mikroskop 2 Leica DM IL LED	Leica Microsystems CMS GmbH, Germany
Mikroskop 3 für Zellkultur, Olympus CK2	Olympus, Japan
Mikrowelle	Alaska
Multimode microplate reader, Infiniti M200 Pro 200	Tecan Austria GmbH, Austria
Pipettierhilfe, pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Germany
Präzisionswaage,	Sartorius AG Göttingen, Germany
Sonographiegerät LOGIQ E9	General Electric Company, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Tiefkühlschrank -150°C	Panasonic Healthcare CO. Ltd., Japan
Tiefkühlschrank -20°C	Liebherr
Tiefkühlschrank -80°C	Heraeus, Hanau, Germany
Vortexmischer, VORTEX1	IKA Works, Wilmington, NC, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Germany
Zentrifuge 1 Multifuge 3S-R	Kendro Laboratory Products, Germany

Zentrifuge 2 Heraeus Fresco 17
Zentrifuge 3 Biofuge 13 Heraeus Sepatech

ThermoFischer Scientific, Germany
Heraeus Instruments GmbH, Germany

5.2 Material für die Zellkultur

24-Well Kulturplatten
6-Well Kulturplatten
96-Well Kulturplatten
Cellstar Tubes 15 mL
Cellstar Tubes 50 mL
Cryotube (2.0 mL), DNase-, RNase-, DNA-, Pyrogen-frei
Eppendorf safe-lock tubes (0,5ml, 1,5 mL, 2,0 mL)
Filter Unit, Millex-OR 0,22µm
Hemocytometer and cover-slip (Cell counting chambers)
Sterile Pipetten 5ml, 10ml, 25ml
Sterile Zellkulturflaschen 175 cm²
Sterile Zellkulturflaschen 25 cm²
Sterile Zellkulturflaschen 75 cm²
Zellschaber M, Länge 300mm

Greiner Bio-One GmbH, Germany
Nunc, Roskilde, Danmark
Sarstedt AG& Co. Nürnberg, Germany
Greiner Bio-One GmbH, Germany
Greiner Bio-One GmbH, Germany
Carl Roth GmbH+Co. KG, Germany
Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Tullagreen, Ireland
Bürker-Türk, Germany
Greiner Bio-One GmbH, Germany
Greiner Bio-One GmbH, Germany
TPP, Switzerland
Greiner Bio-One GmbH, Germany
TPP, Switzerland

5.3 Medien, Puffer für die Zellkultur

0.05% Trypsin-EDTA (1x)
Ca²⁺ and Mg²⁺ 100 mL
DMSO (Dimethylsulphoxide)
DPBS-buffer
Fetal-Bovine-Serum 500 mL
Penicillin/Streptomycin 100 mL
RPMI 1640 + GlutaMAX-1 500 mL
Trypan Blue (0.4%)

Gibco Invitrogen, UK
PAN Biotech GmbH, Germany
Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
Life Technologies Corporation, UK
Biochrom AG, Berlin, Germany
Gibco Invitrogen, UK
Gibco Invitrogen, UK
Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany

5.4 Medium für die Kryokonservierung

RPMI oder DMEM mit 20% FBS und 5% DMSO

5.5 Materialien für Transmigration

Companion-Platte, 24-Well
Cell Culture Insert 24 Well 8.0µm pore size

Corning Incorporated-Life Sciences,
USA
Corning Incorporated- Life Sciences,

USA

5.6 Materialien für CCK-8-Assay

Cell Counting Kit-8

Dojindo Laboratoris, Japan

5.7 Materialien für Angiogenese-Assays

µ-Slide Angiogenesis

ibidi GmbH, Germany

5.8 Materialien für die Isolierung der hMSCs

Medium für die hMSC-Kultur:

DMEM mit GLUTAmax 500ml

ThermoFischer Scientific, Germany

5 % Thrombolyat 25ml

Blutbank Schwabing

1% Pen-Strep 5ml

ThermoFischer Scientific, Germany

1000 IE Na-heparin

ratiopharm, Ulm, Germany

Tabelle 3: Medien für hMSC Differenzierung

Medium zur osteogenen Differenzierung 10ml (12Tage)	
10nM Dexamethason	2µl
10mM β-GP	100µl
50µg/ml Ascorbinsäure	100µl
Medium zur adipogenen Differenzierung 10ml (14-20Tage)	
10µM Dexamethason	100µl
0,5 mM IBMX	5µl
50µM Indometacin	5µl
1µg/ml Insulin	0,5 µl
Medium zur chondrogene Differenzierung 10ml (21 Tage)	
50µg/ml Ascorbinsäure	100µl
1µg/ml Insulin	1µl
10ng/ml TGFβ1	

1% Alizarinrot

Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany

0,5% Alcianblau

Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany

0,5% Oil-Red

Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany

Lysepuffer:

8,29g Ammoniumchlorid NH₄Cl

1g K-hydrogenkarbonat KHCO₃

1l H₂O, steril

0,037g Triplex III Na₂-EDTA

5.9 Materialien für immunhistochemische Färbungen

Albumin from bovine serum (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
Avidin/Biotin blocking kit	Vector Laboratories, CA, USA
Biotinyl Anti-mouse IgG (H+L)	Vector Laboratories, CA, USA
Biotinyl Anti-rabbit IgG (H+L)	Vector Laboratories, CA, USA
CD31 AK, Rat mAb	Abcam plc, England
ChemMate Hematoxylin	Dako North America, Inc., CA, USA
CK-7 AK	Abcam plc, England
Ethanol 70%, 80%, 100%	Carl Roth GmbH+Co. KG, Germany
Ethanol 96% mit MEK vegällt	Otto Fischer GmbH & Co. KG, Germany
HepPar-1 AK	Abcam plc, England
Kaisers Glycerin-Gelatine phenolfrei	Carl Roth GmbH+Co. KG, Germany
KI-67 AK, Rb mAb [SP6]	Abcam plc, England
Liquid DAB+ Substrate Chromogen System	Dako North America, Inc., CA, USA
Monoclonal rabbit anti-Ki67 antibody	Abcam, UK
Mounting Medium	Dako North America, Inc., CA, USA
Natriumchlorid, 95,5%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Neo-Clear® (Xylene substitute)	Merck, Darmstadt, Germany
Normal goat serum	Vector Laboratories, CA, USA
Normal rabbit serum	Vector Laboratories, CA, USA
Polyclonal rabbit anti-CD31 antibody	Abcam, UK
Roti-Histofix 4%	Carl Roth GmbH+Co. KG, Germany
Target retrieval solution 10×	Dako North America, Inc., CA, USA
TRIS-hydrochloride	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Triton® X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
TRIZMA Base	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
Wasserstoffperoxid 30%, stabilisiert	Carl Roth GmbH+Co. KG, Germany

5.10 Material für qRT-PCR, in Kooperation mit Apceth

(VIC/TAMRA Probe, Primer Limited)	Applied Biosystems, USA
CCL5, Hs00174575_m1	
CCR5, Hs99999149_s1	

Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control
High-capacity cDNA reverse transcription kit
Mortar and Pestle
Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG with ROX
RNase-free filter tips
RNeasy Mini Kit (250)
TaqMan Gene Expression Assays:
 β -Mercaptoethanol

Applied Biosystems, USA
Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
Invitrogen, USA
Starlab GmbH, Ahrensburg, Germany
QIAGEN, Hilden, Germany
Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany

5.11 Material für die Tierexperiment

5.11.1 Tiere

NOD/SCID NOD.CB17/Alhnrj-Prkdc^{scid}/Rj

JANVIER LABS, France

5.11.2 Op-Instrumente und Zubehör

Chirurgisches Nahtmaterial, VICRYL 4-0
Einmal-Injektions-Kanüle 23G, BD Microlance
Einmal-Injektions-Kanüle 30G, Sterican
Nadelhalter
Pinzette
Schere
Skalpell, Feather Disposable Scalpel NO. 10
Spritze 1ml, Omnifix-F 1ml
Stieltupfer

Johnson & Johnson, Belgium
Becton Dickinson S.A., Carretera, Spain
B. Braun Melsungen AG, Germany
Dosch GmbH, Heidelberg, Germany
Dosch GmbH, Heidelberg, Germany
Dosch GmbH, Heidelberg, Germany
Feather Safety Razor Co., Japan
B. Braun Melsungen AG, Germany
Lohmann & Rausch International GmbH
& Co. KG, Germany

5.11.3 Medikamente

Cisplatin, Teva
Ganciclovir (Cymeven®) 500mg
Gemcitabine Hydrochlorid, Hospira
Growth Factor Reduced (GFR) BD Matrigel
Isofluran, Forene 100% (V/V)
Ketaminhydrochlorid (Ketavet®) 100mg/mL
Sorafenib (Nexavar®)

Teva GmbH, Ulm, Germany
Roche, Grenzach-Wyhlen, Germany
Hospira Deutschland GmbH
Abbott GmbH & Co. KG, Germany
Pfizer Pharmacia GmbH, Berlin
Germany
Bayer Healthcare, Leverkusen, Germany

Xylazinhydrochlorid, Xylazin (Rompun®) 2% 25mL

Bayer Healthcare, Leverkusen, Germany

5.12 Weitere Materialien

Aceton

VWR Chemicals, Frankreich

Cell Tracker, green CMFDA

life technologies, Eugen, USA

Cell Tracker, red CMTPIX

life technologies, Eugen, USA epT.I.P.S.

standard/Bulk 0,5-10µl

Eppendorf AG, Hamburg, Germany

epT.I.P.S. standard/Bulk 2-200µl

Eppendorf AG, Hamburg, Germany

epT.I.P.S. standard/Bulk 50-1000µl

Eppendorf AG, Hamburg, Germany

Essigsäure

AppliChem GmbH- An ITW Company,
Germany

NaCl-Lösung

B. Braun Melsungen AG, Germany

Pasteurpipetten aus Glas

BRAND GmbH + CO., Wertheim,
Germany

Rotilabo-embedding cassettes

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany

Salzsäure rauchend 37%, Rotipuran

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany

Spritzen 5ml, 10ml, BD Discardt II

Becton Dickinson S.A., Carretera, Spain

Wattestäbchen

NOBA, Wetter, Germany

5.13 Software

Adobe Acrobat Reader DC

Adobe Systems Inc., USA

Axio Vision 4.9 SE64 Rel.

Carl Zeiss GmbH, Germany

Citavi 5

Swiss Academic Software

i-control™ – Microplate Reader Software

Tecan Trading AG, Switzerland

Leica LAS V4.6

Leica Microsystems CMS GmbH,
Germany

Microsoft Word 2010 (Word, Excel, PowerPoint)

Microsoft Corporation, USA

SPSS Statistics 22

SPSS STATISTICS Inc., USA

GraphPad Prism 6.01

GraphPad Software, Inc.

5.14 Die Zelllinien

5.14.1 Cholangiokarzinomzelllinien

Zur orthotopen Induktion eines humanen Cholangiokarzinoms in der Maus wurden die Zelllinien CL-6 (auch HubCCA) und HuCCT-1 (gelegentlich auch HuCC-T1) ausgewählt und verwendet.

Bei CL-6 handelt es sich um eine Cholangiokarzinomzelllinie, welche bei einer ERCP gewonnen und von Professor Dr. Adisak Wongkajornsilp etabliert wurde. Bei dem untersuchten Patienten wurde ein intrahepatisches Cholangiokarzinom diagnostiziert. Die Zellen wurden aus dem durch die ERCP gewonnenen Material nach Zentrifugation und dem so entstandenen Pellet isoliert (Wongkajornsilp et al. 2009, S. 141; Chaijaroenkul et al. 2011, S. 56).

HuCCT-1 ist eine Cholangiokarzinomzelllinie, welche in Japan etabliert wurde. Die Isolation der Zellen erfolgte dabei aus Aszites eines 56-jährigen Patienten, welcher sich mit einem moderat differenzierten Adenokarzinom präsentierte (Miyagiwa M 1989).

5.14.2 hMSC

Die nicht transfizierten hMSCs wurden durch Prof. Dr. rer. nat. P. Nelson, Klinikum der Universität München, Medizinische Klinik und Poliklinik IV Nephrologisches Zentrum, bereitgestellt. Die Isolation erfolgte aus humanem Knochenmark. Eine Transfektion wurde nicht durchgeführt und der ursprüngliche Zellstock wurde ebenfalls durch Apceth Biopharma GmbH bereitgestellt.

5.14.3 Transfizierte hMSC

Die transfizierten humanen mesenchymalen Stammzellen für diese Arbeit wurden aus humanem Knochenmark gewonnen und uns freundlicherweise durch die Firma Apceth Biopharma GmbH, Germany zur Verfügung gestellt.

6 Ergebnisse

Für die Etablierung eines intrahepatischen Cholangiokarzinoms wurde nach entsprechender Recherche die NOD/SCID-Maus als geeignetes Untersuchungsmodell ausgewählt. Durch die bereits beschriebene Eigenschaft dieser Mauslinie, aufgrund einer Beeinträchtigung der Lymphopoese keine reifen B- und T-Zellen auszubilden, stellt diese eine solide Grundlage dar, um Tumoren in einem Tiermodell zu induzieren und entsprechend zu untersuchen. Zudem ist diese Mauslinie auf Grund eines NOD (engl. Non-Obese Diabetic) durch eine Beeinträchtigung der NK-Zellen und antigenrepräsentierenden Zellen gekennzeichnet. Dies verhindert eine Abstoßung von für die Maus körperfremden Zellen und bildet in unserem Modell die Grundlage für die Induktion eines humanen Cholangiokarzinoms. Für die Tumorinduktion wurde die CL-6-Zelllinie ausgewählt, die durch ihre schnelle Zellteilung eine hohe Effizienz hinsichtlich der Tumorinduktionsrate versprach.

6.1 Ergebnisse aus dem orthotopen NOD/SCID -Modell

Mit der Tumorzelllinie CL-6, die durch eine ERCP-Untersuchung gewonnen und für die In-vivo-Versuche ausgewählt wurde, konnte bei Injektion von $1 \cdot 10^6$ Zellen eine hundertprozentige Tumorinduktionsrate erreicht werden. Für diese Arbeit wurden zwei Experimentierreihen mit der NOD/SCID-Maus durchgeführt (Zyklus 1 und Zyklus 2).

6.1.1 Zyklus 1 (CL-6 induzierter Tumor)

Das Ziel dieses Versuchs bestand darin, den optimalen Zeitpunkt der Tumorentnahme herauszufinden, bei der die höchste Zellzahl von hMSC im Tumorstroma lokalisiert war. Der Nachweis erfolgte durch PCR und wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Apceh realisiert. Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Initiierung sechs Wochen alt und wiesen ein mittleres Körpergewicht von $23,68g \pm 0,5g$ auf.

Tabelle 4: hMSC Applikation und Opferung Zyklus 1

Gruppe	Agens	Dosis/ Maus	App.- Vol.; μL	Weg	Tiere (n)	Behandlungs- tag	Tag der Opferung
1	Kontrolle	n.a.	300	i.v.	4	7	15
2	hMSC	1×10^6	300	i.v.	4	7	9
3	hMSC	1×10^6	300	i.v.	4	7	11
4	hMSC	1×10^6	300	i.v.	4	7	13
5	hMSC	1×10^6	300	i.v.	4	7	15

Die orthotope Instillation der Tumorzellen erfolgte am ersten Tag des Experiments. Im weiteren Zeitverlauf nach sieben Tagen erhielten die Mäuse eine intravenöse Gabe von hMSC von 1×10^6 Zellen, während der Kontrollgruppe zellfreies Medium appliziert wurde. Nachfolgend wurden die Mäuse in einem Zeitzyklus von zwei Tagen zugeordnet nach Gruppen geopfert (vgl. Abbildung 8)

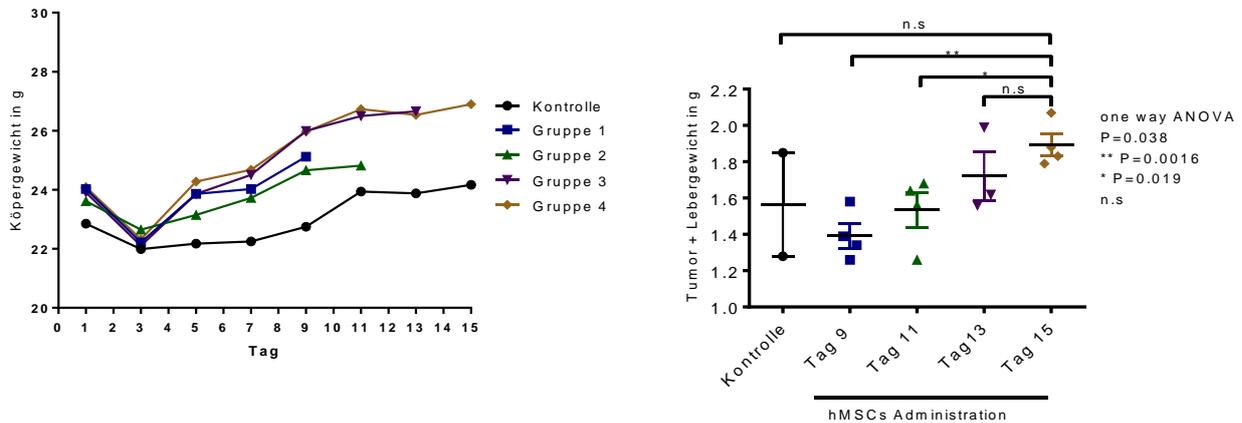


Abbildung 8: Entwicklung des Körpergewichts sowie des Tumor- und Lebergewichts der Mäuse im Versuchszeitraum

Die Abbildung 8 zeigt die Entwicklung des Körpergewichts der NOD/SCID-Maus, aufgetragen nach den einzelnen Versuchsgruppen, sowie die Entwicklung des Leber- und Tumorgewichts. Es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe 1 und 4 sowie Gruppe 2 und 4 festgestellt werden.

Durch den Verlust zweier Versuchstiere in der Kontrollgruppe ergab sich der kritische Ausgangspunkt, der eine statistisch valide Bewertung sowie Schlussfolgerung der Verläufe des Körper- und Lebergewicht erschwerte. Zusammenfassend konnte über die Zeit eine Zunahme des Leber-Tumorgewichts festgestellt werden.

6.1.1.1 PCR von Lungen- und Tumorgewebe

Zum Nachweis von hMSC in Lunge und Leber wurde eine PCR durchgeführt, um die entsprechende Menge an vorhandenen hMSC zu quantifizieren. Dabei wurde das WPRE nachgewiesen, das mit Hilfe der Transfektion in das Erbgut der hMSC eingebracht wurde.

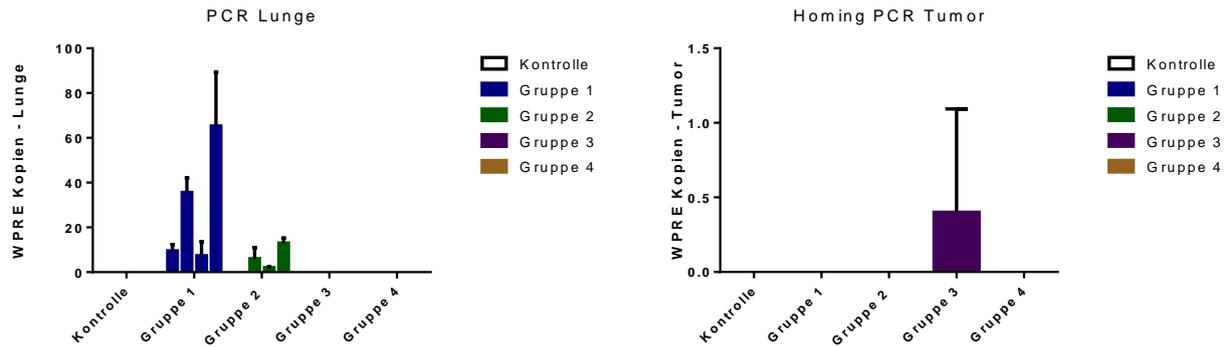


Abbildung 9: PCR-Analyse des Lungen- und Tumorgewebes

Bei der PCR-Analyse konnte in sieben Versuchstieren aus den Gruppen 1 und 2 eine Translokation der applizierten hMSC in der Lunge nachgewiesen werden. Die größte Menge an hMSC wurde in der ersten Gruppe detektiert. Außerdem gelang es, hMSC im Tumorgewebe eines Versuchstieres aus der Gruppe 3 nachzuweisen. Zum Teil gelang der ein- bis zweimalige Nachweis von hMSC im Tumorgewebe anderer Versuchstiere, die eingeforderten drei Nachweise waren allerdings nicht möglich.

6.1.1.2 Charakterisierung des gewonnenen Tumorgewebes

Nach Abschluss des Zyklus wurden die einzelnen Gewebe einer histologischen Aufarbeitung unterzogen. Dabei offenbarten sich bereits makroskopisch in den Untersuchungen zumeist extrahepatisch wachsende Tumoren. Dies konnte mit einer HE-Färbung bestätigt werden, wobei sich mäßig bis schlecht differenzierte Tumoren nachweisen ließen (vgl. Abbildung 10).

Um eine Unterscheidung zwischen einem Cholangiokarzinom und einem hepatozellulären Karzinom vornehmen zu können, bedarf es zunächst zweier unterschiedlicher Färbungen: auf der einen Seite einer negativen HepPar1-Färbung, die das Vorliegen von von hepatischen Vorläuferzellen abstammenden Zellen ausschließt, und auf der anderen Seite einer CK-7-positiven Färbung. Bei Zytokeratin 7 (CK-7) handelt es sich um ein basisches Intermediärfilament, das in der Tumordiagnostik zur histopathologischen Identifizierung von Cholangiokarzinomen herangezogen wird. Bei HepPar-1 ist die genaue Bindungsstruktur nicht vollständig identifiziert; es wird von einer Mitochondrien-assoziierten Struktur ausgegangen.

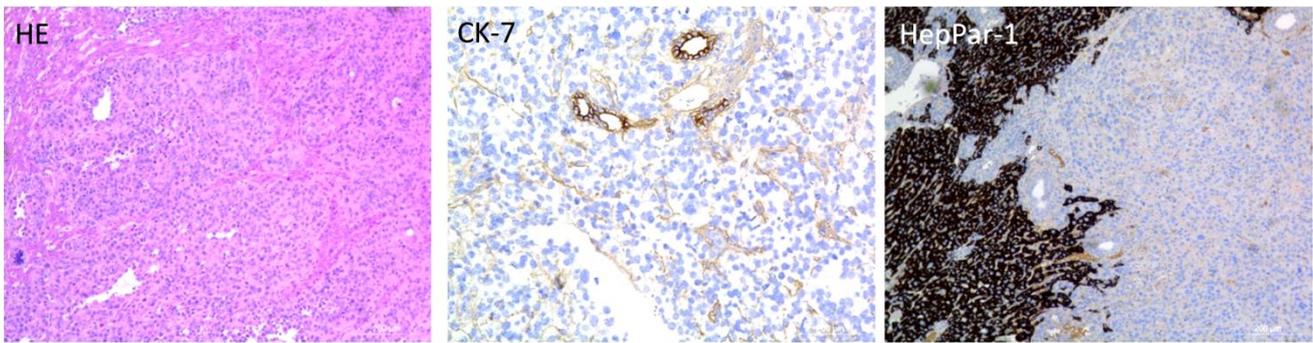


Abbildung 10: Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung, Zytokeratin-7-(CK-7) -Färbung, Hepatozytenspezifisches-Antigen-1 (HepPar-1)-Färbung

Wie in Abbildung 10 dargestellt, präsentiert sich das Tumorgewebe als diffuse, das Lebergewebe infiltrierende, schlecht differenzierte Raumforderung. Mit Hilfe der durchgeführten Färbungen mit HepPar-1 und CK-7 konnte gezeigt werden, dass es sich um ein Cholangiokarzinom handelt, da das Tumorgewebe in der Immunfärbung negativ für den Marker HepPar-1 beziehungsweise positiv für CK-7 reagierte.

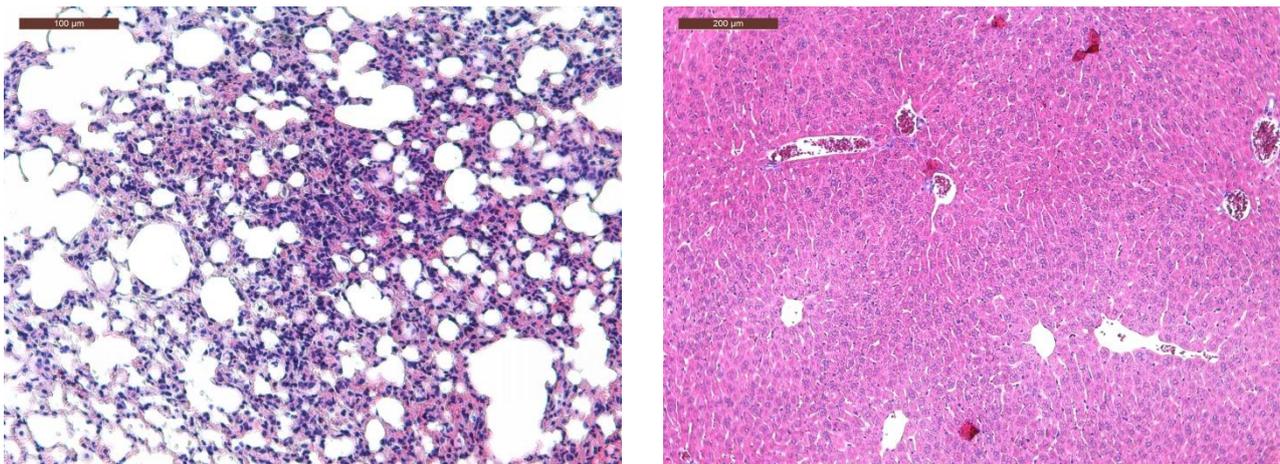


Abbildung 11: Links HE-Färbung Lungengewebe mit einer Metastase, rechts Lebergewebe (jeweils 100 x Vergrößerung)

In der HE-Färbung des Lungengewebes zeigte sich in jedem untersuchten Tier eine Lungenmetastasierung, was beispielhaft aus Abbildung 11 hervorgeht. Diese hier zentral im Bild befindliche Mikrometastasierung ließ sich auch im anschließenden 2. Zyklus erkennen. In der Leber waren hingegen, bis auf den soliden induzierten Tumor, keine lokalen Metastasen zu detektieren. Wie in Abbildung 11: beispielhaft dargestellt, wurden im Parenchymgewebe der Leber, neben den Hepatozyten und angeschnittenen Zentralvenen, keine weiteren lokalen Metastasen nachgewiesen. Zur weiteren Evaluation des Tumorgewebes wurde eine CD31-Färbung durchgeführt, mit der die für das Tumorphoming essenziellen Blutgefäße in der Leber dargestellt werden konnten. Zudem erfolgte die Detektion der Zellen, die sich in einer Mitose befanden, mit Hilfe der KI-67-Färbung, um die

Proliferation des Gewebes kenntlich zu machen.

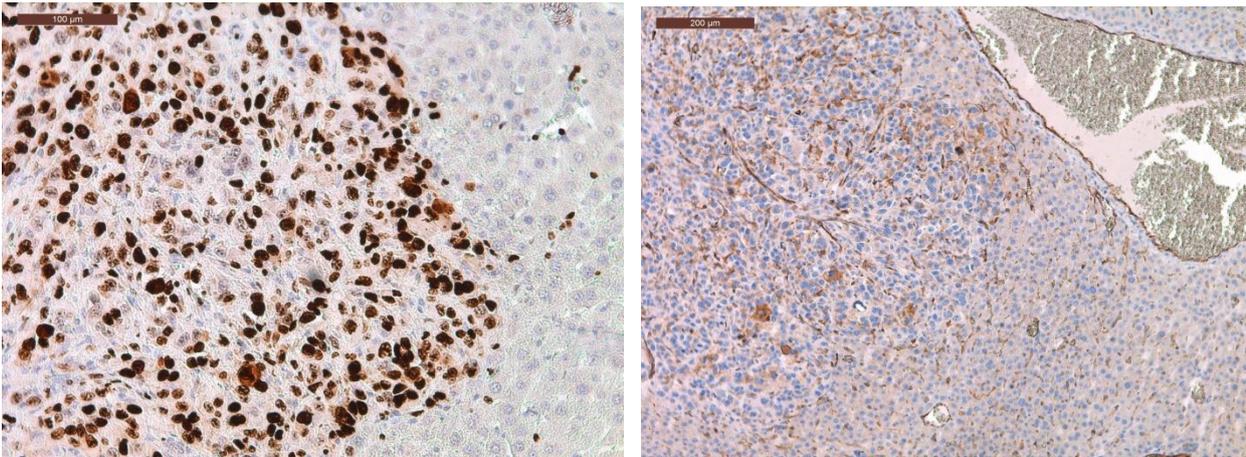


Abbildung 12 links: KI-67-Färbung

Abbildung 13 rechts: CD31-Färbung

Abbildung 12 ist eine KI-67-Färbung des Leber- und Tumorgewebes ersichtlich. Hierbei ist auf der linken Seite des Bildes ein solider Tumoranteil angeschnitten, der sich mit einer hohen Wachstumsfraktion präsentiert und hier relativ scharf zum übrigen Lebergewebe abgegrenzt ist.

Bei der Analyse der CD31-Färbung (Abbildung 13) konnten zahlreiche Gefäße im Tumorstroma nachgewiesen werden, die hier in der rechten oberen Bildhälfte angeschnitten sind.

6.1.2 Zyklus 2 (CL-6 induzierter Tumor)

In diesem Versuch galt es, bei festgesetztem Tag der Opfierung und Reduzierung der Gruppenanzahl (Kontroll- und Behandlungsgruppe) die Rekrutierung von hMSC zum Tumorstroma nachzuweisen beziehungsweise zu evaluieren. Im Vergleich zum Zyklus 1 erfolgten zusätzlich zwei weitere hMSC-Applikationen von jeweils 1×10^6 Zellen, am 7., 12. und 17. postoperativen Tag (in Abbildung 14 mit * gekennzeichnet). Es konnte mit der CL-6-Reihe wiederholt eine 100-prozentige Tumorinduktionsrate sichergestellt werden.

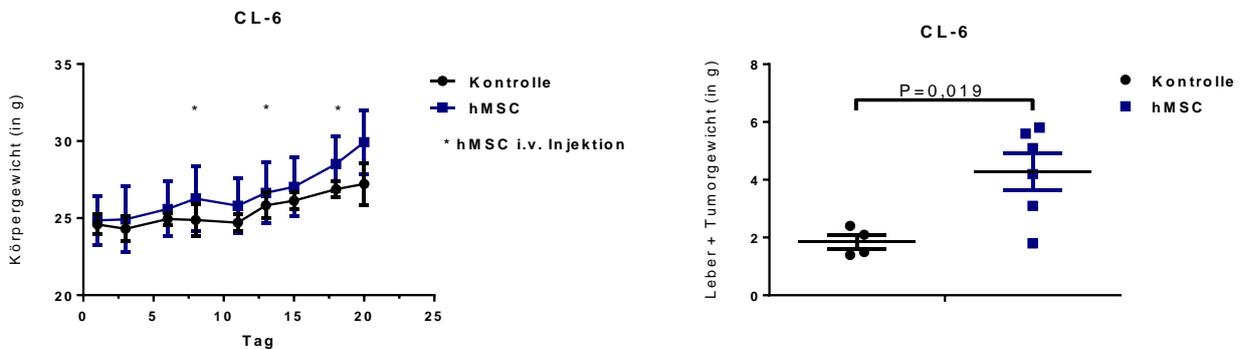


Abbildung 14: Entwicklung des Körpergewichts sowie Tumor- und Lebergewicht

Wie aus Abbildung 14 hervorgeht, waren bei der Entwicklung des Gewichts der Versuchstiere signifikante Unterschiede zwischen den mit hMSC behandelten Mäusen und denen, die nur ein Kontrollmedium erhalten hatten, festzustellen. Das Tumor- und Lebergewicht der Behandlungs- und der Kontrollgruppe wies eine signifikante Gewichtsdivergenz auf ($P = 0,019$), wobei die Kontrollgruppe im Mittel ein Tumor- und Lebergewicht von $1,85 \text{ g} \pm 0,42 \text{ g}$ besaß, während die mit hMSC behandelten Mäuse ein Tumor- und Lebergewicht von $4,27 \text{ g} \pm 1,43 \text{ g}$ hatten.

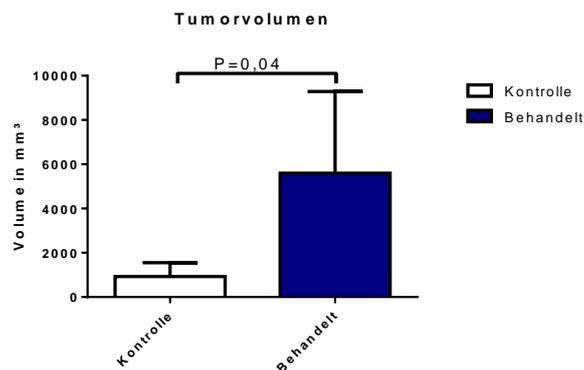


Abbildung 15: Tumor- und Lebervolumen der Versuchstiere, Kontrolle: Keine hMSC-Therapie, Behandelt: Mit hMSC-Therapie

Das Tumor- und Lebervolumen der analysierten Mäuse unterschied sich, wie bereits das Gewicht, signifikant zwischen der Gruppe, die mit hMSC behandelt wurde, und der Gruppe, die eine Kontrollsubstanz erhalten hatte ($P = 0,04$).

6.1.2.1 Gewicht und Sonografie

Um den Größenzuwachs der induzierten Tumoren beurteilen zu können, wurde zwei Tage vor der Opiferung eine Sonografie durchgeführt. Bei der Untersuchung war es möglich, in 8/10 Mäusen einen Tumor nachzuweisen. Wie sich nach der Ex-vivo-Analyse der Tumorgöße sowie des Gewichtes herausstellte, ist der ultraschallgestützte Nachweis eines Tumors zwar möglich, die ermittelte Größe sowie das berechnete Volumen entsprechen aber in keiner Annäherung den gefundenen Ausmaßen. Anzumerken ist zudem, dass es sich bei den beiden Tumoren, die in der Sonografie nicht nachzuweisen waren, um die beiden Tumoren aus der Kohorte handelte, die die geringsten Ausmaße hatten und keine hMSC-Applikation erhielt. Dies geht aus Abbildung 16 hervor. Die Tumoren sind sowohl nach der Behandlungs- und Kontrollgruppe als auch nach der ex vivo gefundenen Tumorgöße geordnet.

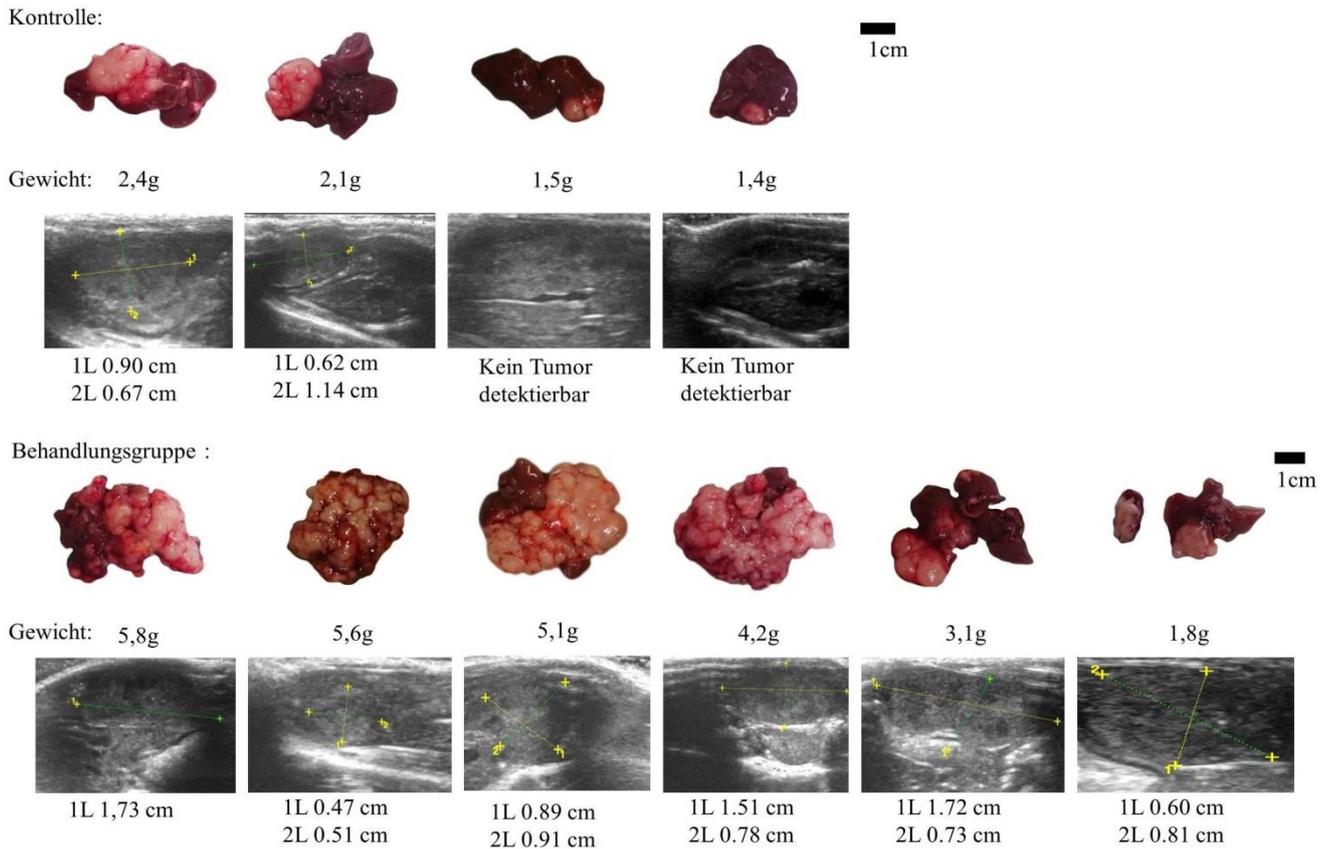


Abbildung 16: Übersicht der makroskopischen Tumor-Leberpräparate und Sonografiebilder

Abbildung 16 zeigt zunächst die entnommenen Leberpräparate mit der entsprechenden Tumorlast, aufgeteilt in Kontroll- und Behandlungsgruppe. Des Weiteren sind die Bilder der zuvor durchgeführten Sonografie aufgeführt.

6.1.2.2 Detektion von Aszites

Bei der Sonographie der Versuchstiere fiel die Gruppe auf, die die hMSC-Therapie erhalten hatte. Die Mäuse hatten mit einer Ausnahme Aszites entwickelt, wohingegen sich bei der Gruppe, die keine Therapie erhalten hatte, nur bei einem Fall Aszites nachweisen ließen.

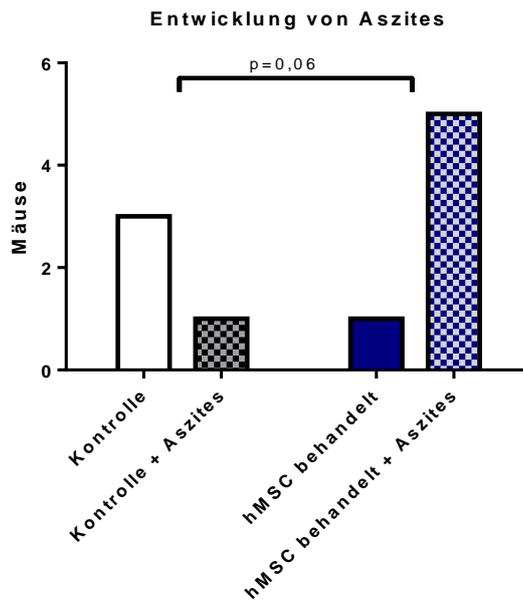


Abbildung 17: von Aszites betroffene Mäuse, Kontrolle: Keine hMSC Therapie, Behandelt: Mit hMSC Therapie

Zur Veranschaulichung wurde in Abbildung 17 die Inzidenz der mit Aszites belasteten Mäuse vs. der nicht belasteten Mäuse in der Versuchsgruppe der hMSC-behandelten Tiere im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren gegenübergestellt. Hier ist ein Hinweis darauf enthalten, dass die hMSC-Therapie zur Ausbildung von Aszites beigetragen hat.

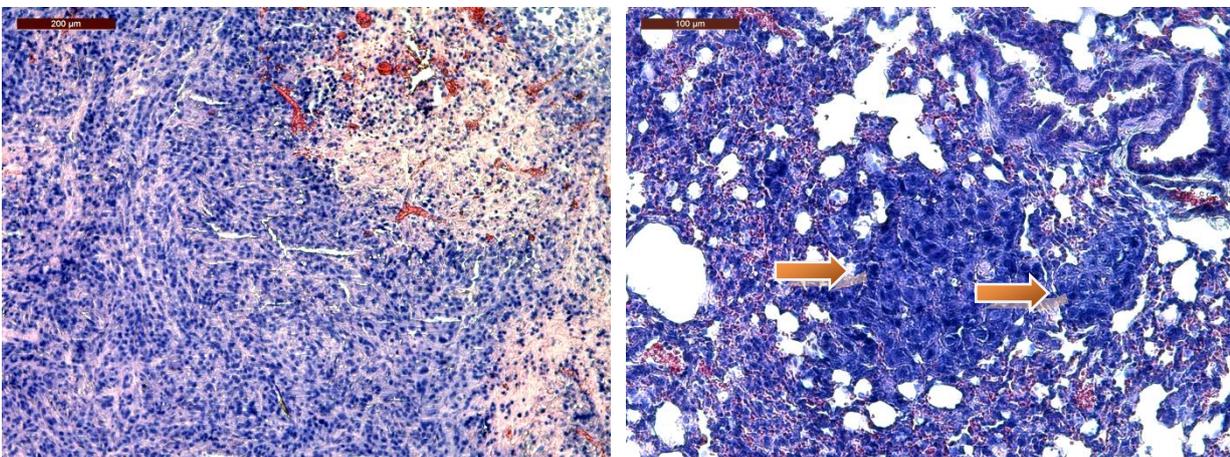


Abbildung 18 links: Primärtumor

Abbildung 19 rechts: Lungenmetastase (Pfeilmarkierung)

Bei der Aufarbeitung des Tumorgewebes des 2. Zyklus konnte die makroskopisch bereits festgestellte hohe Invasivität bestätigt werden. Die Tumoren präsentierten sich als mäßig bis schlecht differenzierte Adenokarzinome und wiesen in vielen Fällen, wie aus Abbildung 18 hervorgeht, einzelne Nekroseareale auf (hier im oberen rechten Bildteil angeschnitten).

Auch das untersuchte Lungengewebe zeigte deutliche Veränderungen (vgl. hierzu Abbildung 19 rechts: Lungenmetastase als beispielhafte Darstellung einer Lungenmetastase) hinsichtlich einer

Lungenmetastasierung. Hier mit gelben Pfeilen markiert.

Nach der Analyse ließen sich bei 6/6 Mäusen der Behandlungsgruppe und 2/4 Mäusen der Kontrollgruppe Lungenmetastasen feststellen. Angesichts des unten aufgeführten Scores (s. Tabelle 5) ergab sich der Hinweis, dass hMSC zu einer vermehrten Lungenmetastasierung führen ($p = 0,07$). Hierzu wurden beispielhaft charakteristische Gewebeschnitte der Lungen aller Versuchstiere ausgewählt und ohne Wissen der Gruppenzugehörigkeit ausgewertet, um repräsentativere Ergebnisse zu erzielen.

Tabelle 5: Score der Lungenmetastasen (LM im ausgewählten Abschnitt: +: 1, ++: 2, +++: 3 und mehr)

Maus	Kontrolle	Maus	hMSC-Behandlung
M1	---	M4	+
M5	---	M10	+
M2	+	M6	++
M8	++	M7	++
		M3	+++
		M9	+++

hMSC in der Lunge nach Färbung mit DAPI und Markierung mit Cell Tracker, red CMTPIX

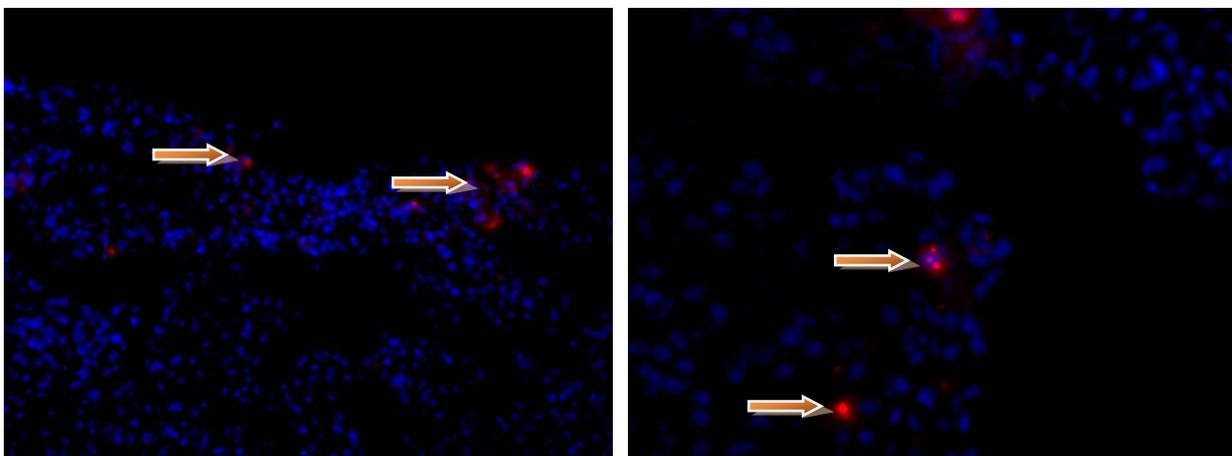


Abbildung 20 links: hMSCs-Nachweis im Lungengewebe (B 400x Vergrößerung)

Abbildung 21 rechts: hMSCs-Nachweis im Lungengewebe (A 200x Vergrößerung)

Es konnte der Nachweis erbracht werden, dass in 5/6 Mäusen markierte hMSC in der Lunge detektierbar waren. In den mit DAPI gefärbten Gewebeschnitten der Lunge sind deutlich die markierten hMSC zu erkennen (Pfeilmarkierung). Zur weiteren Evaluation des Tumors wurde eine KI-67-Färbung durchgeführt, um einen Eindruck über die Mitoserate im Tumorgewebe zu erhalten. Auch eine CD31-Färbung wurde ausgeführt, um Gefäße darzustellen, die essenziell für die Invasion

des Tumors mit hMSC sind.

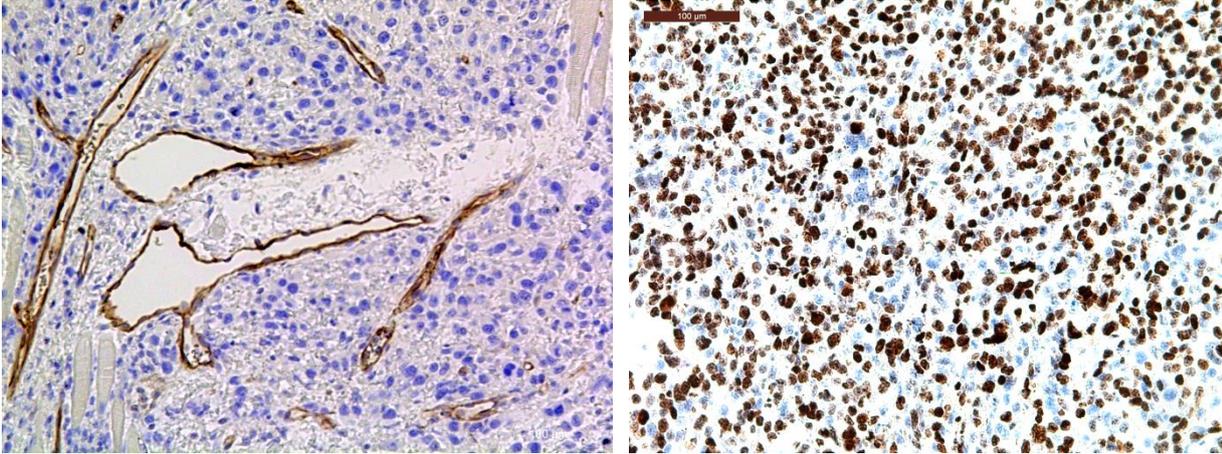


Abbildung 22 links: CD31-Färbung des Tumorgewebes

Abbildung 23 rechts: KI-67-Färbung des Tumorgewebes

Das angefärbte Gewebe in der KI-67-Färbung präsentiert sich mit einer hohen Anzahl an Zellen, die sich in der Mitose befanden. Wie aus dem Bild der CD31-Färbung hervorgeht (vgl. Abbildung 22), waren deutlich positive Signale im Tumorstroma feststellbar.

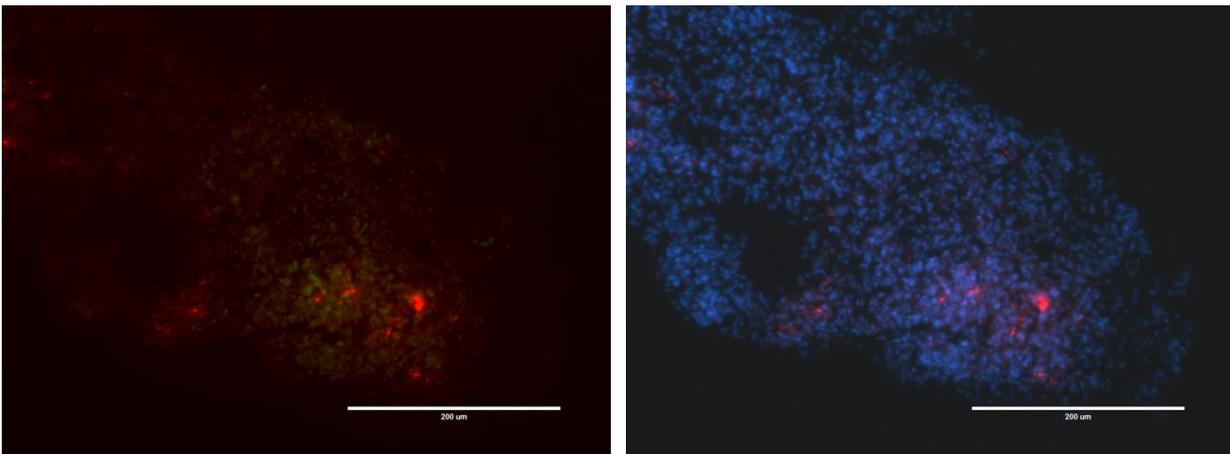


Abbildung 24 links: Anreicherung der CMTPIX red markierten hMSCs im Bereich einer Lungenmetastase

Abbildung 25 rechts: DAPI-Färbung des Lungengewebes und Nachweis der mit CMTPIX red markierten hMSCs

Bereits bei der Analyse der Gewebe aus dem 1. Zyklus zeigte sich eine Anreicherung der MSC im Lungengewebe. Die zunächst plausible Annahme, dass die MSC aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften im Lungengewebe verblieben sind, wurde dahingehend spezifiziert, dass sich die MSC im Bereich der Lungenmetastasen angereichert haben. Dies ist aus Abbildung 24 und Abbildung 25 ersichtlich. Hierbei wurde das gewonnene Lungengewebe zunächst mit einer KI-67-Färbung gefärbt (Grün), um die Metastasen anzufärben, bevor anschließend eine DAPI-Färbung erfolgte.

Abbildung 24 ist beispielhaft eine Lungenmetastase dargestellt. Deutlich sind hier die mit CMTPIX red markierten MSC zu erkennen, die sich im Bereich der Metastase konzentrieren. Dies konnte in den Versuchstieren mit Lungenmetastasierung nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 5).

6.2 In-vitro Ergebnisse

6.2.1 Proliferation über 48h sowie Wirkung von Cisplatin, Gemcitabine und Sorafenib

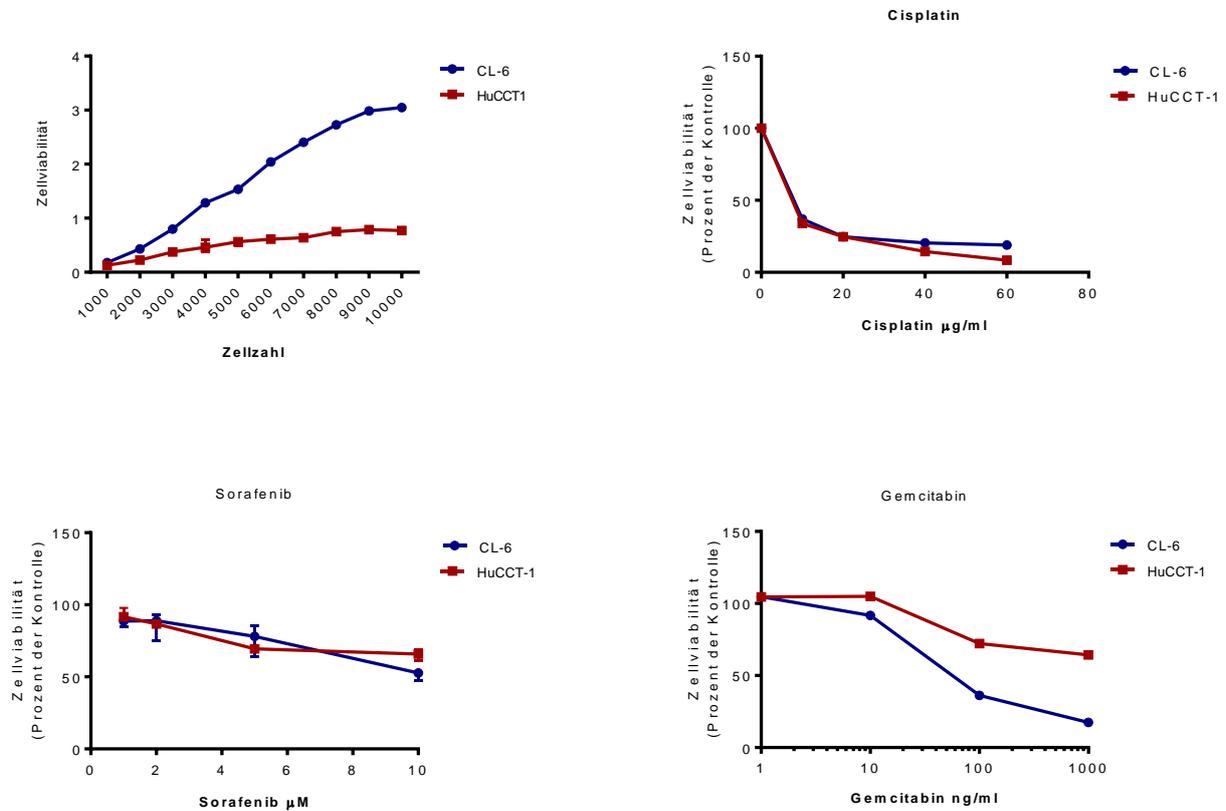


Abbildung 26: Proliferation von CL-6 und HuCCT-1 sowie die Auswirkung von Cisplatin, Gemcitabine und Sorafenib

Der CCK-8-Assay ließ für die beiden untersuchten Tumorzelllinien CL-6 und HuCCT-1 nach einer Kultivierungszeit von 48 h einen signifikanten Unterschied erkennen (Hier beispielhaft für 6000 sowie 10.000 Zellen, mit $p < 0.05$, aufgeführt).

Die weiterhin aufgeführten Graphen zeigen den Einfluss der getesteten Substanzen Cisplatin, Gemcitabin und Sorafenib. Es konnten deren inhibitorische Wirkung und die Abhängigkeit zur Konzentration in der Zellkultur nachgewiesen werden.

6.2.2 Proliferation nach Behandlung mit hMSC-Überstand

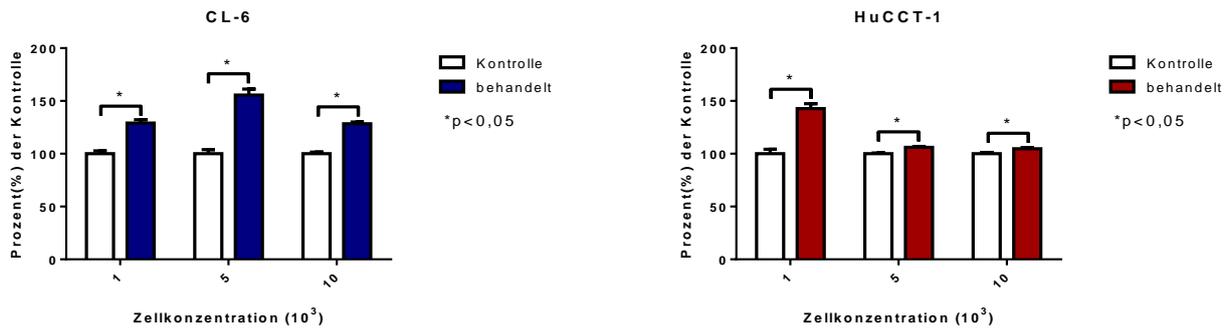


Abbildung 27: Auswirkung von hMSC-Überstand auf das Zellwachstum von CL-6 und HuCCT-1

Um den Einfluss des hMSC-Überstands auf die Proliferation von CL-6 und HuCCT-1 zu untersuchen, wurden die Tumorzelllinien mit dem Überstand vorbehandelt. Nach der Behandlung mit dem hMSC-Überstand offenbarten die Kontroll- und auch die Behandlungsgruppe der beiden untersuchten Tumorzelllinien einen signifikanten Unterschied. Die Gruppe, die mit hMSC-Überstand vorbehandelt wurde, zeigte sich mit einer höheren Viabilität (Kontrolle vs. vorbehandelte CL-6 und HuCCT-1: $p < 0,05$). Dies konnte durch eine Basislinienkorrektur hervorgehoben werden. Hierfür wird die Kontrollgruppe als 100 % angenommen und mit der entsprechenden Behandlungsgruppe verglichen.

6.2.3 Proliferation nach Behandlung mit hMSC-Überstand und Cisplatin, Gemcitabine und Sorafenib

Ziel war es, den Einfluss des hMSC-Überstands auf das Wachstum und Therapieansprechen von CL-6 und HuCCT-1 zu untersuchen. Dazu wurden die Tumorzelllinien mit hMSC-Überstand vorbehandelt, um anschließend die Wirkung verschiedener Substanzen, die in der Tumorthherapie eingesetzt werden, zu untersuchen. Es zeigte sich, dass der hMSC-Überstand in beiden untersuchten Zelllinien zu einem signifikanten Anstieg der Resistenzen gegenüber den getesteten Substanzen führte.

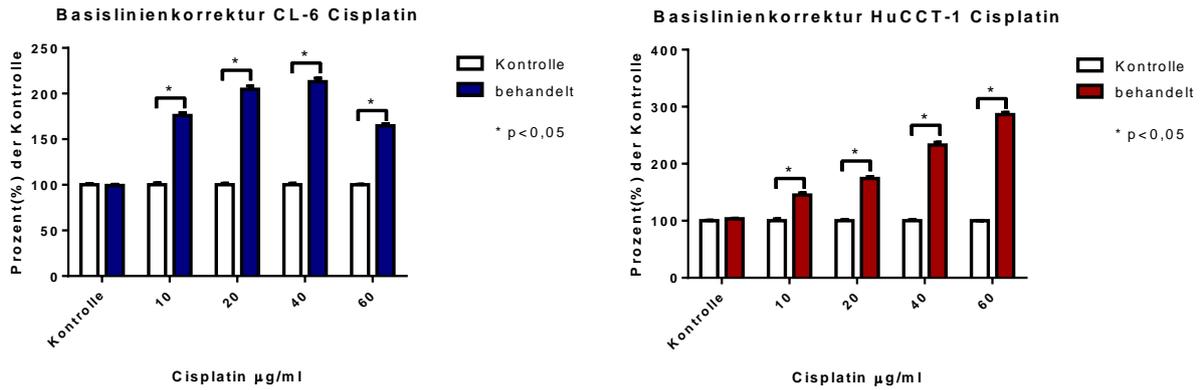


Abbildung 28: Zunahme der Resistenz der Tumorzelllinien CL-6 und HuCCT-1 aufgrund einer Vorbehandlung mit hMSC-Überstand in Abhängigkeit unterschiedlicher Cisplatin-Konzentrationen

Es konnte festgestellt werden, dass die Vorbehandlung mit hMSC-Überstand eine erhöhte Resistenz gegenüber Cisplatin bewirkte, wobei der größte Unterschied zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe für CL-6 bei 40 µg/ml lag (CL-6: Cisplatin 40 µg/ml Kontrolle vs. hMSC-Überstand vorbehandelt: $p < 0.0001$), hingegen zeigte sich für HuCCT-1 der größte Unterschied bei einer Cisplatinkonzentration von 60 µg/ml (HuCCT-1: Cisplatin 60 µg/ml Kontrolle vs. hMSC-Überstand vorbehandelt: $p < 0.0001$).

Setting: Behandlung mit Gemcitabine nach Anwendung von hMSC-Überstand

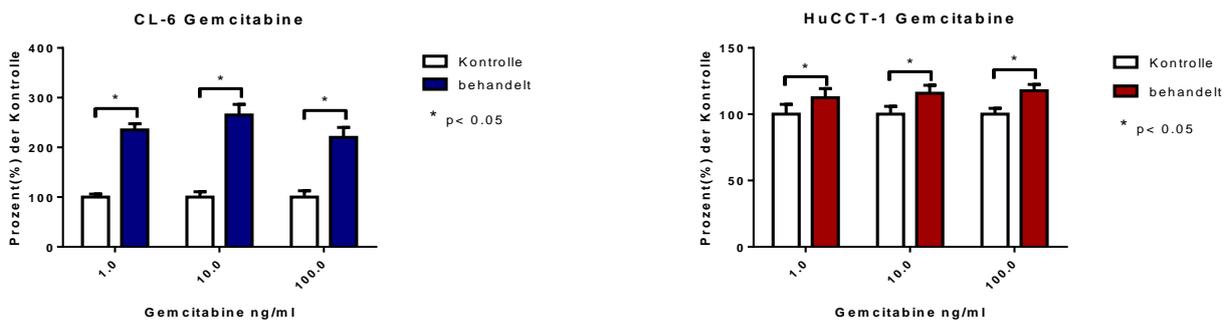


Abbildung 29: Zunahme der Resistenz von CL-6 und HuCCT-1 gegenüber Gemcitabin, nach der Behandlung mit hMSC-Überstand

Auch bei der Behandlung mit Gemcitabin mit vorangegangener Inkubation mit hMSC-Überstand konnte ein Unterschied bei beiden untersuchten Zelllinien beobachtet werden, wobei gerade die HuCCT-1-Zellen in den einzelnen Behandlungsgruppen einen ähnlichen Unterschied zwischen vorbehandelten und unbehandelten Zellen aufwiesen (Bsp.: HuCCT-1: Gemcitabin 100 ng/ml Kontrolle vs. hMSC-Überstand vorbehandelt: $p < 0.016$).

Bei der CL-6-Zelllinie gab es einen Unterschied zwischen den Gruppen, wobei die mittlere Konzentration von 10 ng/ml Gemcitabin (CL-6: Gemcitabin 10 ng/ml Kontrolle vs. hMSC-Überstand vorbehandelt: $p < 0.0001$) den größten Unterschied zur Kontrolle erkennen ließ.

Setting: Behandlung mit Sorafenib nach Anwendung von hMSC-Überstand

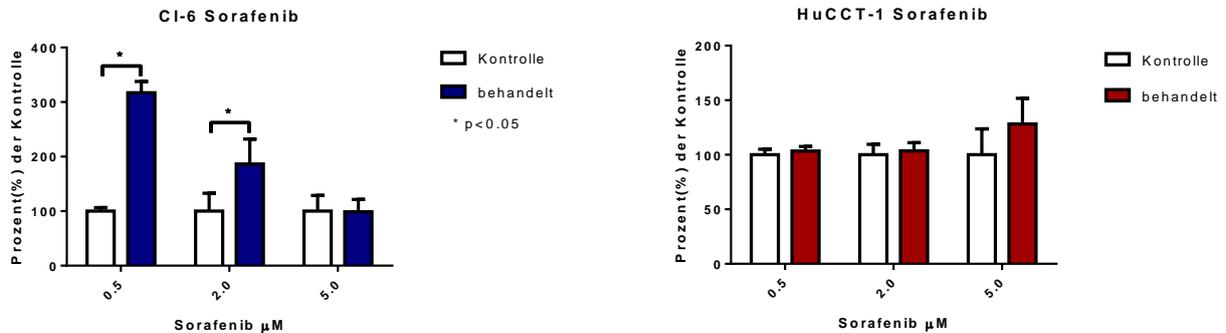


Abbildung 30: Einfluss der Vorbehandlung von CL-6 und HuCCT-1 mit hMSC-Überstand auf die Wirkung von Sorafenib

Die Vorbehandlung mit hMSC-Überstand zeigte keine Veränderung der Resistenz der Tumorzelllinie HuCCT-1 nach einer Behandlung mit Sorafenib im Vergleich zu den vorhergehend beschriebenen Experimenten. Einzig bei den CL-6-Zellen war ein Unterschied bei einer niedrigen Konzentration von Sorafenib von 0,5 μM ($p = 0,001$) sowie 2,0 μM ($p = 0,0114$) ersichtlich.

6.2.4 Zelladhäsions-Assay

Mit dem Zelladhäsionsassay wurde die Adhärenz von hMSC an CL-6 und HuCCT-1 untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Tumorzellen zu einer verstärkten Adhärenz der hMSC führten, was aus Abbildung 31 hervorgeht (Adhärenz hMSC für CL-6: 5 Min.: $p = 0,0001$, 15 Min.: $P = 0,0001$, 30 Min.: $p = 0,0001$ und HuCCT-1: CL-6: 5 Min.: $p = 0,0001$, 15 Min.: $P = 0,0001$, 30 Min.: $p = 0,0001$).

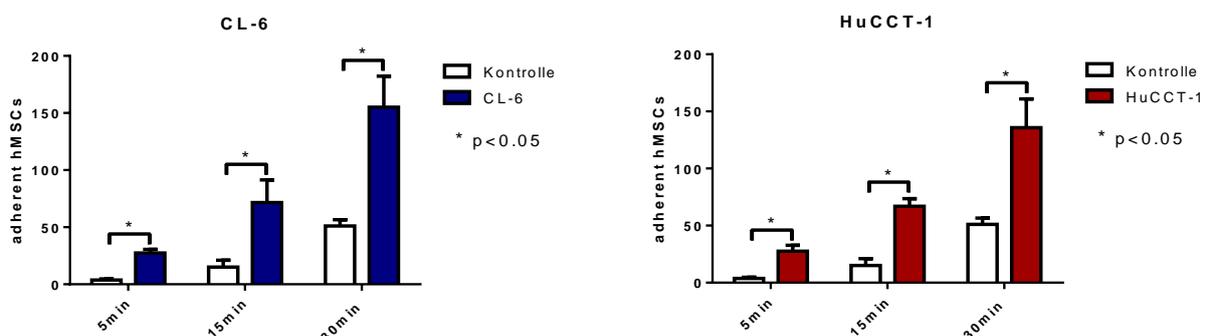


Abbildung 31: Adhäsion von hMSCs an CL-6 u. HuCCT-1

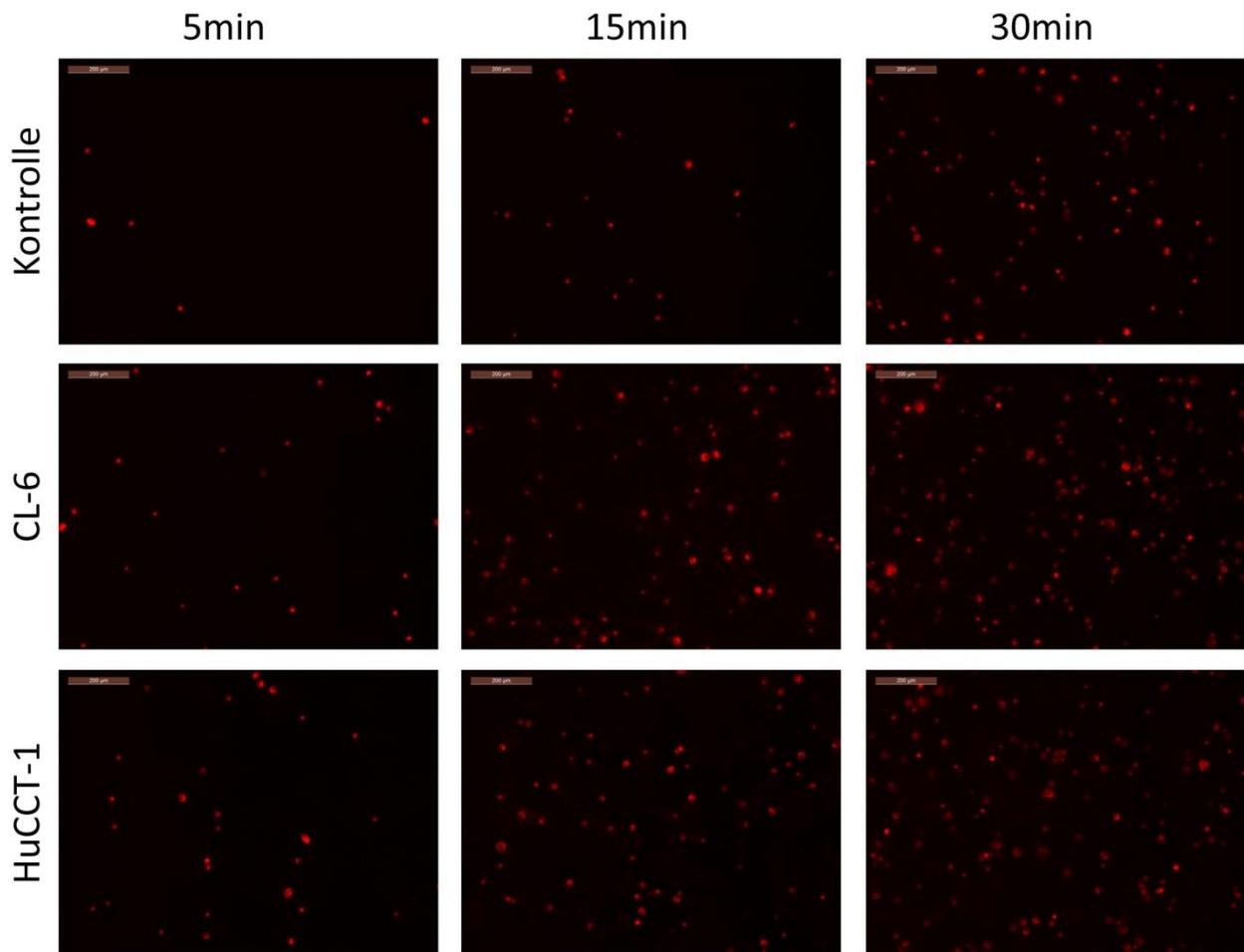


Abbildung 32: hMSCs Adhäsion an CL-6- und HuCCT-1

Auch aus dieser Abbildung 32, die die adhärirten hMSC zeigt, ist ein deutlicher Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den beiden Tumorzelllinien zu erkennen. Zudem spiegelt die Abbildung die Zunahme der adhärirten hMSC über die untersuchten Zeiteinheiten wider. So konnte nachgewiesen werden, dass ein signifikanter Unterschied zwischen 5 Min. und 30 Min. Adhärenzzeit besteht.

6.2.5 Transmigration

Bei der Transmigration wurde die Invasion von hMSC in das Tumorstroma simuliert. Diese sollten, stimuliert durch Tumorzellüberstand (von CL-6 und HuCCT-1), eine Porenmembran (Porengröße betrug 8 µm) durchwandern.

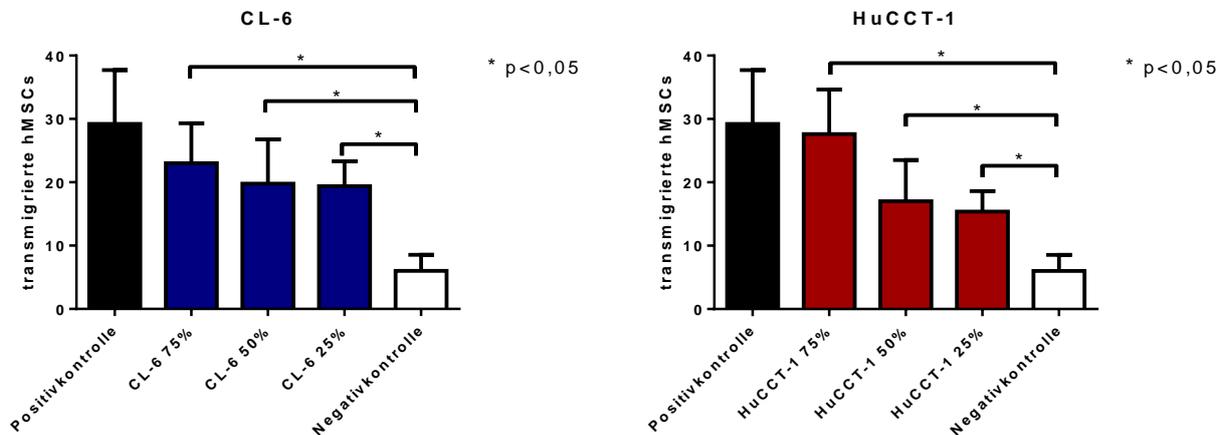


Abbildung 33: Transmigration von hMSCs zum Tumorzellüberstand von CL-6 und HuCCT-1

Die Auswertung der Transmigrationsmembranen erbrachte den Nachweis, dass die hMSC durch den Tumorzellüberstand dazu angeregt wurden, durch die entsprechenden Membranen zu transmigrieren. Durch eine Verdünnung des Überstands war es zudem möglich, eine Abhängigkeit zur Konzentration aufzuzeigen. Hierbei konnte für jede verwendete Verdünnung von CL-6- und HuCCT-1-Überständen ein signifikantes Ergebnis erzielt werden (CL-6: Negativkontrolle (Neg.) vs. CL-6 25 %: $p = 0.0002$; Neg. vs. CL-6 50 %: $p = 0.0032$; Neg. vs. CL-6 75 %: $p = 0.0005$; HuCCT-1: Neg. vs. HuCCT-1 25 %: $p = 0.0009$; Neg. vs. HuCCT-1 50 %: $p = 0.0079$; Neg. vs. HuCCT-1 75 %: $p = 0.0002$).

Bei beiden Tumorzellüberständen konnte beobachtet werden, dass sie die hMSC zur Transmigration befähigen beziehungsweise diese anziehen (Die angegebenen Prozentangaben entsprechen dem Volumenanteilanteil des Tumorzellüberstandes am gesamten Medium).

7 Diskussion

7.1 Einleitung

Das Cholangiokarzinom als zweithäufigster maligner Primärtumor der Leber ist aufgrund seines aggressiven Phänotyps und seiner eingeschränkten Therapiemöglichkeiten eine schwer zu behandelnde Tumorentität. Die chirurgische Therapie, die sich nach der Lokalisation und Ausbreitung des Tumors richtet, ist nur nach ausführlicher Patientenselektion und individueller Therapieplanung mit einem Vorteil für den Patienten versehen. Ein längerer asymptomatischer Verlauf führt zu einer späten Diagnose und damit einhergehend zu einer Limitierung der Therapieoptionen, da die Tumoren dann meist in einem fortgeschrittenen Stadium detektiert werden. Obwohl in den letzten Jahren in der Therapie einige Fortschritte erzielt werden konnten, bleiben die Überlebensraten weiterhin niedrig. Dies spiegelt sich in den niedrigen Fünfjahresüberlebensraten wider (Everhart und Ruhl 2009; Ustundag 2008). Vor diesem Hintergrund ist es essenziell, weitere Therapiemöglichkeiten zu eruieren, um diese in die Klinik transferieren zu können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, zunächst ein therapeutisches Maus-Modell für ein Cholangiokarzinom zu entwickeln, um mögliche neue Therapieoptionen in vivo testen zu können. Hierfür sollte die NOD/SCID-Maus verwendet werden, die durch ihre bereits beschriebenen Eigenschaften eine gute Möglichkeit bietet, humane Tumoren im Mausversuch zu untersuchen, ohne eine immunologische Abwehrreaktion zu induzieren.

Da die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Tiermodellen eine stete Herausforderung darstellt (Lutz und Bueter 2016), galt es, die Gegebenheiten des humanen Tumormilieus bestmöglich nachzustellen. Deshalb wurde die Entscheidung getroffen, die Cholangiokarzinomzellen direkt in die Leber zu injizieren, um ein intrahepatisches Cholangiokarzinom zu induzieren. Dies sollte den Ausgangspunkt bilden, um die wechselseitige Beeinflussung von Tumorzellen und dem umgebenden Lebergewebe zu simulieren sowie eine bessere Erreichbarkeit der Tumoren durch die verwendeten mesenchymalen Stammzellen zu erreichen. Ziel war es dabei auch, dass durch die intrahepatische Injektion der Tumorzellen und die Etablierung eines Cholangiokarzinoms, die Möglichkeit einer optimierten Interaktion von Tumor- und Leberzellen und insbesondere die lokale Wirkung modulierender Faktoren, wie Chemokine, Wachstumsfaktoren und Tumorassoziierter Zellen, wie Makrophagen und Fibroblasten zu erreichen.

Mit dem hier vorgestellten Modell gelingt es im Vergleich zu zahlreichen anderen Tumormodellen, die die Injektion von Tumorzellen meist subkutan vorsehen, die direkte Interaktion von Tumorzellen und Lebermilieu zu erschließen. Gleichzeitig stellt dieser Versuchsaufbau allerdings eine Reihe an Anforderungen bezüglich Durchführung und Analyse. Beispielsweise ist eine direkte Messung der Tumorgröße nicht möglich und das Einbringen der Tumorzellen ist wesentlich invasiver als eine

einfache subkutane Injektion. Hierin liegt ein nicht zu vernachlässigender Schwachpunkt des Mausmodells, da durch das invasive Induzieren des Cholangiokarzinoms in den ersten Versuchen eine erhöhte Verlustrate an Versuchstieren zu verzeichnen war. Dies konnte jedoch durch eine Verbesserung der Operationstechnik hin zu einem weniger invasiven Verfahren deutlich verbessert werden.

Zudem sollte nicht vernachlässigt werden, dass durch die Applikationsmethode die Möglichkeit besteht, eine peritoneale Aussaat der Tumoren zu verursachen, was sich negativ auf die Versuchsergebnisse auswirken kann.

Des Weiteren musste eine Tumorzelllinie ausgewählt werden, mit der eine hohe Tumor-Induktionsrate zu erwarten war, um vorzeitige Tierverluste zu vermeiden. Mit der für die Tierversuche verwendeten CL-6-Zelllinie konnte eine hohe Tumorzellinitiationsrate erzielt werden.

Parallel zur Etablierung des Mausmodells wurde der Versuch unternommen, durch In-vitro- und In-vivo-Daten den Einfluss von hMSC auf das Cholangiokarzinom im Hinblick auf den Einsatz als mögliches therapeutisches Tool zu untersuchen. Im Tiermodell sollten dabei die Dynamik sowie der Einfluss auf das Tumorwachstum evaluiert werden. Außerdem wurden zum genaueren Verständnis einzelne Komponenten des Modells und ihre wechselseitige Beeinflussung untersucht und mit zusätzlichen In-vitro-Versuchen untermauert, wobei die explorierten Eigenschaften vor dem Hintergrund der unzählbaren möglichen Zusammenhänge nur einen eingeschränkten Ausschnitt repräsentieren, der unter dem Gesichtspunkt der Komplexität des Systems nur im gegebenen Kontext analysiert werden kann.

In Anbetracht dessen weist das NOD/SCID-Modell gewisse Limitierungen auf, die sich aus den vorzufindenden Gegebenheiten ableiten. Ein wesentliches Problem besteht dabei in der unterschiedlichen Interaktion von Xenograft und Host, die sich von jenen Konstellationen im humanen Mikromilieu des Tumors wesentlich unterscheiden können. Dieses Problem wurde zum Beispiel von (Rizvi und Gores 2013, S. 1220–1223) beschrieben, die auch auf die zum Teil schwierige technische Umsetzung und die nicht zu vernachlässigen Kosten für die Durchführung hinweisen. Nichtsdestoweniger stellen Tiermodelle ein entscheidendes Tool zur Untersuchung von Tumoren dar und mit dem orthotopen NOD/SCID-Modell auf Basis der NOD/SCID-NOD.CB17/Alhnrj-Prkdc^{scid}/Rj-Maus ist es gelungen, ein Modell zu entwickeln, das sich zur Untersuchung des Cholangiokarzinoms eignet. Zudem handelt es sich bei richtiger Durchführung um eine vergleichsweise einfache Methode, ein intrahepatisches CCC zu induzieren.

Gleichwohl sollte festgehalten werden, dass eine direkte Übertragung der Ergebnisse in die Klinik stets schwierig ist und zumeist nur Hinweise auf mögliche Interaktionen festgestellt werden können.

7.2 Induktion der Tumoren

Mit der ausgewählten CL-6-Zelllinie konnte eine hundertprozentige Tumorinduktionsrate erreicht werden, die einen essenziellen Bestandteil eines Therapiemodells darstellt. Als besonderes Merkmal der CL-6-induzierten Tumoren ist die hohe Rate an Lungenmetastasen zu nennen, weshalb dieses Modell zur Untersuchung dieses Spezialfalls ideal geeignet ist. Es bleibt indes die Frage offen, ob die Lungenmetastasierung im Zuge der Einbringung der Tumorzellen in die Leber oder im Laufe des rapiden Wachstums aufgetreten ist beziehungsweise einen additiven Effekt der Behandlung mit hMSC darstellt, wie bereits durch (Karnoub et al. 2007) nachgewiesen werden konnte. Dies könnte zumindest eine Erklärung für das geringere Auftreten von Metastasen in der Kontrollgruppe sein (vgl. Tabelle 5). Vor diesem Hintergrund ist die Kombination aus NOD/SCID-Maus und der CL-6-Zelllinie als Modell zur Untersuchung eines intrahepatischen Cholangiokarzinoms mit Lungenmetastasierung als geeignet anzusehen.

Im Versuchsablauf präsentierten sich die durch CL-6 induzierten Tumoren als äußerst aggressiv und mäßig bis schlecht differenziert in der HE-Färbung. Dieser Phänotyp spiegelte sich zum einen in der hohen Tumorinduktionsrate und zum anderen in einem hohen mitotischen Index wider (vgl. Abbildung 23 rechts: KI-67-Färbung des Tumorgewebes), der mit einer KI-67-Färbung hervorgehoben werden konnte.

7.3 Immunhistologischer und histochemischer Nachweis des Cholangiokarzinoms

Die eindeutige Identifikation des Tumorgewebes als intrahepatisches Cholangiokarzinom gelang durch die in der klinischen Diagnostik etablierte Methode der antikörpergestützten Immunfärbung mit HepPar1 und CK-7 (vgl. Abbildung 10). Die untersuchten Gewebeschnitte zeigten sich als HepPar-1 negativ (Fan et al. 2003; Bridgewater et al. 2014) und CK-7-positiv, was für das Vorliegen eines Cholangiokarzinoms spricht (Geramizadeh und Seirfar 2015). Allerdings sollte dahingehend angemerkt werden, dass zur eindeutigen Identifizierung eines Cholangiokarzinoms ein singulärer Marker nicht zur Verfügung steht (Bridgewater et al. 2014; Hoyos et al. 2018). Deshalb ist es weiterhin unumgänglich, mehrere Marker zur Diagnosesicherung heranzuziehen. Möglicherweise kann hier in der näheren Zukunft auf eine größere Anzahl an Identifikationsmerkmalen zurückgegriffen werden, beispielsweise in Form von Mutationen im Isozitatdehydrogenase-1-und-2-Gen oder der Translokation im Fibroblast-Growth-Factor-Receptor-2-Gen (Borger et al. 2012; Arai et al. 2014).

7.4 Histologische Aufarbeitung

Nach der histologischen Aufarbeitung der durch CL-6 induzierten Tumoren wurde ersichtlich, dass es sich um mäßig bis schlecht differenzierte Cholangiokarzinome handelte. Die bereits

makroskopisch festgestellte hohe Invasivität und die hohe Tumorinduktionsrate konnten durch eine HE- und KI-67-Färbung hervorgehoben werden. Die Tumoren wiesen einen hohen Mitoseindex auf und es konnte eine diffuse Invasion der Leber festgestellt werden. Außerdem präsentierten sich die einzelnen Versuchstiere mit Mikrometastasierungen in den Lungen.

Um die für das Homing der MSC in das Tumorstroma essenziellen Blutgefäße hervorzuheben, wurde eine CD31-Färbung durchgeführt. Diese offenbarte in allen Proben das Vorhandensein von Gefäßen (vgl. Abbildung 22). Daneben wiesen die untersuchten Tumoren allerdings durchgängig Areale mit ausgeprägter Nekrose auf (vgl. Abbildung 18), was in Hinblick auf den hohen KI-67-Index für ein schnelles Wachstum des Tumors spricht und sich damit in das Gesamtbild der durch CL-6-Zellen induzierten Cholangiokarzinome einfügt.

Ausgeprägte Areale mit nekrotischem Gewebe ohne Zugang zum Herz-Kreislauf-System stellen vermutlich gerade für die Praxis eine große Herausforderung in Bezug auf eine mögliche Therapie mit mesenchymalen Stammzellen dar, da ein direktes Homing der MSC und damit die optimale Wirkstoffkonzentration im Tumormilieu schwerer erreicht werden könnten.

7.5 Sonographie und Evaluation der Tumorgroße

Zur Überprüfung der Tumorgroße im 2. Tierversuchszyklus wurde zwei Tage vor der Opferung eine Sonographie-Untersuchung durchgeführt. Dabei konnte, mit Ausnahme von zwei Mäusen, bei allen anderen Mäusen ein Tumor nachgewiesen werden, eine Korrelation der gefundenen Tumorgroßen *ex vivo* konnte allerdings nicht festgestellt werden (vgl. Abbildung 14).

Dies kann an der Präparation der Tumoren liegen, da sie nach der Entnahme größer erschienen als *in vivo*, was sich vermutlich auf Substanzdefekte zurückführen lässt, die durch die Präparation entstanden sind. Außerdem erfolgte mittels der Sonografie ausschließlich einer zweidimensionalen Darstellung. Die Tumoren, die sich mittels der Sonografie nicht detektieren ließen, waren beide aus der Kontrollgruppe und dem Tumor-Lebergewicht nach die kleinsten. Somit ist die nicht erfolgte Detektion aller Wahrscheinlichkeit nach auf die geringe Tumorgroße zurückzuführen. Zudem sollte die erschwerte Darstellung durch die Tierbeweglichkeit nicht vernachlässigt werden. Diesbezüglich könnte eventuell durch eine Kurznarkose Abhilfe geschaffen werden. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich diese Methode zwar zum Nachweis eines entsprechenden Tumors in der Mäuseleber eignet, die Bestimmung der Tumorausmaße bleibt allerdings fehleranfällig. Nichtsdestoweniger stellt sie eine gute Möglichkeit dar, um den Erfolg einer Tumorinduktion in der Mäuseleber zu dokumentieren, um die Entscheidung einer Opferung bei ausreichendem Tumorwachstum zu evaluieren.

In Zukunft sollten weitere, weniger vom Untersucher abhängige Methoden eingesetzt werden, um die Vergleichbarkeit einzelner Studien zu erhöhen und somit eine bessere Überprüfbarkeit zu erreichen.

Denkbar sind hier beispielsweise die Computertomografie oder Magnetresonanztomografie (Bao et al. 2012).

Bei der kurz vor der Opferung durchgeführten Sonografie wurde in 8/10 Mäusen Aszites nachgewiesen. Werden die gefundenen Ergebnisse korreliert, so ergibt sich der Hinweis, dass die mit hMSC behandelten Mäuse vermehrt zur Bildung von Aszites neigten (vgl. Abbildung 17; $p=0,06$ für hMSC-Therapie vs. Kontrollgruppe). Dies ist möglicherweise auf den Phänotyp der aus Aszites isolierten CL-6-Zellen zurückzuführen und wurde gleichzeitig durch die mesenchymalen Stammzellen und ihre wachstumsfördernden Eigenschaften unterstützt.

7.6 Der Einsatz von mesenchymalen Stammzellen

Der Einsatz von genetisch veränderten mesenchymalen Stammzellen stellt ein vielversprechenden Ansatz zu Behandlung von Tumoren dar (Conrad et al. 2007; Zischek et al. 2009; Niess et al. 2011; Bao et al. 2012; Kim und Cho 2013; Moniri et al. 2014; Uchibori et al. 2014; Gamba et al. 2015; Niess et al. 2015). Die selektive Aktivierung der transfizierten hMSC im Tumorstroma ist dabei der zu vermutende Mehrwert im Vergleich zu einer herkömmlichen Chemotherapie, wie sie von Valle et al. 2010 für das Cholangiokarzinom beschrieben ist, da diese Therapiemöglichkeit von einer systemischen Gabe eines Chemotherapeutikums abweicht und gezielt an den Orten der Tumormanifestation ihre Wirkung entfalten soll. Die Grundlage bildet dabei das sogenannte Homing der hMSC (Studený et al. 2004; Kidd et al. 2009; Uchibori et al. 2013; Serakinci et al. 2014), wobei es vermehrter Anstrengung bedarf, die dahinter verborgenen Mechanismen zu entschlüsseln und zu verstehen, da man sich dadurch eine Verbesserung beziehungsweise eine mögliche Optimierung der Akkumulation der hMSC im Tumorgewebe versprechen kann und auf diese Weise einen Fortschritt einer möglichen MSC-basierten Therapie erzielen würde.

Unschwer ist hier der mögliche Vorteil für Patienten auszumachen, die sich in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung befinden. So könnten durch das Homing der hMSC in das Tumorstroma und gleichzeitig auch in mögliche Filiae sowie die darauffolgende selektive Aktivierung der hMSC die Nebeneffekte einer antitumoralen Therapie, im Vergleich zu einer herkömmlichen Chemotherapie, reduziert werden. Studien diesbezüglich konnten bereits in eine klinischen Phase 1/2- Studie zur Behandlung von gastrointestinalen Tumoren überführt werden (Niess et al. 2015). Des Weiteren konnten Studien zur Behandlung von Ovarkarzinomen und Lungentumoren wie auch Lebertumoren etabliert werden (Lin et al. 2019) Die Ergebnisse sind abzuwarten.

Zudem konnte eine klinische Studie bezüglich der Wirksamkeit von mesenchymalen Stammzellen im Hinblick auf die Sicherheit und Effektivität des Homings bei Patienten mit Prostatakarzinom etabliert werden (Schweizer et al. 2019). Alle klinischen Versuche sind jedoch bis zuletzt die Ergebnisse schuldig.

7.7 In-vivo-Dynamik der hMSC: Einfluss auf Tumorwachstum und Metastasierung

Die Tierexperimente hatten unter anderem zum Ziel, den optimalen Zeitpunkt zu finden, bei dem sich die größte Anzahl an hMSC im Tumorstroma detektieren lässt, um die Effektivität einer antiproliferativen Therapie zu erhöhen. Dabei wies der 1. Zyklus eine Dynamik auf, die auf eine limitierte Verweildauer der hMSC im Lungengewebe hindeutete (vgl. Abbildung 9). Im 1. Zyklus war in der ersten Gruppe in 4/4 Mäusen hMSC im Lungengewebe nachweisbar und in der zweiten Gruppe in 3/4. In den folgenden Gruppen 3 und 4 waren dagegen keine hMSC im Lungengewebe detektierbar. Dafür gelang der Nachweis im Tumorstroma von einer Maus in Gruppe 3. Zudem gelang der einmalige, beziehungsweise in manchen Tumoren der zweimalige Nachweis von hMSC, der eingeforderte dritte Nachweis allerdings nicht. Diese Ergebnisse legen eine gewisse Dynamik der hMSC im Versuchstier nahe und bildeten die Grundlage für den modifizierten 2. Zyklus. Das Ziel des 2. Zyklus bestand darin, bei gleichbleibender Anzahl von applizierten hMSC einer Einzeldosis die Anzahl an nachweisbaren hMSC im Tumorstroma zu erhöhen. Hierzu wurden die Applikationstage auf 3 erhöht (7., 12. und 17. postoperative Tag). In Abbildung 14: Entwicklung des Körpergewichts sowie Tumor- und Lebergewicht sind die einzelnen Injektionszeitpunkte gekennzeichnet.

Um eine genaue Lokalisation der hMSC in den gewonnenen Geweben zu realisieren, erfolgte der Nachweis der hMSC im 2. Zyklus mit Hilfe des fluoreszierenden Markers CMTPX (vgl. Abbildung 6). Auch bei dieser Versuchsreihe gelang ein adäquater Nachweis von markierten hMSC im Tumorstroma nicht. Es zeigte sich allerdings eine starke Anreicherung im Lungengewebe, die bereits im vorhergehenden Versuch zu finden war. Dieses Phänomen wurde zunächst auf die physikalischen Eigenschaften der hMSC und des Lungengewebes zurückgeführt, da ein einfaches ‚Hängenbleiben‘ wahrscheinlich war. Nach der histologischen Aufarbeitung des Lungengewebes ließ sich allerdings eine hundertprozentige Lungenmetastasierung in der Behandlungsgruppe feststellen (vgl. Abbildung 11, Tabelle 5). Die histologische Aufarbeitung ergab eine Anreicherung der hMSC im Bereich der filiären Ausbreitung (s. Abbildung 25), was ein Erklärungsansatz des wenig suffizienten Tumorhomings der MSC darstellt.

Daneben konnte beobachtet werden, dass die Tumoren des 2. Zyklus eine Tendenz hatten, durch hMSC in ihrer Proliferation angeregt worden zu sein. Dahingehend sei auf Abbildung 14 verwiesen, die einen signifikanten Unterschied in der mit hMSC behandelten Gruppe sowie der Kontrollgruppe erkennen lässt ($P = 0,019$). Zudem konnte ein Unterschied im Tumor- und Lebervolumen festgestellt werden (vgl. Abbildung 15, $p=0,04$). Diese Ergebnisse legen eine stimulatorische Beeinflussung des Tumorwachstums durch die applizierten hMSC nahe. Umso deutlicher wird dies im Kontext der In-vitro-Ergebnisse (s. u.). Dies steht im Einklang mit anderen Tumormodellen, in denen eine die Proliferation fördernde Wirkung der hMSC nachgewiesen werden konnte (Zhu et al. 2006; Xu et al.

2009, S. 37–38; Tsai et al. 2011b; Melzer et al. 2018).

Wie bereits anfangs beschrieben, wiesen die durch CL-6 induzierten Tumoren eine hohe Rate an Lungenmetastasen auf, wobei sich der Hinweis auf eine Beeinflussung der Metastasenrate durch die applizierten hMSC ergab (vgl. Abbildung 19 als beispielhafte Darstellung einer Lungenmetastase). Mithilfe des Scorings aus Tabelle 5 ergibt sich ein P-Wert von 0,07, was den Schluss zulässt, dass hMSC einen, wenn auch nicht hochsignifikanten, Einfluss auf die Lungenmetastasierung haben, wie er bereits durch Karnoub et al. 2007 beschrieben wurde.

Die hohe Rate an Lungenmetastasen in den mit hMSC behandelten Mäusen könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Stammzellen vermehrt in der Lunge nachgewiesen werden konnten (vgl. Abbildung 9 und Abbildung 24). Es bleibt allerdings zu untersuchen, ob die Lungenmetastasierung bereits vor der Behandlung mit hMSC bestand oder im Zuge dieser gefördert wurde, was sich als Schluss aus Tabelle 5 ergeben würde.

7.8 In-vitro-Experimente

Um die Ergebnisse aus den Tierexperimenten zu bekräftigen, wurden zusätzliche In-vitro-Tests durchgeführt, die die wechselseitige Beeinflussung der Tumorzellen und hMSC untersuchen sollten. Grundlage bildeten die bereits in den Tierexperimenten verwendeten hMSC und CL-6-Zellen sowie zusätzlich die Cholangiokarzinomzelllinie HuCCT-1, die in vorangegangenen Tierexperimenten zum Einsatz kam.

Dabei wurde die Beeinflussung des Transmigrationsverhaltens von hMSC durch CL-6- und HuCCT-1-Überstände untersucht. Zudem standen die Beeinflussung der Proliferation von CL-6 und HuCCT-1 durch hMSC-Überstände sowie ihre Wirkung auf antiproliferative Substanzen im Fokus dieser Arbeit. Ein weiteres Augenmerk lag auf der veränderten Adhäsion von hMSC gegenüber CL-6 und HuCCT-1. Zudem wurden die Fähigkeit zur Ausbildung sogenannter Gefäßvorläuferstrukturen mit Hilfe von Angiogeneseassays sowie die Beeinflussung der Tumorzellüberstände auf die Expression von bestimmten für das Homing relevanten Markern mittels Western-Blot untersucht. Hierbei zeigte sich ein für die Proliferation von Zellen bedeutsamer Marker erhöht (pAKT Verhältnis zu tAKT), allerdings flossen diese Ergebnisse aufgrund ihrer zum Teil unzureichenden Signifikanz nicht in die vorliegende Arbeit mit ein.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Tumorzelllinien einen entscheidenden Einfluss auf die hMSC ausübten. Auch die umgekehrte Beeinflussung von hMSC auf CL-6 und HuCCT-1 wurde in den verschiedenen Experimenten zur Proliferation und antiproliferativen Therapie offensichtlich.

7.9 Proliferation von CL-6 und HuCCT-1

Um einen Eindruck des Proliferationsverhaltens von CL-6 sowie HuCCT-1 zu erhalten, wurden beide Zelllinien hinsichtlich ihres Wachstums untersucht. Diesbezüglich konnte festgestellt werden, dass

CL-6 eine höhere Proliferationsrate in der Zellkultur hatte (vgl. Abbildung 26). Zudem wurde der antiproliferative Effekt von Cisplatin, Gemcitabin und Sorafenib untersucht, wobei für beide Tumorzelllinien eine ähnliche Dynamik nachgewiesen werden konnte. Dabei zeigten die Standardchemotherapeutika Cisplatin und Gemcitabin (Valle et al. 2010; Razumilava und Gores 2011) eine ähnliche antiproliferative Wirkung in beiden Zelllinien. Sorafenib besaß in der Zellkultur eine im Vergleich etwas geringere Auswirkung auf die Proliferation von CL-6 und HuCCT-1. Dies ist vermutlich auf die Wirkungsweise des Multikinaseinhibitors zurückzuführen, da dieser nicht nur direkt an den Tumorzellen angreift, sondern seine Wirkung erheblich über die Inhibition der für die Proliferation bedeutsamen Angiogenese entfaltet, die mit den CCK-8-Assays nicht simuliert werden kann (Strumberg 2005; Blechacz et al. 2009).

7.10 Beeinflussung der Adhäsion von hMSCs durch CL-6 und HuCCT-1

Bezüglich der Adhäsion von hMSC und ihrer Beeinflussung durch CL-6 und HuCCT-1 ergab sich bei beiden Zelllinien ein einheitliches Bild. Die Adhäsion der hMSC wurde durch die Tumorzelllinien verstärkt, wobei CL-6 zu einer verstärkten Adhärenz der hMSC führte. Wie aus Abbildung 31 und Abbildung 32 hervorgeht, bewirkte die Anwesenheit von CL-6 und HuCCT-1 eine vermehrte Adhärenz und zu jedem untersuchten Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (Adhärierte hMSC für CL-6: 5 Min.: $p = 0,0001$, 15 Min.: $P = 0,0001$, 30 Min.: $p = 0,0001$ und HuCCT-1: CL-6: 5 Min.: $p = 0,0001$, 15 Min.: $P = 0,0001$, 30 Min.: $p = 0,0001$). Dies lässt den Schluss zu, dass die Cholangiokarzinomzelllinien CL-6 und HuCCT-1 nicht nur eine vermehrte Transmigration (s. u.) hervorrufen, sondern auch eine verstärkte Adhärenz dieser angelockten Stammzellen. Im Kontext des TME kann dies dahingehend gedeutet werden, dass die angezogenen hMSC durch die Tumorzellen effektiver gebunden werden, wenn sie in das TME migrieren.

7.11 Invasionsverhalten der hMSC

Mit den sogenannten Transmigrationsassays besteht die Möglichkeit, das Invasionsverhalten von Zelllinien in vitro zu simulieren (Karnoub et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde das Transmigrationsverhalten von hMSC untersucht, die angezogen durch den Tumorzellüberstand in unterschiedlichen Konzentrationen die Transmigrationsmembran durchwandern sollten. Wie aus den Ergebnissen zum Transmigrationsverhalten hervorgeht, zeigten sich die Tumorzellen in der Lage, hMSC in signifikanter Weise in ihrem Transmigrationsverhalten zu beeinflussen (vgl. hierzu Abbildung 33). Anhand dieser Abbildung lässt sich erkennen, dass beide Zelllinien allein durch ihren Überstand in der Lage waren, die hMSC zur Transmigration zu befähigen beziehungsweise diese zu verstärken (CL-6 (Neg. vs. CL-6 25 %: $p = 0.0002$; Neg. vs. CL-6 50 %: $p = 0.0032$; Neg. vs. CL-6 75 %: $p = 0.0005$) HuCCT-1 (Neg. vs. HuCCT-1 25 %: $p = 0.0009$; Neg. vs. HuCCT-1 50 %:

$p = 0.0079$; Neg. vs. HuCCT-1 75 %: $p = 0.0002$). Zudem konnte eine Abhängigkeit zur verwendeten Konzentration des Überstandes beobachtet werden, was darauf hindeuten kann, dass die Transmigration durch in den Überständen befindliche Stoffe entscheidend stimuliert wird. Gleichwohl bedarf es zur Identifizierung der für das Tumorhoming relevanten Chemo- und Zytokine sowie von Rezeptoren und ihren Liganden weiterer Arbeit, da bereits vielen eine entscheidende Rolle dahingehend zugesprochen wird (vgl. Barcellos-de-Souza et al. 2013, Uchibori et al. 2013; Hong et al. 2014; Moniri et al. 2014; Rhee et al. 2015) und sie vermutlich mit ihren beteiligten Signalkaskaden den Schlüssel zum Verständnis bilden und ihr möglicher Einsatz ein Bestandteil einer stammzellbasierten Therapie ist.

7.12 Einfluss von hMSC auf die Proliferation von CL-6 und HuCCT-1

Um den Einfluss der mesenchymalen Stammzellen auf das Zellwachstum von CL-6 und HuCCT-1 zu untersuchen, wurden CCK-8-Assays durchgeführt, wobei die Vorbehandlungen nach den jeweilig erarbeiteten Protokollen variiert wurden.

In nahezu allen Untersuchungen ließ sich ein ausgeprägter Einfluss der hMSC beziehungsweise deren Überständen auf die Proliferation der Tumorzelllinien feststellen. Zudem konnte gezeigt werden, dass hMSC einen signifikanten Einfluss auf eine zytoreduktive Therapie mit Cisplatin und Gemcitabin haben.

Bei der Literaturrecherche in Bezug auf die Beeinflussung von Tumorzellen durch hMSC ergab sich kein einheitliches Bild. Zum einen werden antiproliferative Eigenschaften der hMSC beschrieben (vgl. Djouad 2003; Zhu et al. 2006; Khakoo et al. 2006; Xu et al. 2009; Qiao et al. 2008; Gabashvili et al. 2016), zum anderen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich die eingesetzten hMSC-Überstände wachstumsförderlich auf die untersuchten Tumorzelllinien auswirkten. Dies geht aus Abbildung 27 hervor und steht im Einklang mit den Hypothesen von Tsai et al. 2011b; Haga 2015; Wu et al. 2016, wonach sich MSC förderlich auf die Proliferation von Tumorzellen auswirken. Dies war bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen und konnte dabei an anderen Tumorzelllinien nachgewiesen werden. Die einzelnen Mechanismen, die zu diesem Effekt führen, sind weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung, wobei gezeigt werden konnte, dass IL-6 (Tsai et al. 2011b; Haga et al. 2015) diesbezüglich vermutlich eine entscheidende Rolle zukommt.

Aus den vorangegangenen Versuchen ergab sich die Frage, wie sich der hMSC-Überstand auf die Behandlung mit Cisplatin, Gemcitabin und Sorafenib auswirkt. Wie bereits Roodhart et al. 2011 belegen konnten, besitzen hMSC die Eigenschaft, Tumorzellen gegenüber einer Behandlung mit Cisplatin resistenter zu machen. Die Arbeitshypothese lautete somit, dass hMSC eine vermehrte Resistenz gegenüber den zytoreduktiven Agenzien bewirken. Dies konnte bei den untersuchten Cholangiokarzinomzelllinien bestätigt werden (vgl. Abbildung 28, Abbildung 29, Abbildung 30).

Den größten Effekt hatte dabei Cisplatin für CL-6 bei 40 µg/ml ($p < 0.0001$); hingegen zeigte sich für HuCCT-1 der größte Unterschied bei einer Cisplatinkonzentration von 60 µg/ml ($p < 0.0001$) (vgl. Abbildung 28). Die Wirkung von Gemcitabin offenbarte für CL-6 mit einer Konzentration von 10 ng/ml ($p < 0.0001$) den größten Unterschied zur Kontrolle. Für HuCCT-1 konnte indes kein bedeutender Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt werden, allerdings ergaben sich signifikante Unterschiede bei den Gruppen, die mit hMSC-Überstand vorbehandelt wurden. Diese wiesen ebenfalls eine erhöhte Resistenz gegenüber Gemcitabin auf (Abbildung 29, HuCCT-1 und 100ng/ml: $p < 0.016$). Die vermehrte Resistenz, die durch MSC vermittelt wird, war bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (vgl. Roodhart et al. 2011; Low et al. 2015, 2015; Le Naour und Couderc 2017), wobei auch hier die genauen Wirkungsmechanismen bis zum jetzigen Zeitpunkt unklar bleiben. Ein möglicher Mechanismus wird durch (Roodhart et al. 2011) beschrieben. Hier gelang der Nachweis, dass die vermehrte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika, die Platinderivate als Grundlage haben, mit einer vermehrten Ausschüttung von Fettsäuren einhergeht.

Der ebenso getestete Multikinaseinhibitor Sorafenib, der zum Beispiel zur Behandlung des fortgeschrittenen HCC eingesetzt werden kann (Zhu et al. 2017), erbrachte nicht den erwarteten Effekt in der Zellkultur, wie er von Blehacz et al. 2009 im Tierexperiment gefunden wurde. Einzig bei der Behandlung von CL-6 konnte bei Konzentrationen von 0,5 µM ($p = 0,001$) sowie 2,0 µM ($p = 0,0114$) ein signifikanter Effekt durch die hMSC beobachtet werden. Diesen Ergebnissen sollten weitere Untersuchungen folgen, um die genaue Beeinflussung von Sorafenib auf das Cholangiokarzinom evaluieren und mögliche therapeutische Konsequenzen erörtern zu können.

Daher stellt die weitere Exploration der Wirkungsmechanismen hinter einer zyto reduktiven Therapie einen entscheidenden Schritt hin zu einem besseren Verständnis von Resistenzen dar.

8 Zusammenfassung

Mit den beschriebenen Untersuchungen und Ergebnissen konnte die beidseitige Beeinflussung von Cholangiokarzinomzelllinien und mesenchymalen Stammzellen herausgearbeitet werden.

In der Zusammenschau kann festgestellt werden, dass mit dem orthotopen NOD/SCID-Mausmodell für das intrahepatische Cholangiokarzinom ein Tiermodell entwickelt werden konnte, das die Untersuchung des Cholangiokarzinoms in der Zukunft vereinfachen kann. Die dabei zum Einsatz gekommene Zelllinie CL-6 war in der Lage, als essenzielle Grundlage eines Therapiemodells eine hundertprozentige Tumorinduktionsrate zu erreichen. Die orthotope Injektion der Tumorzellen in die Leber und die damit verbundene Induktion eines intrahepatischen Cholangiokarzinoms bieten die Möglichkeit, den Tumor in seiner ‚natürlichen Umgebung‘ zu untersuchen und damit das Ansprechen auf etwaige Therapien zu detektieren.

Auf Grundlage des orthotopen NOD/SCID-Mausmodells konnte die Dynamik der verabreichten hMSC erforscht werden (Abbildung 9). Die Proliferation und Metastasierung des induzierten Cholangiokarzinoms wurden dabei stimulatorisch signifikant durch die intravenös verabreichten hMSC beeinflusst (Tabelle 5, Abbildung 14, Abbildung 15, Abbildung 16)

Diese konnten im Anschluss vermehrt in der Lunge detektiert werden, wobei eine Anreicherung im Bereich der Filiae des Cholangiokarzinoms zu verzeichnen war. Die Detektion im Tumorstroma gelang in beiden Tierexperimenten nur unzureichend. In den angeschlossenen In-vitro-Experimenten gelang die weitere Herausarbeitung der wechselseitigen Beeinflussung von hMSC und den Cholangiokarzinomzelllinien CL- 6 und HuCCT-1.

Es konnte gezeigt werden, dass hMSC durch CL-6 und HuCCT-1 signifikant in ihrem Transmigrationsverhalten angeregt werden konnten (Abbildung 33). Zudem führten beide Tumorzellreihen zu einer verstärkten Adhärenz der hMSC (Abbildung 31).

Im Gegenzug konnte durch die mesenchymalen Stammzellen eine starke Einflussnahme auf die native Proliferation von CL-6 und HuCCT-1 nachgewiesen werden (Abbildung 27). Bei der Behandlung unter Cisplatin (Abbildung 28), Gemcitabin (Abbildung 29) und Sorafenib (Abbildung 30) offenbarte sich eine verstärkte Resistenz der Tumorzellen gegenüber den angewendeten Agenzien, wobei der genaue Wirkungsmechanismus hinter der erhöhten Widerstandsfähigkeit offen bleibt.

9 Ausblick

Das Cholangiokarzinom ist noch immer eine schwer zu behandelnde Tumorentität, die annäherungsweise 10 % der primär in der Leber lokalisierten Tumoren darstellt (Sia et al. 2013) und mit einer hohen Mortalitätsrate einhergeht. Neben der chirurgischen Intervention, die für ausgewählte Fälle eine Verbesserung des Gesamtüberlebens bietet (DeOliveira et al. 2007; Neuhaus und Thelen 2008; DeOliveira et al. 2013; Wang et al. 2014; Doussot et al. 2015; Kambakamba et al. 2015; Neumann und Schmeding 2015), sollten allerdings weitere Therapieoption erarbeitet werden (Razumilava und Gores 2014; Zhu 2015). Im Fokus steht dabei das Tumormikromilieu, das mit vielen möglichen Angriffspunkten aufwartet. Dabei konnten MSC in vielen Tumormodellen bereits positive Therapieeffekte erzielen (vgl. Conrad et al. 2007; Zischek et al. 2009; Niess et al. 2011; Bao et al. 2012; Kim und Cho 2013; Moniri et al. 2014; Uchibori et al. 2014; Gamba et al. 2015; Niess et al. 2015).

Es gilt, die vielen Interaktionsmöglichkeiten, wie sie exemplarisch in der vorliegenden Arbeit analysiert wurden, besser zu verstehen. Die nachgewiesenen Effekte der hMSC auf die Metastasierung, Invasion und Proliferation sowie die Auswirkungen auf zytoreduktive Therapien gilt es zu erklären, um die wechselseitige Beeinflussung von Tumor- und Stammzellen für zukünftige Therapien zu nutzen und damit dem Cholangiokarzinom weitere Therapieoptionen entgegenstellen zu können. Des Weiteren ist die Umsetzbarkeit einer stammzellbasierten antitumoralen Therapie zu erörtern. Dazu bildet, für das Cholangiokarzinom, die vorliegende Arbeit eine erste Grundlage. Mit Hilfe des orthotopen Cholangiokarzinom-Mausmodells sollte es in der Zukunft leichter gelingen, wechselseitige Wirksamkeitsnachweise antitumoraler Therapien zu evaluieren und zu verbessern. Eine Weiterentwicklung hin zu einer weniger invasiven Einbringung der Tumorzellen, zum Beispiel mit Unterstützung einer sonographisch gestützten Punktion der Mäuseleber, ist dabei in Betracht zu ziehen, um eine allzu große Verlustrate der Versuchstiere sowie ein schnelleres und effektiveres Arbeiten zu ermöglichen.

Ein zunächst vielversprechender Ansatz konnte durch die Phase-I-II-Studie TREAT-ME1 (Niess et al. 2015) verfolgt werden. Die ersten klinischen Daten legen nahe, dass die Therapie mit genetisch modifizierten mesenchymalen Stammzellen sicher und gut tolerabel erscheint (Einem et al. 2019). Es konnte in 5/10 Patienten eine gleichbleibende Tumorgöße festgestellt werden. Eine Tumolvolumenreduktion ließ sich allerdings in keinem der eingeschlossenen Patienten nachweisen und auch die untersuchten Spiegel von Tumormarkern blieben auf einem konstanten Niveau (Einem et al. 2019). Die genannten Ergebnisse zeigen abschließend, dass es wesentlich mehr Anstrengung auf diesem Gebiet bedarf, um weitere signifikante Ergebnisse zu erzielen und dem Patienten damit weitere Therapieoptionen anbieten zu können.

10 Literaturverzeichnis

1. Abdelgalil, Ahmed A.; Alkahtani, Hamad M.; Al-Jenoobi, Fahad I. (2019): Sorafenib. In: Profiles of drug substances, excipients, and related methodology, S. 239–266. DOI: 10.1016/bs.podrm.2018.11.003.
2. Aldinucci, Donatella; Colombatti, Alfonso (2014): The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression. In: *Mediators of inflammation* 2014, S. 292376. DOI: 10.1155/2014/292376.
3. Arai, Yasuhito; Totoki, Yasushi; Hosoda, Fumie; Shiota, Tomoki; Hama, Natsuko; Nakamura, Hiromi et al. (2014): Fibroblast growth factor receptor 2 tyrosine kinase fusions define a unique molecular subtype of cholangiocarcinoma. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 59 (4), S. 1427–1434. DOI: 10.1002/hep.26890.
4. Bagante, Fabio; Gani, Faiz; Spolverato, Gaya; Xu, Li; Alexandrescu, Sorin; Marques, Hugo P. et al. (2015): Intrahepatic Cholangiocarcinoma: Prognosis of Patients Who Did Not Undergo Lymphadenectomy. In: *Journal of the American College of Surgeons* 221 (6), 1031-40.e1-4. DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2015.09.012.
5. Banales, Jesus M.; Cardinale, Vincenzo; Carpino, Guido; Marzioni, Marco; Andersen, Jesper B.; Invernizzi, Pietro et al. (2016): Expert consensus document. Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). In: *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 13 (5), S. 261–280. DOI: 10.1038/nrgastro.2016.51.
6. Bao, Qi; Zhao, Yue; Niess, Hanno; Conrad, Claudius; Schwarz, Bettina; Jauch, Karl-Walter et al. (2012): Mesenchymal stem cell-based tumor-targeted gene therapy in gastrointestinal cancer. In: *Stem cells and development* 21 (13), S. 2355–2363. DOI: 10.1089/scd.2012.0060.
7. Barcellos-de-Souza, Pedro; Gori, Valentina; Bambi, Franco; Chiarugi, Paola (2013): Tumor microenvironment: bone marrow-mesenchymal stem cells as key players. In: *Biochimica et biophysica acta* 1836 (2), S. 321–335. DOI: 10.1016/j.bbcan.2013.10.004.
8. Benavides, M.; Antón, A.; Gallego, J.; Gómez, M. A.; Jiménez-Gordo, A.; La Casta, A. et al. (2015): Biliary tract cancers: SEOM clinical guidelines. In: *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 17 (12), S. 982–987. DOI: 10.1007/s12094-015-1436-2.
9. Bergquist, Annika; Seth, Erik von (2015): Epidemiology of cholangiocarcinoma. In: *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 29 (2), S. 221–232. DOI: 10.1016/j.bpg.2015.02.003.
10. Blechacz, Boris (2017): Cholangiocarcinoma. Current Knowledge and New Developments. In: *Gut and liver* 11 (1), S. 13–26. DOI: 10.5009/gnl15568.
11. Blechacz, Boris; Komuta, Mina; Roskams, Tania; Gores, Gregory J. (2011): Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. In: *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 8 (9), S. 512–522. DOI: 10.1038/nrgastro.2011.131.
12. Blechacz, Boris R. A.; Smoot, Rory L.; Bronk, Steven F.; Werneburg, Nathan W.; Sirica, Alphonse E.; Gores, Gregory J. (2009): Sorafenib inhibits signal transducer and activator of transcription-3 signaling in cholangiocarcinoma cells by activating the phosphatase shatterproof 2. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 50 (6), S. 1861–1870. DOI: 10.1002/hep.23214.
13. Borger, Darrell R.; Tanabe, Kenneth K.; Fan, Kenneth C.; Lopez, Hector U.; Fantin, Valeria R.; Straley, Kimberly S. et al. (2012): Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping. In: *The*

- oncologist* 17 (1), S. 72–79. DOI: 10.1634/theoncologist.2011-0386.
14. Brandi, Giovanni; Venturi, Michela; Pantaleo, Maria Abbondanza; Ercolani, Giorgio (2016): Cholangiocarcinoma: Current opinion on clinical practice diagnostic and therapeutic algorithms: A review of the literature and a long-standing experience of a referral center. In: *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 48 (3), S. 231–241. DOI: 10.1016/j.dld.2015.11.017.
 15. Bridgewater, John; Galle, Peter R.; Khan, Shahid A.; Llovet, Josep M.; Park, Joong-Won; Patel, Tushar et al. (2014): Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma. In: *Journal of hepatology* 60 (6), S. 1268–1289. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.01.021.
 16. Bruyn, Cécile de; Najjar, Mehdi; Raicevic, Gordana; Meuleman, Nathalie; Pieters, Karlien; Stamatopoulos, Basile et al. (2011): A rapid, simple, and reproducible method for the isolation of mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly without enzymatic treatment. In: *Stem cells and development* 20 (3), S. 547–557. DOI: 10.1089/scd.2010.0260.
 17. BUHRING, H.-J.; BATTULA, V. L.; TREML, S.; SCHEWE, B.; KANZ, L.; VOGEL, W. (2007): Novel Markers for the Prospective Isolation of Human MSC. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1106 (1), S. 262–271. DOI: 10.1196/annals.1392.000.
 18. Chaijaroenkul, Wanna; Viyanant, Vithoon; Mahavorasirikul, Wiratchanee; Na-Bangchang, Kesara (2011): Cytotoxic activity of artemisinin derivatives against cholangiocarcinoma (CL-6) and hepatocarcinoma (Hep-G2) cell lines. In: *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 12 (1), S. 55–59.
 19. Clavien, Pierre-Alain; Lesurtel, Mickael; Bossuyt, Patrick M. M.; Gores, Gregory J.; Langer, Bernard; Perrier, Arnaud (2012): Recommendations for liver transplantation for hepatocellular carcinoma. An international consensus conference report. In: *The Lancet Oncology* 13 (1), e11–e22. DOI: 10.1016/S1470-2045(11)70175-9.
 20. Conrad, Claudius; Gupta, Rashmi; Mohan, Hema; Niess, Hanno; Bruns, Christiane J.; Kopp, Reinhard et al. (2007): Genetically engineered stem cells for therapeutic gene delivery. In: *Current gene therapy* 7 (4), S. 249–260.
 21. Darwish Murad, Sarwa; Kim, W. Ray; Harnois, Denise M.; Douglas, David D.; Burton, James; Kulik, Laura M. et al. (2012): Efficacy of neoadjuvant chemoradiation, followed by liver transplantation, for perihilar cholangiocarcinoma at 12 US centers. In: *Gastroenterology* 143 (1), 88–98.e3; quiz e14. DOI: 10.1053/j.gastro.2012.04.008.
 22. DeOliveira, Michelle L.; Cunningham, Steven C.; Cameron, John L.; Kamangar, Farin; Winter, Jordan M.; Lillemoe, Keith D. et al. (2007): Cholangiocarcinoma. In: *Annals of surgery* 245 (5), S. 755–762. DOI: 10.1097/01.sla.0000251366.62632.d3.
 23. DeOliveira, Michelle L.; Kambakamba, Patryk; Clavien, Pierre-Alain (2013): Advances in liver surgery for cholangiocarcinoma. In: *Current opinion in gastroenterology* 29 (3), S. 293–298. DOI: 10.1097/MOG.0b013e3283600a92.
 24. Djouad, F. (2003): Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. In: *Blood* 102 (10), S. 3837–3844. DOI: 10.1182/blood-2003-04-1193.
 25. Doussot, Alexandre; Groot-Koerkamp, Bas; Wiggers, Jimme K.; Chou, Joanne; Gonen, Mithat; DeMatteo, Ronald P. et al. (2015): Outcomes after Resection of Intrahepatic Cholangiocarcinoma: External Validation and Comparison of Prognostic Models. In: *Journal of the American College of Surgeons* 221 (2), S. 452–461. DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2015.04.009.

26. Einem, Jobst Christian von; Guenther, Christine; Volk, Hans-Dieter; Grütz, Gerald; Hirsch, Daniela; Salat, Christoph et al. (2019): Treatment of advanced gastrointestinal cancer with genetically modified autologous mesenchymal stem cells. Results from the phase 1/2 TREAT-ME-1 trial. In: *International journal of cancer*. DOI: 10.1002/ijc.32230.
27. Ercolani, G.; Dazzi, A.; Giovinazzo, F.; Ruzzenente, A.; Bassi, C.; Guglielmi, A. et al. (2015): Intrahepatic, peri-hilar and distal cholangiocarcinoma: Three different locations of the same tumor or three different tumors? In: *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 41 (9), S. 1162–1169. DOI: 10.1016/j.ejso.2015.05.013.
28. Everhart, James E.; Ruhl, Constance E. (2009): Burden of digestive diseases in the United States Part III: Liver, biliary tract, and pancreas. In: *Gastroenterology* 136 (4), S. 1134–1144. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.02.038.
29. Fábrega-Foster, Kelly; Ghasabeh, Mounes Aliyari; Pawlik, Timothy M.; Kamel, Ihab R. (2017): Multimodality imaging of intrahepatic cholangiocarcinoma. In: *Hepatobiliary surgery and nutrition* 6 (2), S. 67–78. DOI: 10.21037/hbsn.2016.12.10.
30. Fan, Zhen; van de Rijn, Matt; Montgomery, Kelli; Rouse, Robert V. (2003): Hep Par 1 Antibody Stain for the Differential Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma: 676 Tumors Tested Using Tissue Microarrays and Conventional Tissue Sections. In: *Modern Pathology* 16 (2), S. 137–144. DOI: 10.1097/01.MP.0000052103.13730.20.
31. Gabashvili, A. N.; Baklaushev, V. P.; Grinenko, N. F.; Mel'nikov, P. A.; Cherepanov, S. A.; Levinsky, A. B.; Chehonin, V. P. (2016): Antitumor Activity of Rat Mesenchymal Stem Cells during Direct or Indirect Co-Culturing with C6 Glioma Cells. In: *Bulletin of experimental biology and medicine* 160 (4), S. 519–524. DOI: 10.1007/s10517-016-3211-y.
32. Gamba, S.; Zhao, Y.; Zhao, L.; Wang, Y.; Schwarz, B.; Primo, S. et al. (2015): Bedeutung mesenchymaler Stammzellen in der Viszeralmedizin. In: *Zentralblatt für Chirurgie* 140 (3), S. 294–303. DOI: 10.1055/s-0032-1328561.
33. Geramizadeh, Bitá; Seirfar, Nasibe (2015): Diagnostic Value of Arginase-1 and Glypican-3 in Differential Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma, Cholangiocarcinoma and Metastatic Carcinoma of Liver. In: *Hepat Mon* 15 (6). DOI: 10.5812/hepatmon30336v2.
34. Ghosh, Sumit (2019): Cisplatin: The first metal based anticancer drug. In: *Bioorganic chemistry*, S. 102925. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.102925.
35. Guro, Hanisah; Kim, Jin Won; Choi, YoungRok; Cho, Jai Young; Yoon, Yoo-Seok; Han, Ho-Seong (2017): Multidisciplinary management of intrahepatic cholangiocarcinoma: Current approaches. In: *Surgical oncology* 26 (2), S. 146–152. DOI: 10.1016/j.suronc.2017.03.001.
36. Haga, Hiroaki; Yan, Irene K.; Takahashi, Kenji; Wood, Joseph; Zubair, Abba; Patel, Tushar (2015): Tumour cell-derived extracellular vesicles interact with mesenchymal stem cells to modulate the microenvironment and enhance cholangiocarcinoma growth. In: *Journal of extracellular vesicles* 4, S. 24900.
37. Hahn, Thomas von; Ciesek, Sandra; Wegener, Gerd; Plentz, Ruben R.; Weismuller, Tobias J.; Wedemeyer, Heiner et al. (2011): Epidemiological trends in incidence and mortality of hepatobiliary cancers in Germany. In: *Scandinavian journal of gastroenterology* 46 (9), S. 1092–1098. DOI: 10.3109/00365521.2011.589472.
38. Hong, In-Sun; Lee, Hwa-Yong; Kang, Kyung-Sun (2014): Mesenchymal stem cells and cancer: friends or enemies? In: *Mutation research* 768, S. 98–106. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2014.01.006.
39. Hoyos, Sergio; Navas, Maria-Cristina; Restrepo, Juan-Carlos; Botero, Rafael Claudino (2018): Current controversies in cholangiocarcinoma. In: *Biochimica et biophysica acta*.

- Molecular basis of disease* 1864 (4 Pt B), S. 1461–1467. DOI: 10.1016/j.bbadis.2017.07.027.
40. Kambakamba, Patryk; Linecker, Michael; Slankamenac, Ksenija; DeOliveira, Michelle L. (2015): Lymph node dissection in resectable perihilar cholangiocarcinoma: a systematic review. In: *American journal of surgery* 210 (4), S. 694–701. DOI: 10.1016/j.amjsurg.2015.05.015.
 41. Karnoub, Antoine E.; Dash, Ajeeta B.; Vo, Annie P.; Sullivan, Andrew; Brooks, Mary W.; Bell, George W. et al. (2007): Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. In: *Nature* 449 (7162), S. 557–563. DOI: 10.1038/nature06188.
 42. Khakoo, Aarif Y.; Pati, Shibani; Anderson, Stasia A.; Reid, William; Elshal, Mohamed F.; Rovira, Ilsa I. et al. (2006): Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. In: *The Journal of experimental medicine* 203 (5), S. 1235–1247. DOI: 10.1084/jem.20051921.
 43. Khalid, Ayesha; Wolfram, Joy; Ferrari, Ilaria; Mu, Chaofeng; Mai, Junhua; Yang, Zhizhou et al. (2015): Recent Advances in Discovering the Role of CCL5 in Metastatic Breast Cancer. In: *Mini reviews in medicinal chemistry* 15 (13), S. 1063–1072.
 44. Khan, S. A.; Davidson, B. R.; Goldin, R.; Pereira, S. P.; Rosenberg, W. M. C.; Taylor-Robinson, S. D. et al. (2002): Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma. Consensus document. In: *Gut* 51 (Supplement 6), vi1-vi9. DOI: 10.1136/gut.51.suppl_6.vi1.
 45. Khan, S. A.; Davidson, B. R.; Goldin, R. D.; Heaton, N.; Karani, J.; Pereira, S. P. et al. (2012a): Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. In: *Gut* 61 (12), S. 1657–1669. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-301748.
 46. Khan, Shahid A.; Emadossadaty, Shireen; Ladep, Nimzing G.; Thomas, Howard C.; Elliott, Paul; Taylor-Robinson, Simon D.; Toledano, Mireille B. (2012b): Rising trends in cholangiocarcinoma: is the ICD classification system misleading us? In: *Journal of hepatology* 56 (4), S. 848–854. DOI: 10.1016/j.jhep.2011.11.015.
 47. Khan, Shahid A.; Tavolari, Simona; Brandi, Giovanni (2019): Cholangiocarcinoma. Epidemiology and risk factors. In: *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 39 Suppl 1, S. 19–31. DOI: 10.1111/liv.14095.
 48. Kidd, Shannon; Spaeth, Erika; Dembinski, Jennifer L.; Dietrich, Martin; Watson, Keri; Klopp, Ann et al. (2009): Direct Evidence of Mesenchymal Stem Cell Tropism for Tumor and Wounding Microenvironments Using In Vivo Bioluminescent Imaging. In: *Stem Cells* 27 (10), S. 2614–2623. DOI: 10.1002/stem.187.
 49. Kim, Nayoun; Cho, Seok-Goo (2013): Clinical applications of mesenchymal stem cells. In: *The Korean journal of internal medicine* 28 (4), S. 387–402. DOI: 10.3904/kjim.2013.28.4.387.
 50. Kirstein, Martha M.; Vogel, Arndt (2016): Epidemiology and Risk Factors of Cholangiocarcinoma. In: *Visceral medicine* 32 (6), S. 395–400. DOI: 10.1159/000453013.
 51. Klein, Reinhard; Ruttkowski, Bärbel; Knapp, Elzbieta; Salmons, Brian; Günzburg, Walter H.; Hohenadl, Christine (2006): WPRE-mediated enhancement of gene expression is promoter and cell line specific. In: *Gene* 372, S. 153–161. DOI: 10.1016/j.gene.2005.12.018.
 52. Klempnauer, J.; Ridder, G. J.; Wasielewski, R. von; Werner, M.; Weimann, A.; Pichlmayr, R. (1997): Resectional surgery of hilar cholangiocarcinoma: a multivariate analysis of prognostic factors. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 15 (3), S. 947–954. DOI: 10.1200/JCO.1997.15.3.947.

53. Ko, Kwang Suk; Peng, Jian; Yang, Heping (2013): Animal models of cholangiocarcinoma. In: *Current opinion in gastroenterology* 29 (3), S. 312–318. DOI: 10.1097/MOG.0b013e32835d6a3e.
54. Lai, Guan-Hua; Zhang, Zichen; Shen, Xue-Ning; Ward, Deanna J.; Dewitt, Jennifer L.; Holt, Shawn E. et al. (2005): erbB-2/neu transformed rat cholangiocytes recapitulate key cellular and molecular features of human bile duct cancer. In: *Gastroenterology* 129 (6), S. 2047–2057. DOI: 10.1053/j.gastro.2005.10.010.
55. Le Naour, A.; Couderc, B. (2017): Role of MSCs in Antitumor Drug Resistance. In: Marcela F. Bolontrade (Hg.): *Mesenchymal stromal cells as tumor stromal modulators*. Amsterdam, [Netherlands]: Academic Press, S. 295–333.
56. Liechty, K. W.; MacKenzie, T. C.; Shaaban, A. F.; Radu, A.; Moseley, A. M.; Deans, R. et al. (2000): Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. In: *Nature medicine* 6 (11), S. 1282–1286. DOI: 10.1038/81395.
57. Lin, Weiping; Huang, Linfeng; Li, Ying; Fang, Bin; Li, Gang; Chen, Leilei; Xu, Liangliang (2019): Mesenchymal Stem Cells and Cancer. Clinical Challenges and Opportunities. In: *BioMed research international* 2019, S. 2820853. DOI: 10.1155/2019/2820853.
58. Low, Jun How; Ramdas, Premdass; Radhakrishnan, Ammu Kutty (2015): Modulatory effects of mesenchymal stem cells on leucocytes and leukemic cells: A double-edged sword? In: *Blood cells, molecules & diseases* 55 (4), S. 351–357. DOI: 10.1016/j.bcmed.2015.07.017.
59. Lutz, Thomas A.; Bueter, Marco (2016): The Use of Rat and Mouse Models in Bariatric Surgery Experiments. In: *Frontiers in nutrition* 3, S. 25. DOI: 10.3389/fnut.2016.00025.
60. Mahadevan, Anand; Dagoglu, Nergiz; Mancias, Joseph; Raven, Kristin; Khwaja, Khalid; Tseng, Jennifer F. et al. (2015): Stereotactic Body Radiotherapy (SBRT) for Intrahepatic and Hilar Cholangiocarcinoma. In: *Journal of Cancer* 6 (11), S. 1099–1104. DOI: 10.7150/jca.13032.
61. Malka, David; Cervera, Pascale; Foulon, Stéphanie; Trarbach, Tanja; La Fouchardière, Christelle de; Boucher, Eveline et al. (2014): Gemcitabine and oxaliplatin with or without cetuximab in advanced biliary-tract cancer (BINGO). A randomised, open-label, non-comparative phase 2 trial. In: *The Lancet Oncology* 15 (8), S. 819–828. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70212-8.
62. Mao, Zhi-yuan; Guo, Xiao-chuan; Su, Dan; Wang, Li-jie; Zhang, Ting-ting; Bai, Li (2015): Prognostic Factors of Cholangiocarcinoma After Surgical Resection: A Retrospective Study of 293 Patients. In: *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 21, S. 2375–2381. DOI: 10.12659/MSM.893586.
63. Melzer, Catharina; Ohe, Juliane von der; Hass, Ralf (2018): MSC stimulate ovarian tumor growth during intercellular communication but reduce tumorigenicity after fusion with ovarian cancer cells. In: *Cell communication and signaling : CCS* 16 (1), S. 67. DOI: 10.1186/s12964-018-0279-1.
64. Miyagiwa M (1989): A new human cholangiocellular carcinoma cell line (HuCC-T1) producing carbohydrate antigen 19/9 in serum-free medium. In: *In Vitro Cell Dev Biol.*, S. 503–510.
65. Moehler, M.; Maderer, A.; Schimanski, C.; Kanzler, S.; Denzer, U.; Kolligs, F. T. et al. (2014): Gemcitabine plus sorafenib versus gemcitabine alone in advanced biliary tract cancer. A double-blind placebo-controlled multicentre phase II AIO study with biomarker and serum programme. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 50 (18), S.

- 3125–3135. DOI: 10.1016/j.ejca.2014.09.013.
66. Moniri, M. R.; Dai, L-J; Warnock, G. L. (2014): The challenge of pancreatic cancer therapy and novel treatment strategy using engineered mesenchymal stem cells. In: *Cancer gene therapy* 21 (1), S. 12–23. DOI: 10.1038/cgt.2013.83.
67. Mosconi, Stefania; Beretta, Giordano D.; Labianca, Roberto; Zampino, Maria G.; Gatta, Gemma; Heinemann, Volker (2009): Cholangiocarcinoma. In: *Critical reviews in oncology/hematology* 69 (3), S. 259–270. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2008.09.008.
68. Nakanuma, Yasuni; Kakuda, Yuko (2015): Pathologic classification of cholangiocarcinoma: New concepts. In: *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 29 (2), S. 277–293. DOI: 10.1016/j.bpg.2015.02.006.
69. Nakeeb, A.; Pitt, H. A.; Sohn, T. A.; Coleman, J.; Abrams, R. A.; Piantadosi, S. et al. (1996): Cholangiocarcinoma. A spectrum of intrahepatic, perihilar, and distal tumors. In: *Annals of surgery* 224 (4), 463-73; discussion 473-5.
70. Neuhaus, P.; Thelen, A. (2008): Radical surgery for right-sided klatskin tumor. In: *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 10 (3), S. 171–173. DOI: 10.1080/13651820801992708.
71. Neumann, Ulf P.; Schmeding, Maximilian (2015): Role of surgery in cholangiocarcinoma: From resection to transplantation. In: *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 29 (2), S. 295–308. DOI: 10.1016/j.bpg.2015.02.007.
72. Niess, Hanno; Bao, Qi; Conrad, Claudius; Zischek, Christoph; Notohamiprodjo, Mike; Schwab, Felix et al. (2011): Selective targeting of genetically engineered mesenchymal stem cells to tumor stroma microenvironments using tissue-specific suicide gene expression suppresses growth of hepatocellular carcinoma. In: *Annals of surgery* 254 (5), S. 767. DOI: 10.1097/SLA.0b013e3182368c4f.
73. Niess, Hanno; Einem, Jobst C. von; Thomas, Michael N.; Michl, Marlies; Angele, Martin K.; Huss, Ralf et al. (2015): Treatment of advanced gastrointestinal tumors with genetically modified autologous mesenchymal stromal cells (TREAT-ME1). Study protocol of a phase I/II clinical trial. In: *BMC cancer* 15 (1), S. 9. DOI: 10.1186/s12885-015-1241-x.
74. Patel, Janaki; Rizk, Nada; Kahaleh, Michel (2015): Role of photodynamic therapy and intraductal radiofrequency ablation in cholangiocarcinoma. In: *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 29 (2), S. 309–318. DOI: 10.1016/j.bpg.2015.02.008.
75. Pinter, Matthias; Sieghart, Wolfgang; Reisegger, Michael; Wrba, Friedrich; Peck-Radosavljevic, Markus (2011): Sorafenib in unresectable intrahepatic cholangiocellular carcinoma. A case report. In: *Wiener klinische Wochenschrift* 123 (1-2), S. 61–64. DOI: 10.1007/s00508-010-1522-y.
76. Pittenger, M. F. (1999): Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. In: *Science* 284 (5411), S. 143–147. DOI: 10.1126/science.284.5411.143.
77. Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D. et al. (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 284 (5411), S. 143–147.
78. Powell, Sara Kathleen; Rivera-Soto, Ricardo; Gray, Steven James (2015): Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity and expression in gene therapy. In: *Discovery medicine* 19 (102), S. 49–57.
79. Qiao, Ling; Xu, Zhili; Zhao, Tiejun; Zhao, Zhigang; Shi, Mingxia; Zhao, Robert C. et al. (2008): Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. In: *Cell research* 18 (4), S. 500–507. DOI: 10.1038/cr.2008.40.

80. Quail, Daniela F.; Joyce, Johanna A. (2013): Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. In: *Nat Med* 19 (11), S. 1423–1437. DOI: 10.1038/nm.3394.
81. Razumilava, Nataliya; Gores, Gregory J. (2011): Combination of gemcitabine and cisplatin for biliary tract cancer: a platform to build on. In: *Journal of hepatology* 54 (3), S. 577–578. DOI: 10.1016/j.jhep.2010.10.010.
82. Razumilava, Nataliya; Gores, Gregory J. (2014): Cholangiocarcinoma. In: *The Lancet* 383 (9935), S. 2168–2179. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)61903-0.
83. Rhee, Ki-Jong; Lee, Jong; Eom, Young (2015): Mesenchymal Stem Cell-Mediated Effects of Tumor Support or Suppression. In: *IJMS* 16 (12), S. 30015–30033. DOI: 10.3390/ijms161226215.
84. Rizvi, Sumera; Gores, Gregory J. (2013): Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma. In: *Gastroenterology* 145 (6), S. 1215–1229. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.10.013.
85. Rizvi, Sumera; Khan, Shahid A.; Hallemeier, Christopher L.; Kelley, Robin K.; Gores, Gregory J. (2018): Cholangiocarcinoma - evolving concepts and therapeutic strategies. In: *Nature reviews. Clinical oncology* 15 (2), S. 95–111. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.157.
86. Roodhart, Jeanine M.L.; Daenen, Laura G.M.; Stigter, Edwin C.A.; Prins, Henk-Jan; Gerrits, Johan; Houthuijzen, Julia M. et al. (2011): Mesenchymal Stem Cells Induce Resistance to Chemotherapy through the Release of Platinum-Induced Fatty Acids. In: *Cancer Cell* 20 (3), S. 370–383. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.08.010.
87. Rosen, Charles B.; Darwish Murad, Sarwa; Heimbach, Julie K.; Nyberg, Scott L.; Nagorney, David M.; Gores, Gregory J. (2012): Neoadjuvant therapy and liver transplantation for hilar cholangiocarcinoma: is pretreatment pathological confirmation of diagnosis necessary? In: *Journal of the American College of Surgeons* 215 (1), 31-8; discussion 38-40. DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2012.03.014.
88. Saborowski, Anna; Saborowski, Michael; Davare, Monika A.; Druker, Brian J.; Klimstra, David S.; Lowe, Scott W. (2013): Mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma validates FIG-ROS as a potent fusion oncogene and therapeutic target. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (48), S. 19513–19518. DOI: 10.1073/pnas.1311707110.
89. Saha, Supriya K.; Zhu, Andrew X.; Fuchs, Charles S.; Brooks, Gabriel A. (2016): Forty-Year Trends in Cholangiocarcinoma Incidence in the U.S. Intrahepatic Disease on the Rise. In: *The oncologist* 21 (5), S. 594–599. DOI: 10.1634/theoncologist.2015-0446.
90. Sahai, Puja; Kumar, Senthil (2017): External radiotherapy and brachytherapy in the management of extrahepatic and intrahepatic cholangiocarcinoma: available evidence. In: *The British journal of radiology*, S. 20170061. DOI: 10.1259/bjr.20170061.
91. Sapisochín, Gonzalo; Fernández de Sevilla, Elena; Echeverri, Juan; Charco, Ramón (2015): Liver transplantation for cholangiocarcinoma: Current status and new insights. In: *World journal of hepatology* 7 (22), S. 2396–2403. DOI: 10.4254/wjh.v7.i22.2396.
92. Schweizer, Michael T.; Wang, Hao; Bivalacqua, Trinity J.; Partin, Alan W.; Lim, Su Jin; Chapman, Carolyn et al. (2019): A Phase I Study to Assess the Safety and Cancer-Homing Ability of Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Men with Localized Prostate Cancer. In: *Stem cells translational medicine* 8 (5), S. 441–449. DOI: 10.1002/sctm.18-0230.
93. Serakinci, Nedime; Fahrioglu, Umut; Christensen, Rikke (2014): Mesenchymal stem cells, cancer challenges and new directions. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 50 (8), S. 1522–1530. DOI: 10.1016/j.ejca.2014.02.011.

94. Shaib, Yasser; El-Serag, Hashem B. (2004): The epidemiology of cholangiocarcinoma. In: *Seminars in liver disease* 24 (2), S. 115–125. DOI: 10.1055/s-2004-828889.
95. Shultz, Leonard D.; Goodwin, Neal; Ishikawa, Fumihiko; Hosur, Vishnu; Lyons, Bonnie L.; Greiner, Dale L. (2014): Human cancer growth and therapy in immunodeficient mouse models. In: *Cold Spring Harbor protocols* 2014 (7), S. 694–708. DOI: 10.1101/pdb.top073585.
96. Sia, D.; Tovar, V.; Moeini, A.; Llovet, J. M. (2013): Intrahepatic cholangiocarcinoma: pathogenesis and rationale for molecular therapies. In: *Oncogene* 32 (41), S. 4861–4870. DOI: 10.1038/onc.2012.617.
97. Silva, G. V. (2005): Mesenchymal Stem Cells Differentiate into an Endothelial Phenotype, Enhance Vascular Density, and Improve Heart Function in a Canine Chronic Ischemia Model. In: *Circulation* 111 (2), S. 150–156. DOI: 10.1161/01.CIR.0000151812.86142.45.
98. Sirica, Alphonse E.; Zhang, Zichen; Lai, Guan-Hua; Asano, Toru; Shen, Xue-Ning; Ward, Deanna J. et al. (2008): A novel "patient-like" model of cholangiocarcinoma progression based on bile duct inoculation of tumorigenic rat cholangiocyte cell lines. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 47 (4), S. 1178–1190. DOI: 10.1002/hep.22088.
99. Songserm, Nopparat; Promthet, Supanee; Sithithaworn, Paiboon; Pientong, Chamsai; Ekalaksananan, Tipaya; Chopjitt, Peechanika; Parkin, Donald Maxwell (2012): Risk factors for cholangiocarcinoma in high-risk area of Thailand. Role of lifestyle, diet and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. In: *Cancer epidemiology* 36 (2), e89-94. DOI: 10.1016/j.canep.2011.11.007.
100. Spaeth, Erika L.; Dembinski, Jennifer L.; Sasser, A. Kate; Watson, Keri; Klopp, Ann; Hall, Brett et al. (2009): Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. In: *PLoS one* 4 (4), e4992. DOI: 10.1371/journal.pone.0004992.
101. Sriamporn, S.; Pisani, P.; Pipitgool, V.; Suwanrungruang, K.; Kamsa-ard, S.; Parkin, D. M. (2004): Prevalence of *Opisthorchis viverrini* infection and incidence of cholangiocarcinoma in Khon Kaen, Northeast Thailand. In: *Tropical medicine & international health : TM & IH* 9 (5), S. 588–594. DOI: 10.1111/j.1365-3156.2004.01234.x.
102. Strumberg, Dirk (2005): Preclinical and clinical development of the oral multikinase inhibitor sorafenib in cancer treatment. In: *Drugs of today (Barcelona, Spain : 1998)* 41 (12), S. 773–784. DOI: 10.1358/dot.2005.41.12.937959.
103. Studeny, M.; Marini, F. C.; Dembinski, J. L.; Zompetta, C.; Cabreira-Hansen, M.; Bekele, B. N. et al. (2004): Mesenchymal Stem Cells. Potential Precursors for Tumor Stroma and Targeted-Delivery Vehicles for Anticancer Agents. In: *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 96 (21), S. 1593–1603. DOI: 10.1093/jnci/djh299.
104. Suarez-Munoz, Miguel Angel; Fernandez-Aguilar, Jose Luis; Sanchez-Perez, Belinda; Perez-Daga, Jose Antonio; Garcia-Albiach, Beatriz; Pulido-Roa, Ysabel et al. (2013): Risk factors and classifications of hilar cholangiocarcinoma. In: *World journal of gastrointestinal oncology* 5 (7), S. 132–138. DOI: 10.4251/wjgo.v5.i7.132.
105. Sun, Zhao; Wang, Shihua; Zhao, Robert (2014): The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. In: *J Hematol Oncol* 7 (1), S. 14. DOI: 10.1186/1756-8722-7-14.
106. Tanaka, Toshiyuki; Bai, Zhongbin; Srinoulprasert, Yuttana; Yang, Bo-Gie; Yang, Bogi; Hayasaka, Haruko; Miyasaka, Masayuki (2005): Chemokines in tumor progression and metastasis. In: *Cancer science* 96 (6), S. 317–322. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2005.00059.x.

107. Toyota, Yuka; Iwama, Hisakazu; Kato, Kiyohito; Tani, Joji; Katsura, Akiko; Miyata, Miwa et al. (2015): Mechanism of gemcitabine-induced suppression of human cholangiocellular carcinoma cell growth. In: *International journal of oncology*, S. 1293–1302. DOI: 10.3892/ijo.2015.3118.
108. Tsai, Kuo-Shu; Yang, Shung-Haur; Lei, Yen-Ping; Tsai, Chih-Chien; Chen, Hsin-Wei; Hsu, Chih-Yuan et al. (2011a): Mesenchymal Stem Cells Promote Formation of Colorectal Tumors in Mice. In: *Gastroenterology* 141 (3), S. 1046–1056. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.05.045.
109. Tsai, Kuo-Shu; Yang, Shung-Haur; Lei, Yen-Ping; Tsai, Chih-Chien; Chen, Hsin-Wei; Hsu, Chih-Yuan et al. (2011b): Mesenchymal Stem Cells Promote Formation of Colorectal Tumors in Mice. In: *Gastroenterology* 141 (3), S. 1046–1056. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.05.045.
110. Tyson, Gia L.; El-Serag, Hashem B. (2011): Risk factors for cholangiocarcinoma. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 54 (1), S. 173–184. DOI: 10.1002/hep.24351.
111. Uchibori, Ryosuke; Tsukahara, Tomonori; Mizuguchi, Hiroyuki; Saga, Yasushi; Urabe, Masashi; Mizukami, Hiroaki et al. (2013): NF- κ B activity regulates mesenchymal stem cell accumulation at tumor sites. In: *Cancer research* 73 (1), S. 364–372. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0088.
112. Uchibori, Ryosuke; Tsukahara, Tomonori; Ohmine, Ken; Ozawa, Keiya (2014): Cancer gene therapy using mesenchymal stem cells. In: *International journal of hematology* 99 (4), S. 377–382. DOI: 10.1007/s12185-014-1537-7.
113. Uenishi, T.; Kubo, S.; Hirohashi, K.; Tanaka, H.; Shuto, T.; Yamamoto, T.; Nishiguchi, S. (2003): Cytokeratin-19 fragments in serum (CYFRA 21-1) as a marker in primary liver cancer. In: *British journal of cancer* 88 (12), S. 1894–1899. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601026.
114. Ustundag, Yucel (2008): Cholangiocarcinoma. A compact review of the literature. In: *WJG* 14 (42), S. 6458. DOI: 10.3748/wjg.14.6458.
115. Ustundag, Yucel; Bayraktar, Yusuf (2008): Cholangiocarcinoma: a compact review of the literature. In: *World journal of gastroenterology* 14 (42), S. 6458–6466.
116. Valle, Juan; Wasan, Harpreet; Palmer, Daniel H.; Cunningham, David; Anthony, Alan; Maraveyas, Anthony et al. (2010): Cisplatin plus gemcitabine versus gemcitabine for biliary tract cancer. In: *The New England journal of medicine* 362 (14), S. 1273–1281. DOI: 10.1056/NEJMoa0908721.
117. Wang, Yue; Duan, Boshi; Yan, Lihui; Shen, Chunjian; Wu, Bo; Luo, Ji et al. (2014): Long-term outcome after surgical resection for cholangiocarcinoma and prognostic index value. In: *The surgeon : journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland*. DOI: 10.1016/j.surge.2014.05.003.
118. Wang, Yue; Yang, Helen; Shen, Chunjian; Luo, Ji (2015a): Cholangiocarcinoma: prognostic factors after surgical resection in China. In: *International journal of clinical and experimental medicine* 8 (4), S. 5506–5512.
119. Wang, Yue; Yang, Helen; Shen, Chunjian; Luo, Ji (2015b): Surgical procedure and long-term survival of hilar cholangiocarcinoma. In: *International journal of clinical and experimental medicine* 8 (1), S. 1122–1128.
120. Welzel, Tania M.; McGlynn, Katherine A.; Hsing, Ann W.; O'Brien, Thomas R.; Pfeiffer, Ruth M. (2006): Impact of classification of hilar cholangiocarcinomas (Klatskin tumors) on the incidence of intra- and extrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. In: *Journal of the National Cancer Institute* 98 (12), S. 873–875. DOI: 10.1093/jnci/djj234.

121. Wongkajornsilp, Adisak; Somchitprasert, Theera; Butraporn, Raywadee; Wamanuttajinda, Valla; Kasetsinsombat, Kanda; Huabprasert, Sukit et al. (2009): Human Cytokine-Induced Killer Cells Specifically Infiltrated and Retarded the Growth of the Inoculated Human Cholangiocarcinoma Cells in SCID Mice. In: *Cancer Investigation* 27 (2), S. 140–148. DOI: 10.1080/07357900802189832.
122. Wu, Xiao-Bing; Liu, Yang; Wang, Gui-Hua; Xu, Xiao; Cai, Yang; Wang, Hong-Yi et al. (2016): Mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through AMPK/mTOR-mediated NF- κ B activation. In: *Sci. Rep.* 6, S. 21420. DOI: 10.1038/srep21420.
123. Xu, Wen-ting; Bian, Zhen-yu; Fan, Qi-ming; Li, Gang; Tang, Ting-ting (2009): Human mesenchymal stem cells (hMSCs) target osteosarcoma and promote its growth and pulmonary metastasis. In: *Cancer Letters* 281 (1), S. 32–41. DOI: 10.1016/j.canlet.2009.02.022.
124. Yang, Linda; Shan, Jocelyn; Shan, Leonard; Saxena, Akshat; Bester, Lourens; Morris, David L. (2015): Trans-arterial embolisation therapies for unresectable intrahepatic cholangiocarcinoma: a systematic review. In: *Journal of gastrointestinal oncology* 6 (5), S. 570–588. DOI: 10.3978/j.issn.2078-6891.2015.055.
125. Zhang, Zichen; Oyesanya, Regina A.; Campbell, Deanna J. W.; Almenara, Jorge A.; Dewitt, Jennifer L.; Sirica, Alphonse E. (2010): Preclinical assessment of simultaneous targeting of epidermal growth factor receptor (ErbB1) and ErbB2 as a strategy for cholangiocarcinoma therapy. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 52 (3), S. 975–986. DOI: 10.1002/hep.23773.
126. Zhu, Andrew X. (2015): Future directions in the treatment of cholangiocarcinoma. In: *Best practice & research. Clinical gastroenterology* 29 (2), S. 355–361. DOI: 10.1016/j.bpg.2015.02.010.
127. Zhu, Wei; Xu, Wenrong; Jiang, Runqiu; Qian, Hui; Chen, Miao; Hu, Jiabo et al. (2006): Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. In: *Experimental and Molecular Pathology* 80 (3), S. 267–274. DOI: 10.1016/j.yexmp.2005.07.004.
128. Zhu, Yan-Jing; Zheng, Bo; Wang, Hong-Yang; Chen, Lei (2017): New knowledge of the mechanisms of sorafenib resistance in liver cancer. In: *Acta pharmacologica Sinica* 38 (5), S. 614–622. DOI: 10.1038/aps.2017.5.
129. Zischek, Christoph; Niess, Hanno; Ischenko, Ivan; Conrad, Claudius; Huss, Ralf; Jauch, Karl-Walter et al. (2009): Targeting tumor stroma using engineered mesenchymal stem cells reduces the growth of pancreatic carcinoma. In: *Annals of surgery* 250 (5), S. 747–753. DOI: 10.1097/SLA.0b013e3181bd62d0.

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klinikalgorithmus der hMSC-Therapie (Abkürzungen: HSV-TK: Herpes-Simplex Thymidinkinase, hMSC: humane mesenchymale Stammzellen, KMP: Knochenmarkpunktion) - 17 -	
Abbildung 2: Prinzip der genetisch veränderten hMSC zur Tumorthherapie (Abkürzungen: MSC: mesenchymale Stammzellen, HSV-TK: Herpes-Simplex-Thymidinkinase, CCL-5: Chemokine C-C motif ligand 5).....	- 18 -
Abbildung 3: Arbeitsübersicht	- 20 -
Abbildung 4: Injektion der Tumorzellen in den exponierten Leberlappen.....	- 21 -
Abbildung 5: Beispiel der Oil-Red-Färbung nach adipogener Differenzierung.....	- 24 -
Abbildung 6: Beispiel FACS gestützter Nachweis der markierten hMSCs.....	- 25 -
Abbildung 7: Vektor in msc_Apceth_101 (nach Niess et al. 2015).....	- 30 -
Abbildung 8: Entwicklung des Körpergewichts sowie des Tumor- und Lebergewichts der Mäuse im Versuchszeitraum	- 42 -
Abbildung 9: PCR-Analyse des Lungen- und Tumorgewebes	- 43 -
Abbildung 10: Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung, Zytokeratin-7-(CK-7) -Färbung, Hepatozytenspezifisches-Antigen-1 (HepPar-1)-Färbung.....	- 44 -
Abbildung 11: Links HE-Färbung Lungengewebe mit einer Metastase, rechts Lebergewebe (jeweils 100 x Vergrößerung)	- 44 -
Abbildung 12 links: KI-67-Färbung	- 45 -
Abbildung 13 rechts: CD31-Färbung.....	- 45 -
Abbildung 14: Entwicklung des Körpergewichts sowie Tumor- und Lebergewicht.....	- 45 -
Abbildung 15: Tumor- und Lebervolumen der Versuchstiere, Kontrolle: Keine hMSC-Therapie, Behandelt: Mit hMSC-Therapie.....	- 46 -
Abbildung 16: Übersicht der makroskopischen Tumor-Leberpräparate und Sonografiebilder....	- 47 -
Abbildung 17: von Aszites betroffene Mäuse, Kontrolle: Keine hMSC Therapie, Behandelt: Mit hMSC Therapie	- 48 -
Abbildung 18 links: Primärtumor	- 48 -
Abbildung 19 rechts: Lungenmetastase (Pfeilmarkierung)	- 48 -
Abbildung 20 links: hMSCs-Nachweis im Lungengewebe (B 400x Vergrößerung).....	- 49 -
Abbildung 21 rechts: hMSCs-Nachweis im Lungengewebe (A 200x Vergrößerung).....	- 49 -
Abbildung 22 links: CD31-Färbung des Tumorgewebes.....	- 50 -
Abbildung 23 rechts: KI-67-Färbung des Tumorgewebes.....	- 50 -
Abbildung 24 links: Anreicherung der CMTPX red markierten hMSCs im Bereich einer Lungenmetastase.....	- 50 -
Abbildung 25 rechts: DAPI-Färbung des Lungengewebes und Nachweis der mit CMTPX red markierten hMSCs	- 50 -
Abbildung 26: Proliferation von CL-6 und HuCCT-1 sowie die Auswirkung von Cisplatin, Gemcitabine und Sorafenib.....	- 51 -
Abbildung 27: Auswirkung von hMSC-Überstand auf das Zellwachstum von CL-6 und HuCCT-1 ..	- 52 -
Abbildung 28: Zunahme der Resistenz der Tumorzelllinien CL-6 und HuCCT-1 aufgrund einer Vorbehandlung mit hMSC-Überstand in Abhängigkeit unterschiedlicher Cisplatin-Konzentrationen-	- 53 -
Abbildung 29: Zunahme der Resistenz von CL-6 und HuCCT-1 gegenüber Gemcitabin, nach der Behandlung mit hMSC-Überstand.....	- 53 -
Abbildung 30: Einfluss der Vorbehandlung von CL-6 und HuCCT-1 mit hMSC-Überstand auf die Wirkung von Sorafenib	- 54 -
Abbildung 31: Adhäsion von hMSCs an CL-6 u. HuCCT-1	- 54 -
Abbildung 32: hMSCs Adhäsion an CL-6- und HuCCT-1	- 55 -
Abbildung 33: Transmigration von hMSCs zum Tumorzellüberstand von CL-6 und HuCCT-1 .	- 56 -

12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tumorinduktion durch CL-6	- 22 -
Tabelle 2: Primer und Sonde zum WPRE-Nachweis	- 31 -
Tabelle 3: Medien für hMSC Differenzierung	- 36 -
Tabelle 4: hMSC Applikation und Opferung Zyklus 1	- 41 -
Tabelle 5: Score der Lungenmetastasen (LM im ausgewählten Abschnitt: +: 1, ++: 2, +++: 3 und mehr)	- 49 -

13 Danksagungen

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten

14 Ehrenerklärung

Ich Arvid Sen Gupta erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Entwicklung eines orthotopen NOD/SCID-Mausmodells zur Untersuchung des Cholangiokarzinoms und einer möglichen Therapie mit genetisch veränderten mesenchymalen Stammzellen“

in der Klinik für Universitätsklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie
mit Unterstützung durch Univ.-Prof. Dr. med. Christiane Bruns und Dr. rer. nat. Yue Zhao,

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 12.04.2021

Arvid Sen Gupta

15 Darstellung des Bildungswegs

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten