

Aus dem Lehrstuhl für
Innere Medizin I
Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Einfluss von Polyphosphat-Substraten auf das
Wachstumsverhalten humaner Tumorzelllinien als Grundlage
für die Etablierung eines innovativen Zellkulturmodells

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lazar Glisic

2021

Aus dem Lehrstuhl für
Innere Medizin I
Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Einfluss von Polyphosphat-Substraten auf das
Wachstumsverhalten humaner Tumorzelllinien als Grundlage
für die Etablierung eines innovativen Zellkulturmodells

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lazar Glisic

2021

Dekan: Prof. Dr. med. Dipl. Phys. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martina Müller-Schilling
2. Berichterstatter: PD. Dr. med. Roman Mayr
Tag der mündlichen Prüfung: 06.10.2021

Diese Arbeit widme ich meiner Oma, die 2012 an Krebs verstarb.

Discere ne cessa, cura sapientia crescat: rara datur longo prudentia temporis usu!

[Disticha catonis 4,27]

Hör nicht auf zu lernen, Wissen wächst mit dem Engagement: seltene Klugheit erlangt man
nur durch dauernden Einsatz!

Inhaltsverzeichnis	Seite
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	8
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	12
1 EINLEITUNG.....	15
1.1 Entwicklung neuer Zellkulturmodelle und deren Nutzen für die Entwicklung personalisierter Therapieansätze.....	15
1.2 Hepatozelluläres Karzinom (HCC)	15
1.2.1 Epidemiologie	15
1.2.2 Ätiologie und Karzinogenese	16
1.2.3 Staging und Therapie des HCC	19
1.3 Das Kolonkarzinom	21
1.3.1 Epidemiologie	21
1.3.2 Ätiologie	21
1.3.3 Karzinogenese	23
1.3.4 Staging und Therapie des Kolonkarzinoms.....	23
1.4 Dreidimensionale Zellkultur.....	24
1.4.1 Anwendungszwecke und Arten der 3D-Zellkultur.....	24
1.5 Bioprinting.....	25
1.5.1 Laser-Induced Forward Transfer (LIFT).....	27
1.5.2 Inkjet.....	27
1.5.3 Extrusion.....	28
1.6 Scaffolds.....	29
1.7 Anorganisches Polyphosphat (polyP)	30
1.7.1 Vorkommen	31
1.7.2 Stoffwechsellenzyme der Polyphosphate	31
1.7.3 Verschiedene Funktionen von Polyphosphaten	32
Polyphosphat als ATP-Ersatz und Energiequelle	32
Polyphosphat als Reservoir für Pi.....	33
Polyphosphat als Chelator von Metallionen	33
PolyP als Regulator für Stress und Überleben.....	34

PolyP als Entwicklungsregulator	34
1.8 Ziel des Projekts	35
2 MATERIAL UND METHODEN	36
2.1 Material.....	36
2.1.1 Geräte	36
2.1.2 Allgemeiner Laborbedarf	38
2.1.3 Reagenzien	38
2.2 Methoden	39
2.2.1 Statistik	39
2.2.2 Zellkultur	39
2.2.3 Zellernte	39
2.2.4 MTS-Analyse	40
2.2.5 Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie	40
2.2.6 Bestimmung der Zellproliferation von Hep3B-Zellen	40
3 ERGEBNISSE.....	41
3.1 Analyse der Auswirkungen der Polyphosphat-Applikation auf den Metabolismus der Hep3B- und Caco2-Zelllinien mittels MTS-Assay	41
3.2 Analyse der Auswirkungen der polyP-Applikation auf den Metabolismus der Hep3B- und Caco2-Zelllinien in glukosefreiem Medium.....	47
3.3 Analyse der Auswirkungen der Polyphosphat-Substitution auf den Zellzyklus von Hep3B- und Caco2-Zelllinie mittels FACS-basierter DAPI-Färbung	52
3.4 Analyse der Auswirkung von Polyphosphaten auf das Proliferationsverhalten der Hep3B-Zelllinie mittels FACS-basiertem CytoPainter-Proliferationsassay	57
4 DISKUSSION	60
4.1 Mögliche Anwendung von polyPs in den Sphäroid-basierten Tumormodellen.....	60
4.2 Mögliche Anwendung von polyP für Scaffold-basierte Tumor-Modelle	62
4.3 Herausforderung der Energieversorgung	62
4.4 PolyPs als Energiespeicher	64

4.5	Die Ergebnisse dieser Arbeit im Kontext der aktuellen Forschung.....	64
4.6	Ausblick	65
5	ZUSAMMENFASSUNG	66
6	LITERATURVERZEICHNIS	68
7	PUBLIKATIONSLISTE	89
8	DANKSAGUNG	90
9	CURRICULUM VITAE.....	92
10	PROMOTIONSERKLÄRUNG	93

Abkürzungsverzeichnis

AAPC	Attenuierte Familiäre Adenomatöse Polyposis
Abb.	Abbildung
ADK	Adenylatkinase
AFP	Alpha-Fetoprotein
AG	Aktiengesellschaft
anti-HGF	anti-Hepatocyte Growth Factor
ALP	Alkalische Phosphatase
AP	Arbeitspakete
APC	Adenomatöses Polyposis Coli Gen
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninic acid (2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure)
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer-Klassifikation
Bcl	B-cell lymphoma
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca	Calcium
ca.	circa
CAD	Computer Aided Design
CCL20	CC-chemokine ligand 20
CCR6	C-C-Chemokinrezeptor Typ 6
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
d	day (engl. Tag)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	deoxyribonucleic acid (engl. Desoxyribonukleinsäure)
EASL	European Association for the Study of the Liver
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
ECM	extrazellulärer Matrix
EGF	Epidermal growth factor

engl.	englisch
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FCS	fetal calf serum (engl. fetales Kälberserum)
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	hour (engl. Stunde)
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HGF	Hepatocyte growth factor
HSP90	Heat shock protein 90
IFN	Interferon
IL	Interleukin
inc	incorporated (engl. eingetragen)
IRE	Irreversible Elektroporation
JPS	Juvenile Polyposis-Syndrom
K ⁺	Kalium-Ion
kDa	Kilodalton
KG	Kommanditgesellschaft
l	Liter
lat.	lateinisch
MEM	Minimum Essential Media
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MW	Mittelwert
MWA	Mikrowellenablation
n	numerus (lat. Anzahl (unabhängiger Experimente))
Na ⁺	Natrium-Ion

ng	Nanogramm
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCL	Polycaprolactone
PD-1	Programmed-cell-death-protein 1
PD-L1	Programmed-cell-death-ligand 1
PDGF	Plateled-derived growth factor
P _i	(freigesetztes) anorganisches Phosphat
PJS	Peutz-Jeghers-Syndrom
PLLA	Poly lactide
polyP	Polyphosphat
PS	Polystyrene
PPK	Polyphosphatkinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma
RFA	Radiofrequenzablation
RNA	ribonucleic acid (engl. Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute (engl. Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s.	siehe
SA	Standardabweichung
sek	Sekunde
Sr	Strontium
STK11	Serin-Threonin-Kinase 11
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TME	Tumor-Micro-Environment
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
µg	Mikrogramm
µM	mikromolar
uv	ultraviolett
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor

WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
° C	Grad Celsius
%	Prozent

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1 Verschiedene Arten von 3D-Zellkultur-Modellen. modifiziert nach (Mazzoleni et al. 2009d).

Tab. 2. Übersicht der Eigenschaften der drei verschiedenen Arten der 3D-Bioprinting modifiziert nach (Kryou et al. 2019a)

Abb. 3. komparative Darstellung der Vor- und Nachteile der drei verschiedenen Arten der 3D-Bioprinting modifiziert nach (Kryou et al. 2019a)

Abb. 4. Schematische Darstellung des Inkjet-Bioprintings modifiziert nach (Kryou et al. 2019b)

Abb. 5. Scaffold-Arten modifiziert nach (Nikolova und Chavali 2019)

Abb. 6. Chemische Formel von Polyphosphat (eigene Darstellung)

Abb. 7. Metabolische Aktivität von Hep3B Zellen nach 3 Tagen Inkubationszeit in Gegenwart von Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (1µg/ml, 30µg/ml, 100µg/ml und 300µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienten als Kontrolle; n=3 bei MW±SA.

Abb. 8. Metabolische Aktivität von Caco2-Zellen nach 3 Tagen Inkubationszeit in Gegenwart von Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (1µg/ml, 30µg/ml, 100µg/ml und 300µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienten als Kontrolle; n=3 bei MW±SA.

Abb. 9. Metabolische Aktivität von Hep3B Zellen nach 5 Tagen Inkubationszeit in Gegenwart von Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (1µg/ml, 30µg/ml, 100µg/ml und 300µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienten als Kontrolle; n=3 bei MW±SA.

Abb. 10. Metabolische Aktivität von Caco2-Zellen nach 5 Tagen Inkubationszeit in Gegenwart von Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (1µg/ml, 30µg/ml, 100µg/ml und 300µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienten als Kontrolle; n=3 bei MW±SA.

Abb. 11. Metabolische Aktivität von Hep3B Zellen nach 7 Tagen Inkubationszeit in Gegenwart von Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (1µg/ml, 30µg/ml, 100µg/ml und 300µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienten als Kontrolle; n=3 bei MW±SA.

Abb. 12. Metabolische Aktivität von Caco2-Zellen nach 7 Tagen Inkubationszeit in Gegenwart von Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (1µg/ml, 30µg/ml, 100µg/ml und 300µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienten als Kontrolle; n=3 bei MW±SA.

Abb. 13. Metabolische Aktivität von Hep3B-Zellen nach 3 Tagen Inkubationszeit in Gegenwart von Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (30µg/ml); Die Zellen sind im normalen FCS-Medium ohne Glukose; Zellen ohne polyP-Substitution mit und ohne Glukose dienten als Kontrolle; n=3 bei MW±SA.

Abb. 14. Metabolische Aktivität von Hep3B-Zellen nach 3 Tagen Inkubationszeit in Gegenwart von Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP(30µg/ml); Zellen sind im dialysierten FCS-Medium ohne Glukose; Zellen ohne polyP-Substitution mit und ohne Glukose dienen als Kontrolle; n=3 bei MW±SA

Abb. 15. Metabolische Aktivität Caco2-Zellen nach 3 Tagen Inkubationszeit in Gegenwart von Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP(30µg/ml); Zellen sind im normalen FCS-Medium ohne Glukose; Zellen ohne polyP-Substitution dienen als Kontrolle; n=3 bei MW±SA.

Abb. 16. Metabolische Aktivität Caco2-Zellen nach 3 Tagen Inkubationszeit in Gegenwart von Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP(30µg/ml); Zellen sind im dialysierten FCS-Medium ohne Glukose; Zellen ohne polyP-Substitution dienen als Kontrolle; n=3 bei MW±SA.

Abb. 17. Rohe-FACS-Daten von Zellzyklus CaCo2-Zellen nach 9 Tagen Inkubationszeit substituiert mit Sr-polyP (Konzentration 30µg/ml); P3 stellt die Fläche, die größte Zellpopulation darstellt; Die P3-Zellpopulation befindet sich in G1-Phase des Zellzyklus.

Abb. 18. Zellzyklus Hep3B-Zellen nach 7 Tagen Inkubationszeit substituiert mit Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (Konzentration 30µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienen als Kontrolle; n=3 bei MW±SA.

Abb. 19. Zellzyklus Hep3B-Zellen nach 8 Tagen Inkubationszeit substituiert mit Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (Konzentration 30µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienen als Kontrolle; n=3 bei MW±SA.

Abb. 20. Zellzyklus Hep3B-Zellen nach 9 Tagen Inkubationszeit substituiert mit Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (Konzentration 30µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienen als Kontrolle; n=3 bei MW±SA.

Abb. 21. Zellzyklus Caco2-Zellen nach 7 Tagen Inkubationszeit substituiert mit Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (Konzentration 30µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienen als Kontrolle; n=3 bei MW±SA.

Abb. 22. Zellzyklus Caco2-Zellen nach 8 Tagen Inkubationszeit substituiert mit Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (Konzentration 30µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienen als Kontrolle; n=3 bei MW±SA.

Abb. 23. Zellzyklus Caco2-Zellen nach 9 Tagen Inkubationszeit substituiert mit Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (Konzentration 30µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienen als Kontrolle; n=3 bei MW±SA.

Abb. 24. Proliferation von Hep3B-Zellen über 5 Tage in Gegenwart von Mg-polyP; Blau, rot, grün, orange und grau zeigen die Proliferation am jeweiligen Analysetag; die Abbildung wurde mit dem Computerprogramm FlowLogic erstellt.

Abb. 25. Proliferation von Hep3B-Zellen nach Inkubationszeit bis zum 5 Tagen substituiert mit Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (Konzentration 30 μ g/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienten als Kontrolle; Analysetag 2 diente als Vergleichstag für Analysetag 3,4, und 5; n=3 bei MW \pm SA.

1 Einleitung

1.1 Entwicklung neuer Zellkulturmodelle und deren Nutzen für die Entwicklung personalisierter Therapieansätze

In der klinischen Praxis entnehmen Ärztinnen und Ärzte im Rahmen von Endoskopien und Punktionen tagtäglich Gewebeproben von Patientinnen und Patienten. Das Potential dieser entnommenen Proben bleibt jedoch meist ungenutzt.

Insbesondere onkologische und chronisch-entzündliche Erkrankungen haben häufig einen individuellen Verlauf. Sehr oft stehen verschiedene Therapieoptionen zur Verfügung. In klinischen Studien lässt sich eine Annäherung für die optimale Therapie für das Gesamtkollektiv finden, die optimale Therapiestrategie für den einzelnen Patienten ist hingegen oft nicht hinreichend untersucht. Der Erfolg der Therapie wird elementar von der individuellen Tumorgenetik, Tumorepigenetik und Tumorbiologie, aber auch individuellen Tumorumgebung (z.B. Zirrhose vs. Gesundes Lebergewebe) beeinflusst. Mittels Kultivierung der im Rahmen der Diagnostik erworbenen Gewebeproben, könnte man ein Mikromodell der Erkrankung des Patienten erstellen und verschiedene Therapiestrategien „simulieren“. Neben der Wahl der optimalen First-line-Therapie, könnte man zudem auch die erforderliche Dosis und ideale Folgetherapien festlegen. Therapie-Non-Responder könnten identifiziert werden. Dem Patienten könnten hierdurch unnötige Therapieapplikationen und unerwünschte Nebenwirkungen und dem Gesundheitssystem unnötige Kosten erspart werden.

Eine individualisierte Therapie, die unter Berücksichtigung des individuellen Immunstatus und der Mikroumgebung des zu behandelnden Tumors resultieren sollte, hätte eine viel höhere Erfolgsrate. Daher ist die Entwicklung eines innovativen *ex vitro* Tumormodells sehr wichtig und könnte helfen eine optimierte Tumorthherapie zu finden.

1.2 Hepatozelluläres Karzinom (HCC)

1.2.1 Epidemiologie

Tumorerkrankungen sind eine der häufigsten Todesursachen weltweit (Sung et al. 2021). Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) rangiert Krebs in 112 von 183 Ländern auf Platz 1 oder 2 der häufigsten Todesursachen vor dem 70. Lebensjahr und an dritter oder

vierter Stelle in weiteren 23 Ländern (Wild et al. 2020). Das Leberkarzinom ist dabei die siebthäufigste Tumorerkrankung weltweit und stellt mit 830.000 Todesfällen pro Jahr die zweithäufigste karzinombedingte Todesursache dar (Sung et al. 2021). Die höchsten Inzidenzraten für das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) findet man in Asien und Afrika (McGlynn et al. 2021).

In Europa sind Länder wie Italien, Spanien oder Griechenland mit Inzidenzraten von 10-20 Fällen pro 100.000 Personen am häufigsten betroffen (Petrick et al. 2020b). In den meisten Ländern sind die Inzidenzraten bei Männern zwei- bis viermal höher als bei Frauen (Petrick et al. 2020a; McGlynn und London 2011; YA Ghouri 2017). Die höhere Exposition von Männern gegenüber Karzinogenen wie Tabak und Alkohol, sowie der protektive Einfluss von Östrogen hinsichtlich Hepatitiden sind mögliche Hypothesen für den Geschlechtsunterschied (Sukocheva 2018; Iyer 2017; Okeke et al. 2020).

Leberkarzinome sind auch in Deutschland eine bedeutende Tumorentität. Gemäß dem Zentrum für Krebsregisterdaten kam es im Jahr 2016 in Deutschland zu 6.220 Neuerkrankungen bei Männern und zu 2.630 Neuerkrankungen bei Frauen (ZfKD 2021). In Deutschland aber auch in anderen Ländern Europas nimmt die Zahl an Neuerkrankungen zu. In den letzten 35 Jahren hat sich die Zahl der Neuerkrankungen sowohl bei Männern als auch bei Frauen verdoppelt (Heimbach et al. 2018).

Die Forschung an Leberzellkarzinomen wird in der Zukunft an Bedeutung zunehmen, da man eine Steigerung der Inzidenz insbesondere der durch die nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) induzierten Leberzellkarzinome in Industrieländern erwartet (Huang et al. 2021; Estes et al. 2018a). In Deutschland erwartet man laut einer Modellstudie von Estes und Kollegen eine Steigerung der Inzidenzraten von NAFLD induzierten HCCs um mehr als 62% (Estes et al. 2018a). Die Grundlage für diese Studie waren die Daten zur Prävalenz von Adipositas und Typ-2-Diabetes mellitus (DM) bei Erwachsenen (Estes et al. 2018a).

1.2.2 Ätiologie und Hepato-Karzinogenese

Über 90% aller HCCs entstehen in Folge einer Leberzirrhose (Bolondi und Gramantieri 2011; Mittal und El-Serag 2013). Sie ist der größte Risikofaktor für das Entstehen eines HCCs (Marrero et al. 2019; EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma 2018; DGVS S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms

2021). Ein HCC ist auch die Haupttodesursache für Patienten mit Leberzirrhose mit einer Inzidenz von 1-6% (Trinchet et al. 2015). Generell gibt es mehrere - zum Teil Länder/Regionen spezifische - Risikofaktoren, die eine Leberzirrhose und infolgedessen das Entstehen eines HCCs begünstigen. Das Hepatitis B Virus (HBV) ist weltweit die Hauptursache für das Entstehen eines HCCs und kommt verstärkt in Ländern Ostasiens und Afrikas vor, in denen es endemisch ist. Eine HBV-Infektion führt zu einem 15- bis 20-fach erhöhten Risiko für die Ausbildung eines Lebertumors. In den westlichen Industrieländern stellen die alkoholische- und die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung die wesentlichen Risikofaktoren für die Entwicklung eines HCC dar (McGlynn et al. 2021). In Europa ist Alkoholkonsum ein wichtiger Risikofaktor für Lebertumore. (Estes et al. 2018b; Ghouri et al. 2017; Mittal und El-Serag 2013; McGlynn und London 2011).

Im Folgenden wird nun auf die Risikofaktoren für das HCC im Detail eingegangen:

HBV-Infektion:

HBV ist für ca. 60% der HCC Fälle in Asien und Afrika und für ca. 20% der Fälle in den Industrienationen verantwortlich (Akinyemiju et al. 2017). HBV ist ein DNA Virus, das sich in das Genom der Wirtszelle integrieren und dadurch Mutationen induzieren kann (Wang et al. 1990). Dadurch erhöht eine HBV-Infektion auch das HCC-Risiko in Abwesenheit einer Zirrhose. Dennoch geht auch hier in den meisten Fällen eine Leberzirrhose der Tumorentstehung voraus (Wang et al. 1990). Die kanzerogenen Eigenschaften einer HBV-Infektion werden durch Aflatoxin B1 verstärkt. Aflatoxine werden von Schimmelpilzarten wie *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* gebildet und kommen in vielen Ländern Afrikas aufgrund des Klimas verstärkt in Lebensmitteln vor (Kew 2003).

Besonders hervorzuheben ist, dass Impfprogramme, vor allem in Asien und Afrika, zu einem Absinken der HBV-Infektionen führen und sich so auch auf die HCC Inzidenz auswirken (Chang et al. 2016; Llovet et al. 2021a)

HCV-Infektion:

Eine chronische Infektion mit HCV gehört zu den häufigsten dem HCC zugrundeliegenden Lebererkrankungen in Nordamerika, Europa und Japan (Akinyemiju et al. 2017). HCV ist ein RNA Virus, das sich nicht in das Genom der Wirtszelle integrieren kann. Daher ist das Risiko direkt ein HCC zu entwickeln gering und weitestgehend auf die Patienten beschränkt, die eine Zirrhose entwickeln. Außerdem gibt es sehr erfolgreiche anti-virale Therapien, die das Risiko ein HCC zu entwickeln um 50-80% senken (Kanwal et al. 2017). Man muss jedoch stets bedenken, dass Patienten mit einer HCV bedingten Leberzirrhose – auch bei optimaler

Patientenversorgung – ein stetig erhöhtes Risiko haben ein HCC zu entwickeln (> 2% pro Jahr) (Ioannou et al. 2019; Llovet und Villanueva 2016; Llovet et al. 2021b).

Alkohol:

Alkoholfehlgebrauch verursacht Lebererkrankungen, Zirrhose und HCC. Die Inzidenz für Leberzirrhose in Verbindung zu Alkoholkonsum liegt bei 1-3% und ist für 15-30% der HCC in Industrieländern verantwortlich (Jepsen et al. 2012). Außerdem wirkt der Konsum von Alkohol auch synergistisch mit anderen Risikofaktoren, wie z.B. einer HBV-Infektion (Lin et al. 2013).

Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH):

Ein weiterer Faktor ist eine NASH, die oftmals mit metabolischen Erkrankungen wie Diabetes und Adipositas einher geht (McGlynn et al. 2021). Seit 2010 hat die NASH in den westlichen Industrieländern deutlich zugenommen und ist für 15-20% der HCC-Erkrankungen verantwortlich (Welzel et al. 2013). Interessanterweise entstehen 25-30% der NASH assoziierten Tumore ohne das Vorliegen einer Leberzirrhose (Kanwal et al. 2018; Mittal et al. 2016).

Alter und Geschlecht

Alter ist wie bei den meisten Tumorentitäten ein wichtiger Risikofaktor, so auch beim HCC. Es wurde gezeigt, dass ab einem Alter von 70 Jahren das HCC Risiko deutlich ansteigt. Des Weiteren sind Männer häufiger betroffen als Frauen. (Llovet et al. 2021b; Rich et al. 2020).

Neben den vielfältigen Risikofaktoren für ein HCC ist auch die Pathophysiologie sehr komplex. Das Zusammenspiel verschiedener Faktoren gerade zum Beginn der malignen Transformation ist vielschichtig. Zu diesen Faktoren gehören genetische Prädisposition, reziproke Interaktionen von viralen und nicht-viralen Risikofaktoren, das zelluläre Microenviroment, Interaktionen mit dem Immunsystem und die Schwere der zugrundeliegenden Lebererkrankung.

Next generation Sequencing (NGS) hat es möglich gemacht eine Vielzahl von Genen, die eine Tumorentstehung begünstigen zu identifizieren. Telomerase-Aktivierung über Mutationen im *TERT*-Promotor, virale Insertionen, chromosomale Translokationen oder Genamplifikationen sind die häufigsten „Treiber“ und werden in ca. 80% aller HCCs detektiert (Guichard et al. 2012; Schulze et al. 2015). Daneben ist in 30-50% aller HCC der Wnt- β -Catenin-Signalweg gestört. In 45-50% der HCC werden Mutationen oder eine Deletion von *TP53* gefunden (Müller et al. 2005, 2005; Müller et al. 2006; Pflaum et al. 2014; Schilling et al. 2010). Weitere sehr häufige Mutationen findet man in *RBI*, *CCNA2*, *CCNE1*, *PTEN*, *ARID1A*, *ARID2*, *RPS6KA3* und *NFE2L2*. Diese Gene sind wie p53 in die Regulation von Proliferation und Zelltod involviert (Chiang et al. 2008). Zusätzlich wurden auch Mutationen in Genen, die epigenetische

Modifikationen, oxidativen Stress und den AKT-mTOR sowie MAPK-Signalweg regulieren, gefunden (Chiang et al. 2008). Neben diesen direkten Mutationen können auch chromosomale Amplifikationen zu Überexpression von CCND1, FGF19, VEGFA, MYC und MET führen und unkontrollierte Proliferation und Resistenz gegenüber Apoptose auslösen (Chiang et al. 2008). Diese Mutationen können in 20-25% aller HCCs nachgewiesen werden (Schulze et al. 2015; Zucman-Rossi et al. 2015; Hyman et al. 2017; Llovet et al. 2018; Calderaro et al. 2019).

Neben diesen veränderten Signalwegen spielen die oben genannten Risikofaktoren eine große Rolle in der HCC Entstehung. HBV induziert durch Insertation ins Genom der Wirtszelle Mutationen. Die am häufigsten betroffene Region ist im *TERT*-Promotor lokalisiert. Dies kann zu einer Überexpression der Telomerase führen, die die Verkürzung der Telomere verhindert. Dadurch wird eine Begrenzung der Zellteilung aufgehoben und die Zellen können sich unbegrenzt oft teilen (Nault et al. 2019). Andere Insertionsstellen betreffen die Gene *CCNA2* und *CCNE1*, die an der Zellzykluskontrolle beteiligt sind. Es entsteht replikativer Stress, der zu einer onkogenen Transformation beitragen kann (Bayard et al. 2018). Im Gegensatz dazu induziert HCV eine onkogene Transformation indirekt über oxidativen Stress, der durch Entzündungsreaktionen ausgelöst wird (Llovet et al. 2021b). Die Adipositas gilt als Risikofaktor für unterschiedliche Tumorentitäten (Renehan et al. 2008). Die Fettzellen bilden ein proinflammatorisches Milieu und beeinflussen das Immunsystem. Daneben kommt es zu einer Überladung der Hepatozyten mit Fettsäuren. Die Entzündungsreaktion und die Anreicherung von Fettsäuren können dann über oxidativen und metabolischen Stress Mutationen induzieren (Nakagawa et al. 2014; Friedman et al. 2018; Anstee et al. 2019; Sutti und Albano 2020).

Das HCC ist eine der wenigen Krankheiten bei der die Risikofaktoren bekannt und untersucht sind. Obwohl Impfungen und anti-virale Therapien das Auftreten HBV- und HCV-assoziiierter HCC reduzieren, steigt die Inzidenz weiter an. Dies liegt an anderen ätiologischen Faktoren, wie Alkoholfehlgebrauch sowie NASH, und betrifft vor allem die westlichen Industrienationen (Kanwal et al. 2018). Daher muss neben anti-viralen Strategien auch ein Umdenken in Bezug auf den Lebensstil vorgenommen werden, um einen weiteren Anstieg in der HCC-Inzidenz zu vermeiden.

1.2.3 Staging und Therapie des HCC

Aufgrund der im vorherigen Kapitel genannten Risikokonstellation sollten Patienten mit Leberzirrhose Child A oder B, Patienten mit einer chronischen Hepatitis B-Erkrankung ab einem PAGE-B Score von 10, Patienten mit chronischer HCV-Infektion und nichtalkoholischer

Steatohepatitis eine halbjährliche Früherkennungsuntersuchung mittels Sonographie und ggf. Bestimmung des Tumormarkers Alpha-1-Fetoprotein (AFP) angeboten werden (DGVS S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms 2021). Auch bei Patienten mit fortgeschrittener Leberfibrose kann bereits ein Screening erwogen werden. In der Bildgebung zeigt das HCC ein typisches Kontrastmittelverhalten mit einer arteriellen Hypervaskularisation und Auswaschung in der portalvenösen und venösen Phase. Bei sonographischem Verdacht auf ein HCC, sollte eine Magnetresonanztomographie (MRT) mit leberspezifischem Kontrastmittel zur weiteren Abklärung durchgeführt werden. Bei unklarem Kontrastmittelverhalten sollte bei Größe des Leberherdes $< 1\text{cm}$ eine bildgebende Kontrolle in 3 Monaten und bei Größe des Leberherdes $> 1\text{cm}$ mit kurativer Behandlungsoption eine triphasische Kontrastmittel-verstärkte Computertomographie (KM-CT) oder ein Kontrastmittel-verstärkter Ultraschall (CEUS) und ggf. eine Biopsie ergänzt werden. Im Falle des Fehlens einer kurativen Behandlungsoption ist der Zweiten Bildgebung eine Biopsie vorzuziehen. Bei Diagnosestellung eines HCC sollte das Staging mittels Bildgebung des Thorax und kompletten Abdomens und der Bestimmung von AFP ergänzt werden (DGVS S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms 2021). Die Therapieentscheidung sollte unter Berücksichtigung der BCLCL-Klassifikation, der AFP-Konzentration und der Mailand-Kriterien innerhalb eines interdisziplinären Tumorboards getroffen werden. Bei Patienten mit einer HCC-Erkrankung, die innerhalb der Mailand-Kriterien liegt, sollte bei einem AFP-Wert $< 1000\text{mg/l}$ eine Evaluation zur Lebertransplantationslistung erfolgen. Als Bridging-Therapie sollten entweder eine chirurgische Resektion, eine Lokalablation oder eine transarterielle Chemoembolisation durchgeführt werden. Bei Patienten mit einem HCC bis 3cm sollte eine Resektion oder eine Ablation erfolgen. Bei Patienten mit erhaltener Leberfunktion und gering oder mäßiggradiger portaler Hypertension soll, bei einem HCC-Herd $> 3\text{cm}$ und $< 5\text{cm}$, vor einer Thermoablation chemoembolisiert werden. Eine transarterielle Chemo- oder Radioembolisation sollte bei erhaltener Leberfunktion im intermediären Stadium eingesetzt werden. Bei Patienten mit nicht lokal kontrollierbarem HCC oder Fernmetastasen sollte im Child-Pugh-Stadium A oder bei BCLC-Stadium A und B eine Therapie mit dem PDL-1-Inhibitor Atezolizumab und dem VEGF-Inhibitor Bevacizumab angeboten werden (Ducreux M. 2021). Bei Kontraindikationen stehen als Erstlinientherapie alternativ Lenvatinib und Sorafenib zur Verfügung (Llovet et al. 2008; Kudo et al. 2018). In der Zweitlinientherapie sollte nach Therapie mit Atezolizumab und Bevacizumab die Therapie mit einem Tyrosinkinaseinhibitor erfolgen (DGVS S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms 2021). Bei Tumorprogress können

die beiden Tyrosinkinase-Inhibitoren Regorafenib und Cabozantinib oder bei einem Alpha-Fetoprotein-Wert von ≥ 400 ng/ml der VEGFR 2-Antikörper Ramucirumab eingesetzt werden. Bei Patienten, die keine Immuntherapie erhalten haben, kann nach Ausschöpfen der Therapieoptionen entweder eine Immunmonotherapie mit den anti-PD-1-Antikörpern Nivolumab oder Pembrolizumab oder eine Kombinationstherapie mit Nivolumab und dem CTLA-4 Antikörper Ipilimumab eingesetzt werden. Bei Patienten im Child-Pugh-Stadium B (bis 8 Punkte) kann eine Therapie mit Sorafenib und einem anti-PD-1-Antikörper erwogen werden. Bei HCC-Patienten im Stadium Child-Pugh C sollte keine Systemtherapie durchgeführt werden (DGVS S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms 2021).

1.3 Das Kolonkarzinom

1.3.1 Epidemiologie

Das kolorektales Karzinom (KRK) ist weltweit die dritthäufigste maligne Erkrankung (Wong et al. 2021). Es liegt im Jahr 2020 mit 576.858 Todesfällen auf dem fünften Platz der karzinombedingten Todesursachen (Sung et al. 2021). Daher stellt das KRK eine erhebliche globale Belastung in Bezug auf Komplikationen, Sterblichkeit, und medizinischen Kosten dar (Wong et al. 2012). Es gibt große geografische Unterschiede hinsichtlich der Inzidenz und Mortalität des KRKs in verschiedenen Ländern (Wong et al. 2021; Douaiher et al. 2017). Vor allem in den Industrienationen nimmt die Inzidenz zu.

In Deutschland wurden im Jahr 2016 58.290 Neuerkrankungen an Darmkrebs bei einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 76 Jahren bei Frauen und 72 Jahren bei Männern registriert (Zentrum für Krebsregisterdaten 2021). Allgemein sind Männer etwas häufiger als Frauen vom KRK betroffen. In Deutschland sind im Jahr 2016 11.391 Frauen und 13.411 Männer an den Folgen des Kolonkarzinoms verstorben (Zentrum für Krebsregisterdaten 2021).

1.3.2 Ätiologie

Das typische Manifestationsalter des KRKs liegt zwischen 65 und 74 Jahren. Alter ist damit einer der wichtigsten Risikofaktoren für das Kolonkarzinom (Nee et al. 2020).

Ca. 5-10% der KRKs sind genetisch bedingt (Garland et al. 2020). Hereditäre Kolonkarzinome entstehen beim Lynch Syndrom, der Familiären Adenomatösen Polyposis (FAP), der

Attenuierten Familiären Adenomatösen Polyposis (AAPC), der MUTYH-assoziierten Polyposis (MAP), dem Peutz-Jeghers-Syndrom (PJS) sowie dem Juvenilen Polyposis-Syndrom (JPS) (Kupfer und Burke 2020). Etwa 3–5% aller KRKs entstehen in Folge eines Lynch-Syndroms (Aretz et al. 2021). Dem Lynch-Syndrom liegt eine Keimbahnmutation in einem von 4 an der DNA-Mismatch-Reparatur (MMR) beteiligten Gene (MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2) zugrunde (Aretz et al. 2021). Dadurch kann ein im Rahmen der Zellteilung zufällig entstandener Fehler nicht korrigiert werden. Bei am Lynch Syndrom erkrankten Patienten liegt das Risiko, im Laufe des Lebens am Kolonkarzinom zu erkranken, zwischen 50 bis 80 % (Aretz et al. 2021). Ebenso ist das Risiko für Endometrium-, Dünndarm-, Magen-, Bauchspeicheldrüsen-, Urothel-, Eierstock-, Talgdrüsen-, Haut- und Gallengangskarzinome erhöht (Kupfer und Burke 2020).

Als zweithäufigste erbliche Ursache für das Kolonkarzinom gelten die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und die Attenuierte Familiäre Adenomatöse Polyposis (AAPC). Die Ursache für diese beiden hereditären Darmsyndromen sind Mutationen des APC-Gens (Zhang et al. 2020). Hierdurch kommt es zu einer Vielzahl von adenomatösen Polypen (Zhang et al. 2020). 69 % der AAPC-Patienten erkranken an einem KRK (Sa et al. 2020). Ohne Primärprävention käme es bei 95 % der über 50-jährigen Patientinnen und Patienten mit FAP zu einem KRK (Sa et al. 2020).

Das Peutz-Jeghers-Syndrom (PJS) und das Juvenile Polyposis Syndrom (JPS) sind durch hamartomatöse Polypen charakterisiert (Kupfer und Burke 2020). Das PJS wird durch Mutationen der Serin-Threonin-Kinase 11 (STK11) hervorgerufen (Zouzo et al. 2021). Das PJS führt in 81 bis 93 % der Fälle zu einem KRK (Zouzo et al. 2021). Das JPS entsteht durch Mutationen der Gene SMAD4 oder BMPR1A (Blatter et al. 2020). Zwischen 39 und 51 % der JPS-Patienten erkranken an einem KRK (Blatter et al. 2020).

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind ebenfalls wichtige Risikofaktoren für die Entstehung des KRKs (Fantini und Guadagni 2021).

Neben genetischen Risikofaktoren sind weitere wichtige Risikofaktoren Bewegungsmangel, Übergewicht, Rauchen, westliche Ernährung mit Konsum von rotem Fleisch und Wurstwaren sowie ballaststoffarme Ernährung sowie vermehrter Alkoholkonsum. Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass Alkoholkonsum das Risiko für KRK bei einem Konsum von 10

g/Tag um 10 % und bei einem Konsum von 100 g/Woche um sogar 18 % erhöht (Raskov et al. 2014; Alpert 2020).

1.3.3 Karzinogenese

Der Dickdarm ist das Organ mit der höchsten Proliferationsrate aller Organe bei Säugetieren (Raskov et al. 2014). Dies führt zu einem erhöhten Risiko für Mutationen (Zhao und Michor 2013; Raskov et al. 2014). Das kolorektale Karzinom entsteht in aller Regel über mehrere Jahre auf dem Boden von Adenomen. Gemäß WHO werden Adenome in niedriggradige (LGIEN) und hochgradige (HGIEN) intraepitheliale Neoplasien eingeteilt. Gemäß der Adenom-Karzinom-Sequenz kommt es bei den meisten Adenomen in Folge mehrerer Mutationen (z.B. APC, KRAS, TP53) zu der Entstehung eines Karzinoms (Vogelstein et al. 1988). Ausnahmen sind serratierte Adenome, die durch Mutationen im BRAF-Gen entstehen und CpG-Insel-Methylierungen aufweisen (English et al. 2008). Durch Polypektomie der Adenome kann die Entwicklung eines KRK effizient verhindert werden (Guo et al. 2021).

1.3.4 Staging und Therapie des Kolonkarzinoms

Zum Staging eines KRK sollte eine komplette Koloskopie mit Biopsie und Sonographie mit CT Thorax erfolgen. Bei sonographischem Verdacht auf Lebermetastasen oder nicht optimaler Beurteilbarkeit in der Sonographie sollten ein CT Abdomen oder ein MRT Abdomen ergänzt werden. Zudem sollte Carcinoembryonales Antigen (CEA) als Tumormarker bestimmt werden (DGVS S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Kolorektalen Karzinom 2019). Im Stadium I-III wird eine chirurgische Resektion empfohlen. Ab dem Stadium II wird abhängig von Risikofaktoren (T4 Stadium, Tumorperforation, intraoperativer Tumoreinriss, Operation unter Notfallbedingungen, weniger als 12 untersuchte Lymphknoten, histopathologisch dokumentierte Lymph- oder Blutgefäßinfiltration) und MSI-Status eine adjuvante Chemotherapie empfohlen. Im Stadium II kann die adjuvante Chemotherapie individuell mit dem Patienten besprochen werden. Für das Stadium III ist ein signifikanter Lebensvorteil für eine adjuvante Chemotherapie nachgewiesen (DGVS S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Kolorektalen Karzinom 2019).

Im UICC-Stadium IV sollten resektable Metastasen entfernt werden. Periinterventionell oder postoperativ kann alternativ zur Nachsorge eine Therapie mit FOLFOX erfolgen. Sind die Metastasen nicht resektabel erfolgt abhängig von der Lage des Primärtumors, des RAS- und BRAF-Status eine Doublet- oder Triplet-Therapie mit Fluoropyrimidin, Irinotecan und/oder Oxaliplatin in Kombination mit Bevacizumab oder einem EGFR-Antikörper. Sollten die

Metastasen im Verlauf resektabel werden, sollten sie operativ entfernt, bestrahlt oder lokalablativ behandelt werden (DGVS S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Kolorektalen Karzinom 2019).

1.4 Dreidimensionale Zellkultur

1.4.1 Anwendungszwecke und Arten der 3D-Zellkultur

Die 3D-Zellkultur bietet eine Möglichkeit, in vitro den Leber- oder Darmtumor zu modellieren /imitieren. Eine 3D-Zellkultur kann neben den entsprechenden Zellen auch aus einem aus biologischen oder synthetischen Materialien hergestellten Scaffold (englisches Wort für „Gerüst“) bestehen. Dieses ermöglicht dann eine bessere Kultivierung der Zellen in 3D-Strukturen.

In vivo entwickeln sich und wachsen die Zellen dreidimensional in Geweben und Organen. Die Relevanz des raum-zeitlichen zellulären Kontextes während der Morphogenese wurde von Entwicklungsbiologen bereits in den frühen Jahren des 21. Jahrhunderts erkannt (Edelman und Keefer 2005). Bissell und Kollegen zeigten dann die Anwendung in Tumormodellen. Sie zeigten, wie extrazelluläre Matrix (ECM) und Gewebearchitektur Zellen beeinflussen, wie maligne Zellen Signale aus der Umgebung empfangen und auch, wie die Umgebung auf Signale der Tumorzellen reagiert (Roskelley et al. 1994). Weitere Arbeiten zeigten, wie extrazelluläre Faktoren das Verhalten von Tumorzellen beeinflussen und damit auch ihre Sensitivität gegenüber therapeutischen Wirkstoffen (Yamada und Cukierman 2007; Hay und Dodson 1973) determinieren.

In den letzten Jahren hat die Zahl der 3D-Kulturmethoden zugenommen. Homotypische Sphäroide (bestehend aus nur einem Zelltyp) oder auch aus Biopsien gewonnene Organoide zeigten einen eher physiologischen Grad der Zelldifferenzierung im Vergleich zu konventionellen 2D-Kulturbedingungen (Hoffman 1993). Diese Modelle können Einblicke in multizelluläre Reaktionen auf physikalische oder chemische Verletzungen (Kerbel und Kobayashi 1994; JH Schwachofer 1990) oder Prozesse der Tumorentstehung geben (Kunz-Schughart et al. 2004; St Croix und Kerbel 1997).

Ein Hindernis hierbei war immer das Vorhandensein eines zentralen hypoxischen Bereichs innerhalb der Sphäroide, in dem sich Nekrosen entwickelten, was die Verwendung dieser

Modelle stark einschränkt. Die zentrale Nekrose, bedingt durch die Einschränkung des Stofftransports und die Akkumulation toxischer Metabolite sowie die fehlende Nährstoffpenetration, war immer der limitierende Faktor für die Entwicklung einer 3D-Zellkultur. Dieses Problem der Energieversorgung könnte mit Energieträgern wie Polyphosphaten (polyPs) gelöst werden sein. In Abbildung 1 sind verschiedene Arten der 3D-Zellkulturmodelle zu sehen.



Abbildung 1 verschiedene Arten von 3D-Zellkultur-Modellen. Modifiziert nach Mazzoleni (Mazzoleni et al. 2009b).

1.5 Bioprinting

Das Ziel des Projekts ist, dass man die 3D-Zellkulturen mittels eines 3D-Druckers verdrucken kann. Deswegen erfolgt hier eine kurze Einleitung in das Bioprinting. Charles W. Hull hat den Begriff „stereolithography“ 1984 eingeführt (Hull 1984). Das waren die Anfänge des 3D-Bioprintings. Dünne Schichten von Zellen wurden gedruckt und hatten am Ende eine

konsistente 3D-Struktur. Diese Modelle wurden dann für die Produktion von Scaffolds (ein 3D-Zellgerüst) genutzt (Kryou et al. 2019a).

Die darauf folgende Generation des Bioprintings setzte man für Tissue Engineering ein (Nakamura et al. 2010). Es gibt hierbei drei wichtige Bioprinting-Techniken: Extrusion (Iwami et al. 2010), Inkjet (Xu et al. 2013) und Laser-Induced Forward Transfer (LIFT) (Guillemot et al. 2010). In Tabelle 2 sind die wichtigsten Eigenschaften der drei 3D-Bioprinting-Arten zusammengefasst (Kryou et al. 2019b) und in Abbildung 3 sind die drei wichtigsten Bioprinting-Arten im Vergleich dargestellt.

Eigenschaften	Laser-Bioprinting	Inkjet	Extrusion
Geschwindigkeit	mittel	schnell	langsam
Zellviabilität	< 85 %	≈ 80 %	> 90 %
Auflösung	10 m	50 m	100 m
Zelldichte	medium	low	high
Viskosität	1–300 mPa s	< 10 mPa s	30–6 10 ⁷ mPa s
Skalierbarkeit	niedrig	niedrig	niedrig bis mittel
strukturelle Integrität	niedrig	niedrig	hoch
Kosten	hoch	niedrig	niedrig bis mittel

Tabelle 2 Übersicht der Eigenschaften der drei verschiedenen Arten des 3D-Bioprintings. Modifiziert nach C. Kryou (Kryou et al. 2019b).

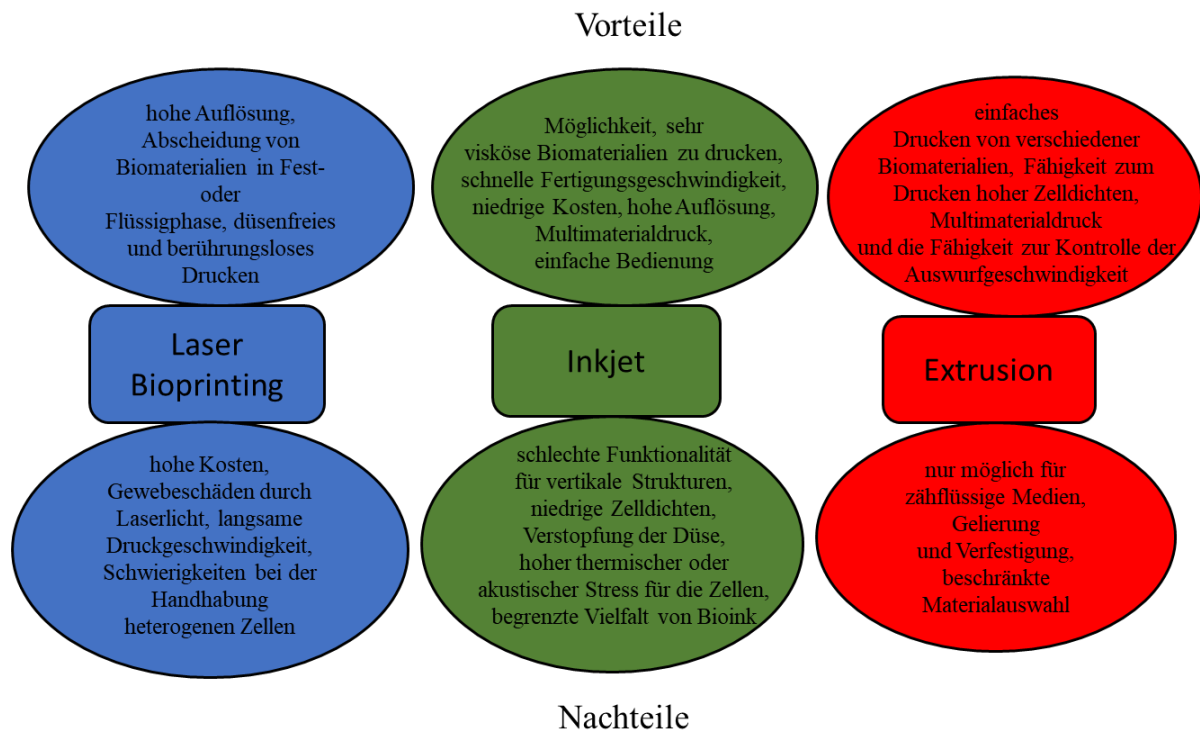


Abbildung 3 Komparative Darstellung der Vor- und Nachteile der drei verschiedenen Arten des 3D-Bioprintings, modifiziert nach C. Kryou (Kryou et al. 2019b).

1.5.1 Laser-Induced Forward Transfer (LIFT)

LIFT ist eine düsenlose Technik und daher gibt es keine Probleme mit dem Verstopfen der Düse mit biologischen Materialien, was einer der größten Nachteile anderer Biodrucktechnologien ist. Diese Technik ermöglicht die Konzentration gedruckter Zellen bis zu 1×10^8 Zellen/mL mit einer sehr hohen Auflösung (Zhang 2015).

Um verschiedene Druckeinstellungen zu vergleichen, wurden die Zellen nach dem LIFT untersucht. Während eine höhere Laserenergie in verstärktem Zelltod resultiert, führen erhöhte Filmdicke und Bioink-Viskosität zu einer verbesserten Viabilität der Zellen (Guillemot, F. et al. 2010).

1.5.2 Inkjet

Inkjet-Bioprinting beinhaltet die Konstruktion zellulärer Strukturen, die das Zellwachstum ermöglichen. Diese Art von Bioprinting wird zum Beispiel für Scaffolds (3D-Gerüste) benutzt. Das größte Problem dieses Modells liegt darin, dass keine hohen Zelldichten erreicht werden und das Modell dadurch technisch limitiert ist. Im Vergleich zu anderen Methoden hat Inkjet-

Bioprinting den Vorteil einer erhöhten Schnelligkeit. Die Methode ist auch kostengünstig. Die Inkjet-Technik ermöglicht direktes Platzieren von Zellen auf Scaffolds aus Biomaterialien, zum Beispiel direkt in die Hautläsionen, sodass diese Technik bei Regenerationsprozessen hilfreich ist (Kryou et al. 2019a).

In Abbildung 4 ist Inkjet-Bioprinting schematisch dargestellt. Die Ink-Tropfen haben hierbei eine Zelldichte von weniger als 10 Millionen Zellen pro Milliliter (Xu et al. 2005; Kryou et al. 2019b).

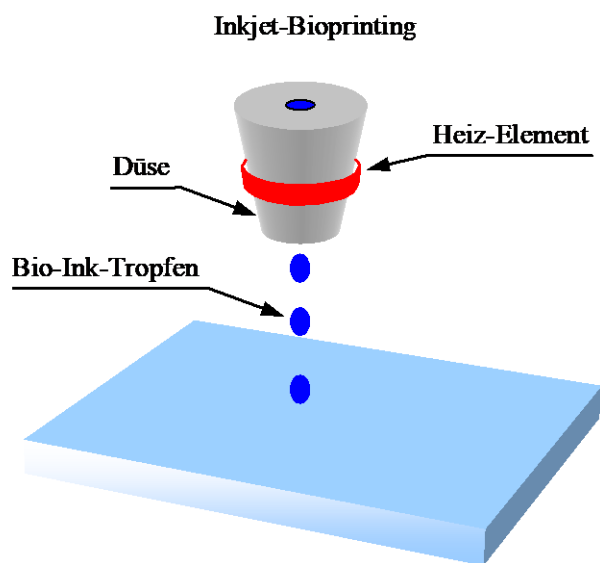


Abbildung 4 Schematische Darstellung des Inkjet-Bioprintings. Modifiziert nach C. Kryou (Kryou et al. 2019a).

1.5.3 Extrusion

Diese Technik ermöglicht das Drucken von sehr hohen Zelldichten, Hydrogelen und Copolymeren. Zellen werden bei dieser Technik temperaturkontrolliert anhand von pneumatischem Druck verteilt. Diese Art von Bioprinting produziert Filamente entlang einer X- und Y-Achse und durch die vertikale Bewegung formiert sich die Z-Achse (Kolesky et al. 2016; Kryou et al. 2019a). Ein großer Nachteil des Extrusionsbiodrucks besteht darin, dass die Zellebensfähigkeit geringer ist als bei Inkjet-basiertem Biodruck.

Die verminderte Zellüberlebensrate liegt darin begründet, dass die Zellen sehr hohen Scher- und Spannungskräften in viskosen Flüssigkeiten ausgesetzt sind.

Extrusions-basierte Bioprinting-Ansätze wurden u. a. für die Erzeugung von Aortenklappen und *in-vitro*-pharmokinetischen Modellen eingesetzt (Chang et al. 2008a, 2008b; Duan et al. 2013; Kryou et al. 2019b).

1.6 Scaffolds

Scaffolds sind 3D-Gerüste bzw. Schablonen, die Zellinteraktion, Proliferation und extrazelluläre Matrixbildung fördern (Nikolova und Chavali 2019). Scaffolds benutzt man in Bereichen des Tissue Engineerings, der regenerativen Medizin und der Medikamentenentwicklung. In der regenerativen Medizin gibt es Scaffolds, die sogar den Wiederaufbau von Nerven, Muskeln, Gefäßen und Knochen ermöglichen. Dieses bioaktive Gerüst gewährleistet nicht nur die mechanische Unterstützung des Gewebes, sondern kann auch als Träger für bioaktive Moleküle wie zum Beispiel Zytokine, Inhibitoren, Medikamente oder Antibiotika dienen (Nikolova und Chavali 2019). Scaffolds können aus verschiedenen Materialien bestehen. Abbildung 5 gibt einen Überblick über verschiedene Materialien, die für die Produktion von Scaffolds verwendet werden. Jedes Biomaterial hat spezifische chemische, physikalische und mechanische Eigenschaften, die verschiedene 3D-Formen und Geometrien ermöglichen (Nikolova und Chavali 2019).

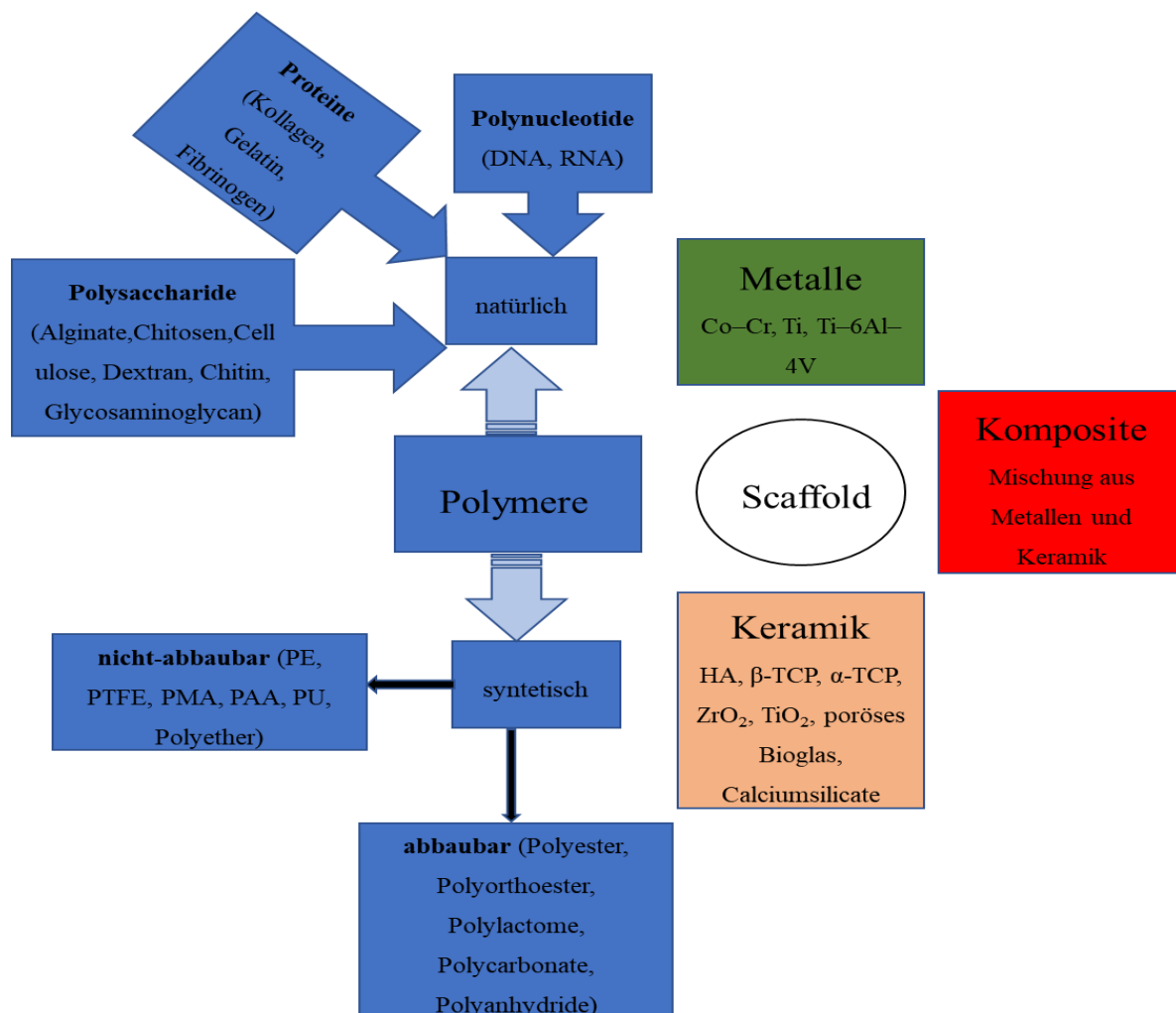


Abbildung 5 Scaffold-Arten. Modifiziert nach Nikolova und Chavali (Nikolova und Chavali 2019).

1.7 Anorganisches Polyphosphat (polyP)

In dieser Arbeit wurden die verschiedene Caco2- und Hep3B-2D-Zellkulturen mit polyP-Substraten substituiert, um eine optimierte Energieversorgung für die Zellen zu gewährleisten. Das physiologische Phosphat-Polymer polyP ist ein lineares Molekül, das aus einigen bis zu hundert anorganischen Orthophosphat-Monomereinheiten (Pi) besteht, die durch hochenergetische Phosphoanhydridbindungen verbunden sind (Abbildung 6).

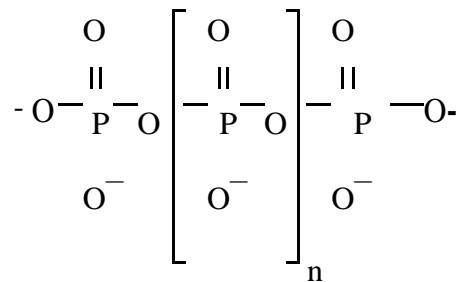


Abbildung 6 Chemische Formel von Polyphosphat (eigene Darstellung).

PolyP wird aus Pi durch eine Dehydrierung bei erhöhter Temperatur gebildet. PolyP kommt in allen Organismen vor: Bakterien, Archäen, Pilzen, Protozoen, Pflanzen und Tieren (Kornberg et al. 1999a; Kulaev und Vagabov 1983; Wood und Clark 1988; Kulaev et al. 2004). Mangel bekannter Funktion wurde es lange Zeit als „molekulares Fossil“ bezeichnet (Kornberg et al. 1999b; Kornberg 1995; Kulaev et al. 2004). Im Laufe der Zeit, hat man Erkenntnisse gewonnen, dass polyPs zahlreiche und vielfältige biologische Funktionen haben. Zu diesen Funktionen gehören: Substitution von ATP in Kinase-Reaktionen, Reservoir von Pi, Chelatbildung mit Metallen (z. B. Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}) oder Puffer zur Verhinderung eines Anstiegs des intra- und extrazellulären pHs.

PolyP wurde erstmals aus Hefe isoliert (Liebermann 1890) und später in Form metachromatischer Granulate in Mikroorganismen gesehen als Partikel, die durch basische blaue Farbstoffe (z. B. Metachromasie) rosa gefärbt wurden.

Historisch gesehen wurden die metachromatischen Partikel als diagnostisch nutzbares Merkmal zur Identifizierung medizinisch wichtiger Bakterien wie *Corynebacterium diphtheriae* genutzt.

In den 1930er Jahren wurde entdeckt, wie Pi durch eine Anhydridbindung an ADP in der aeroben (oxidativen) Phosphorylierung fixiert wird. In dieser Zeit wurde auch das kleinste anorganische Polyphosphat, das Pyrophosphat, in tierischen Zellpräparaten beschrieben. Das Wissen, dass mitochondriale Membranen der Sitz der aeroben Phosphorylierung sind und dass

Nukleotidyltransferasen die Quelle des anorganischen Pyrophosphats sein könnten (Kornberg 1993b; Kornberg 1957b; Kornberg 1999), erklärte jedoch nicht, wie die vielen Phosphoanhydrid-verknüpften Reste in polyP zusammengebaut wurden. Erst Versuche in *Escherichia coli* führten zur Entdeckung der polyP-Kinase, die das terminale Phosphat von ATP abspalten und in polyP umwandeln und auch die Umwandlung von polyP zurück in ATP katalysieren konnte (Kornberg 1993a; Kornberg et al. 1956):



1.7.1 Vorkommen

Die natürliche Existenz von polyP identifizierte Ascoli in Hefe (Ascoli 1899). Der Autor zeigte, dass Kernextrakte eine Fraktion enthalten, die mit Bariumsalzen bei saurem pH-Wert ausgefällt werden konnte, und bezeichnete diese als Metaphosphat. Später wurde dieses Polymer in Bakterien, Protista, Blütenpflanzen und Metazoa identifiziert (Xiaohong Wang et al. 2018; Kulaev et al. 2004; Kornberg et al. 1999b; Müller et al. 2015; Schröder und Müller 1999). Die funktionelle Charakterisierung begann mit der Identifizierung erster Enzyme, die den reversiblen Phosphataustausch zwischen polyP und ATP/ADP (Rao et al. 2009; Kornberg 1957a; Kornberg et al. 1956; Xiaohong Wang et al. 2018) in Bakterien katalysierten. Während in Bakterien polyP in Volutingranula (metachromatische Granula) gespeichert wird (Pallerla et al. 2005; Xiaohong Wang et al. 2018), akkumuliert dieses Polymer in den Acidocalcisomen bei Eukaryoten. Diese Granulate wurden in Trypanosomen und auch in menschlichen Blutplättchen entdeckt (Docampo 2006). Neben der Bildung von Salzen mit anorganischen Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Na^+ und K^+) bildet polyP Komplexe mit organischen Molekülen wie basischen Aminosäuren oder Polyaminen (Xiaohong Wang et al. 2018). Basierend auf den Extraktionsmethoden, die für die Isolierung von polyP verwendet werden, wurde dieses Polymer willkürlich in kurzkettige (von 3 bis 300 Pi) und langkettige (von 300 bis 1000 Pi) Polymere unterteilt (Kulaev et al. 2004).

1.7.2 Stoffwechsellzyme der Polyphosphate

Während die anabolen und katabolen Stoffwechselwege von polyP in Bakterien gut untersucht sind (Kornberg et al. 1999a; Schröder und Müller 1999; Xiaohong Wang et al. 2018), wurden

nur wenige Polyphosphatkinasen in Eukaryonten identifiziert. Das wichtigste aus Bakterien bekannte polyP-anabole Enzym, die Polyphosphatkinase (PPK), wurde auch in dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* identifiziert (Zhang et al. 2007). Ein anaboles polyP-Enzym wurde in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Secco et al. 2012) mit dem vakuolären Transporter Chaperone 4 (Vct 4) isoliert (Xiaohong Wang et al. 2018).

In Säugetieren wurde polyP als Substrat für die Synthese von NADP⁺ durch Phosphorylierung von NAD⁺ identifiziert. Diese Reaktion wurde durch mitochondriale NAD-Kinase katalysiert (Ohashi et al. 2012; Azevedo et al. 2015). Es wurde auch gezeigt, dass bei Säugetieren polyP enzymatisch durch alkalische Phosphatase (ALP), eine Exopolyphosphatase, hydrolysiert werden kann. Die Spaltung des terminalen Phosphats der polyP-Kette setzt Pi und somit auch Energie frei (Kulaev et al. 2005, S. 85–87). ALP kann im knorpelgewebsassoziierten Epiphysenknorpel Phosphatester sowie auch ATP spalten (Fortuna et al. 1979). Auch wurde eine menschliche Exopolyphosphatase beschrieben, die zur DHH-Superfamilie humaner Proteine h-prune gehört, und ein Bindungsligand des Metastasen-Suppressors nm23-H1-Protein ist (Tammenkoski et al. 2008). Dieses Enzym baut polyPs aller Kettenlängen ab (Tammenkoski et al. 2008; Xiaohong Wang et al. 2018). Obwohl das zugrundeliegende Enzym bisher nicht isoliert wurde, deuten experimentelle Ergebnisse darauf hin, dass polyP im menschlichen Blut und Plasma sowohl durch Exo- als auch durch Endopolyphosphatasen abgebaut werden kann (Lorenz et al. 1997; Xiaohong Wang et al. 2018).

1.7.3 Verschiedene Funktionen von Polyphosphaten

Polyphosphat als ATP-Ersatz und Energiequelle

Durch Phosphotransferasen kann der polyP-Spiegel in einer Zelle weit über dem von ATP liegen. Im Vergleich zu den üblichen zellulären ATP-Werten, die zwischen 5 und 10 mM liegen, können die massiven vakuolären Ablagerungen von polyP z. B. in der Hefe Konzentrationen von über 200 mM erreichen. In *E. coli* können die polyP-Spiegel als Reaktion auf Stress etwa 50 mM (Ault-Riché et al. 1998) erreichen. In Myxobakterien können die körnigen Aggregate von polyP während der stationären Phase ebenfalls Werte von über 50 mM erreichen (Voelz et al. 1966; Kornberg et al. 1999b).

Es wurde ein Protein in der ribosomalen Fraktion des Archaeobakteriums *Sulfolobus acidocaldarius* gefunden, das durch polyP phosphoryliert wurde (Skorko 1989). Ein Energierückgewinnungsmechanismus, der mit Ausschleusung organischer Endprodukte (z. B.

Laktat in Darmbakterien) in Verbindung steht, könnte eine chemiosmotische Kopplung generieren (van Veen et al. 1994a; van Veen et al. 1994c, 1994b; Kornberg 1999). Die Ablösung von Metallchelate aus dem polyP kann eine chemiosmotische Kopplung erzeugen, die bei der Synthese von ATP helfen könnte (Kornberg 1999).

In einer Zelle kann polyP als ATP-Quelle dienen (Kornberg 1999). Der katalytische Umsatz von ATP ist in den Zellen sehr groß. Bei *E. coli* in den stationären Phasenkulturen werden sehr hohe Konzentrationen von polyP gebraucht, um das ATP nur für wenige Sekunden zu ersetzen. Aber diese herausragende regulatorische Rolle des polyPs ermöglicht *E. coli*, in der stationären Phase zu überleben (Kornberg et al. 1999b).

Polyphosphat als Reservoir für Pi

Ein stabiles Niveau von Pi, das für Stoffwechsel und Wachstum unerlässlich ist, kann nur durch ein Reservoir gewährleistet werden, in dem polyP durch assoziierte Exopolyphosphatasen in Pi umgewandelt werden kann. Das Polymer, das mit multivalenten Gegenionen assoziiert ist, hat einen deutlichen osmotischen Vorteil gegenüber freiem Pi. Die Akkumulation von polyP hängt vom PhoB des Pho-Regulons (ein bakterieller Regulationsmechanismus, der zur Erhaltung von anorganischem Phosphat innerhalb der Zelle dient (Wanner und Chang 1987)) ab, das über 30 Gene steuert, die am Phosphatstoffwechsel beteiligt sind (Kornberg 1999; Chu et al. 1996; Rao und Torriani 1990). Mehrere Exopolyphosphatasen in *E. coli* (Akiyama et al. 1993; Keasling et al. 1993; Kornberg 1999) und in Hefe (Andreeva und Okorokov 1993; Andreeva et al. 1998b; Lichko et al. 1998; Andreeva et al. 1998a; Kulaev et al. 1997; Kornberg 1999) stehen potenziell zur Verfügung, um Pi an verschiedenen Orten in einer Zelle zu produzieren.

Polyphosphat als Chelator von Metallionen

Ein Phosphat-Polyanion wie polyP ist ein starker Chelator von Metallionen. PolyP bildet in Hefen einen Chelatkomplex mit Ca²⁺-Ionen und senkt so die Ca²⁺-Konzentration in der Hefevakuole (Dunn et al. 1994). Die Chelation von Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen, die in den Zellwänden grampositiver Bakterien sind, gilt als Grundlage für die antibakterielle Wirkung von polyP (Lee Ruby M. et al. 1994; Kornberg 1999). Die Komplexbildung mit anderen Metallen wie z. B. Zink, Eisen, Kupfer und Cadmium könnte entweder deren Toxizität verringern oder deren Funktionen beeinträchtigen.

PolyP als Regulator für Stress und Überleben

Die regulatorischen Rollen des polyP sind sehr unterschiedlich. PolyP interagiert mit basischen Proteinen (z. B. Histonen), mit basischen Domänen anderer Proteinen, wie z. B. Polymerasen, und wurde auch in Verbindungen mit nicht-histonischen Kernproteinen untersucht (Offenbacher und Kline 1984; Kornberg 1999). Diese Interaktionen könnten vielleicht auch die Genfunktionen positiv oder negativ beeinflussen. Es scheint möglich zu sein, dass polyP bei der Stressantwort beteiligt ist und mit Signalmolekülen, die Zellzyklus und das Zellwachstum steuern, interagiert. Darüber hinaus wurde auch eine regulatorische Rolle von polyP bei einer Vielzahl von Reaktionen bei Nährstoffmangelzuständen und bei Umweltbelastungen beobachtet. Auch wurde die Rolle des polyP bei der Dynamik der metabolischen Anpassungen in der stationären Phase von *E. coli* beobachtet (Hengge-Aronis 1993; Kolter et al. 1993; Rao et al. 2009; Kornberg 1999).

PolyP als Entwicklungsregulator

Entwicklungsbedingte Veränderungen der Mikroorganismen – Fruchtkörper- und Sporenbildung bei Myxobakterien (z. B. *M. xanthus*), Sporulation bei Bakterien (z. B. *B. subtilis*) und Pilzen sowie Heterocystenbildung bei Cyanobakterien (z. B. *Anabaena sp.*) (C. Peter Wolk et al. 1994; Kornberg 1999) – treten als Reaktion auf Nährstoffmangel auf. Im Hinblick auf die Beteiligung von polyP bei Nährstoffmangelzuständen in der stationären Phase von *E. coli*. könnte polyP durchaus auch in anderen Fällen von zellulären Anpassungen oder Defiziten eine Rolle spielen (Kornberg 1999).

In *Myxococcus xanthus* wird am Ende des vegetativen Wachstums das Niveau von polyP und der polyP-AMP-Phosphotransferase-Aktivität um das 10-Fache erhöht (Kornberg 1999). In erhöhten Konzentrationen kann polyP auf verschiedene Weise zur Entwicklung von Fruchtkörpern und Sporen beitragen. Der Anstieg der Konzentration von Guanosin-3,5-bispyrophosphat, einem Signalmolekül der bakteriellen Stressantwort (Murray und Bremer 1996; Kornberg 1999), geht der polyP-Bildung voraus. Die Mutanten zum Beispiel, die Guanosin-3,5-bispyrophosphat nicht produzieren können, erhöhen auch ihre polyP-Spiegel nicht (Kornberg 1999). Es scheint es, dass Guanosin-3,5-bispyrophosphat eine regulatorische Rolle bei der polyP-Bildung spielt.

1.8 Ziel des Projekts

Das Ziel dieses Projekts ist es, die Grundlagen (z. B. Kulturbedingungen) für die Entwicklung eines personalisierten Tumormodells zur patientenindividuellen Anpassung der Anti-Tumorthherapie zu etablieren.

Um primäre Zellen zu kultivieren und Interaktionen zwischen verschiedenen Geweben zu untersuchen, ist die Entwicklung komplexer 3D-Zellkulturmodelle dringend erforderlich. Es gibt hier verschiedene Ansätze von Sphäroiden über Organoide zu Scaffold-basierten Zellkulturmodellen. Alle diese 3D-Modelle bergen Herausforderungen wie z. B. eine gleichmäßige Energieversorgung auch im Inneren der 3D-Zellkultur bei gleichmäßigem Sauerstoffpartialdruck zu generieren.

In der vorliegenden Arbeit habe ich polyPs, die schon in der Arbeitsgruppe unseres Kooperationspartners Prof. Müller (Institut für Physiologische Chemie, Universitätsmedizin Mainz) verwendet werden (Müller et al. 2016a; Müller et al. 2016b) hinsichtlich ihrer Anwendungsmöglichkeiten bei häufigen gastroenterologischen Tumoren untersucht. Die Fragestellung war: (1) Werden polyPs von Zellen aufgenommen, (2) werden diese verstoffwechselt und können somit als Energiequelle dienen und (3) werden polyPs aerob oder anaerob umgesetzt? Diese entscheidenden Fragen wurden an zwei Zelllinien Hep3B (Zelllinie des hepatozellulären Karzinoms) und Caco2 (Kolonkarzinomzelllinie) in einer 2D-Zellkultur untersucht. Hierbei wurde zum einen der Metabolismus über Messung von Reduktionsäquivalenten (NAD(P)H) bestimmt und zusätzlich physiologische Parameter wie Proliferation und Zelltod gemessen. Wenn polyPs tatsächlich als Energiequelle von den Zellen genutzt werden können, dann ist es auch wichtig, zu verstehen, wie polyPs umgesetzt werden. Im Inneren eines 3D-Zellkulturmodells nimmt der Sauerstoffpartialdruck ab. Ein anaerober Stoffwechselweg wie Glykolyse oder Pentose-Phosphatweg als Stoffwechselweg wäre optimal, damit die polyPs auch im Inneren des Zellkulturmodells genutzt werden könnten.

Die Nutzungsmöglichkeit von polyPs stellt somit die Grundlage für die Etablierung komplexer und physiologisch relevanter 3D-Zellkulturmodelle dar. Diese können dann für die Entwicklung personalisierter Therapieansätze genutzt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Wasserbad	GFL: Gesellschaft für Labortechnik mbh, Burgwedel, Deutschland
Reinstwasseraufbereitungsanlage Milli-Q mit Q-POD	Merck Millipore, Billerica, USA
Nanophotometer IMPLEN	Implen GmbH, München, Deutschland
T3 Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Nanophotometer IMPLEN	Implen GmbH, München, Deutschland
Zellzähler Cellcounter TC 20	BioRad, Hercules, USA
Mikroskop Zoe	BioRad, Hercules, USA
Mikroskop Olympus CK2	Olympus, Japan
Magnetrührer, IKA RH basic 2	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Thermomixer comfort5355	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Dry Block Heating Thermostat Bio TDB- 100	BIOSAN, Riga, Lettland
Analysenwaage Excellence XA105 DualRange	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Laborwaage	Sartorius Laboratory, Göttingen, Deutschland
Sterilbank HeraSafe	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Sicherheitswerkbank LaminAIR HB2448	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

Electrophoresis Power Supply Consort EV261	Consort bvba, Parklaan, Belgien
PowerSupply E835	Consort, Turnhout, Belgien
PowerSupply E455	Consort, Turnhout, Belgien
Gelkammer Multigel G44	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Brutschrank, Forma Scientific CO2 Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Brutschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Sorvall RC 6 Plus	Unity Lab Services, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Minizentrifuge für PCR-Tubes	BioRad, Hercules, USA
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge MiniSpin plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Mikrozentrifuge pico17	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge Jouan MR23i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
Zentrifuge Biofuge 15R	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
Tischzentrifuge Megafuge 16 R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Schüttelgerät Certomat R	B. Braun Biotech International
FACS LSR Fortessa	BD, Franklin Lakes, USA

2.1.2 Allgemeiner Laborbedarf

96 Well Cell Culture Plate 3598	Corning Incorporated, Corning, USA
96 Well Cell Culture Plate 3585	Corning Incorporated, Corning, USA
Clear Microplate DY990	R&D Systems, Minneapolis, USA
96 Well Microplate 655074	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
1,5 ml Eppendorf Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
2,0 ml Safe-Lock-Eppendorf Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
14 ml Polypropylene Round-Bottom Tube Falcon	Corning Science Mexico S.A. de C.V., Tamaulipas, Mexiko
15 ml High-Clarity Polypropylene Conical Tube Falcon	Corning Science Mexico S.A. de C.V., Tamaulipas, Mexiko
50 ml Polypropylene Conical Tube Falcon	Corning Science Mexico S.A. de C.V., Tamaulipas, Mexiko
Pipetten Eppendorf Research Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette Easypet	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multipipette Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetman	Gilson, Middleton, USA

2.1.3 Reagenzien

MTS-Assay, Zell-Proliferation	BioVision Inc, Milpitas, USA
PBS [Phosphate-Buffered Saline]	SIGMA, St. Louis, USA
DAPI	BD, Franklin Lakes, USA
Minimal Essential Medium Eagle	SIGMA, St. Louis, USA

Dulbecco's Modified Eagle's Medium	SIGMA, St. Louis, USA
HHBS [Hank's Buffer with 20 mM HEPES]	Bioquest, Sunnyvale, Canada
CytoPainter Cell Proliferation Staining Reagent-Green Fluorescence	Abcam, Cambridge, UK

2.2 Methoden

2.2.1 Statistik

Alle Experimente wurden unabhängig voneinander in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Daten stellen Mittelwerte mit Standardabweichungen, wenn nichts anderes angegeben, dar.

2.2.2 Zellkultur

Hep3B-Zellen (Humane Hepatom Zelllinie) wurden in Minimal Essential Eagle's Medium (MEM) und Caco2-Zellen (Kolorektales Karzinom) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit Zusatz von jeweils 5 ml Natriumpyruvat und 5 ml nicht-essentiellen Aminosäuren kultiviert. Zusätzlich wurde das Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) supplementiert. Die Inkubation der Hep3B- und Caco2-Zellen erfolgte bei 37 °C und 10 % bzw. 5 % CO₂.

2.2.3 Zellernte

Die Zellen wurden in Gegenwart des jeweiligen polyP-Substrats (in Konzentrationen von 30 µg/ml bis 300 µg/ml) 7 bis 9 Tage inkubiert. Zur Ernte wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin-EDTA-Lösung (2,5 g/l Schweinetrypsin, 0,2 g/l EDTA) von der Zellkulturschale abgelöst. Jeweils eine Million Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 70 % Ethanol fixiert.

2.2.4 MTS-Analyse

Der MTS-Assay ist ein kolorimetrischer Assay zur Beurteilung der Zellstoffwechselaktivität. NAD(P)H-abhängige zelluläre Oxidoreduktase-Enzyme können unter definierten Bedingungen die Anzahl der vorhandenen lebensfähigen Zellen reflektieren.

Für den MTS-Assay wurden Hep3B- und Caco2-Zellen in 96 Well-Platten ausgesät (8000 Zellen/Well). Calcium-, Magnesium-, Strontium- oder Natrium-polyP wurden in verschiedenen Konzentrationen (1 µg/ml, 30 µg/ml, 100 µg/ml und 300 µg/ml) dem Medium zugesetzt. Nach einer Inkubation von 3, 5 und 7 Tagen wurde die metabolische Aktivität der Zellen (NAD(P)H-Gehalt) bestimmt. Hierzu wurden pro Well 15 µl MTS-Reagenz zugegeben und die Zellen wurden 3 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 492 nm gemessen.

2.2.5 Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie

Pro Ansatz wurden je 1 Million Hep3B- und Caco2-Zellen in Zellkulturschalen ausgesät. Das Zellkulturmedium wurde jeweils mit 30 µg/ml Calcium-, Magnesium-, Strontium- oder Natrium-polyP supplementiert. Zellen in polyP-freiem Medium dienten als Kontrolle. Nach einer Inkubation von 7–9 Tagen wurden die Zellen geerntet, fixiert und bis zur Messung bei –20 °C gelagert. Für die Messung am Durchflusszytometer wurden die Zellen mit PBS gewaschen, danach 20 min mit RNAase (Konzentration 0,1 mg/ml) bei 37 °C inkubiert und anschließend mit DAPI-Farbstoff (Konzentration 2 mg/ml) gefärbt. Die Messung erfolgte am BD-LSR-Fortessa-Durchflusszytometer. Die Auswertung wurde mit der Software FlowLogic durchgeführt.

2.2.6 Bestimmung der Zellproliferation von Hep3B-Zellen

Pro Ansatz wurden 3 Millionen Hep3B-Zellen in 6 ml HHBS (Hank's Buffer mit 20 mM Hepes) aufgenommen und mit CytoPainter-Cell-Proliferation-Staining-Reagenz gefärbt.

Danach wurden die Zellen über 30 Minuten in Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Farbstoff abgesaugt und 6 ml HHBS dazugegeben. Nach dem erneuten Zentrifugieren wurden 30 ml Kulturmedium dazugegeben und es wurde jeweils 1 ml der Lösung pro Well in 6 Well-Platten pipettiert. Pro Well wurden zusätzlich 2 ml Medium zugegeben. Danach erfolgte die mikroskopische Prüfung der Fluoreszenz. Es wurden jeweils

Na-, Ca-, Mg-, und Sr-polyP in der Konzentration von 30 µg/ml dazugegeben. Die Zellen wurden daraufhin im Brutschrank bei 37 °C für weitere 2, 3, 4 oder 5 Tage inkubiert.

Am jeweiligen Analysetag wurde das Medium abgenommen, die Zellen wurden mit 1 ml PBS gewaschen und mit 0,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung pro Well behandelt. Am Ende wurden die Zellen in 500 µl PBS aufgenommen, durch ein FACS-Sieb gegeben und im BD-LSR-Fortessa-Durchflusszytometer im Pacific-Blue-Kanal analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software FlowLogic.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Auswirkungen der Polyphosphat-Applikation auf den Metabolismus der Hep3B- und Caco2-Zelllinien mittels MTS-Assay

Theoretisch können Polyphosphate neben Glukose als zusätzliche Energielieferanten dienen (Müller et al. 2016b). Daher wurde zunächst der Einfluss verschiedener polyP-Substrate auf den Metabolismus von Hep3B- (Leberzelllinie) und Caco2-Zellen (Darmzelllinie) untersucht. Hierzu wurde ein MTS-Assay durchgeführt. Bei dieser Analyse wird die Menge der Reduktionsäquivalente NADH und NADPH bestimmt, welche ein Maß für die metabolische Aktivität der Zelle darstellt. Zunächst wurde daher eine Titration verschiedener polyP-Substrate zu verschiedenen Zeitpunkten (3, 5 und 7 Tage) in Hep3B- und Caco2-Zellen durchgeführt. Als Kontrolle dienten Zellen ohne polyP-Substitution. Bei den Hep3B-Zellen konnte nach drei Tagen Inkubation mit den verschiedenen polyPs ein Anstieg der zellulären NAD(P)H-Konzentrationen beobachtet werden (Abbildung 7). Dies ist ein Indikator für einen gesteigerten Metabolismus in den behandelten Zellen. Der deutlichste Anstieg in der NAD(P)H-Konzentration war bei einer Konzentration von 30 µg/ml für Ca-, Mg-, Sr- und Na-polyP zu verzeichnen. Ca-polyP zeigte bei dieser Konzentration einen Anstieg der NAD(P)H-Konzentration von 30 %, Mg-polyP von 42,5 %, Sr-polyP von 44,8 % und Na-polyP von 43,9 % im Vergleich zur Kontrolle ohne polyP.

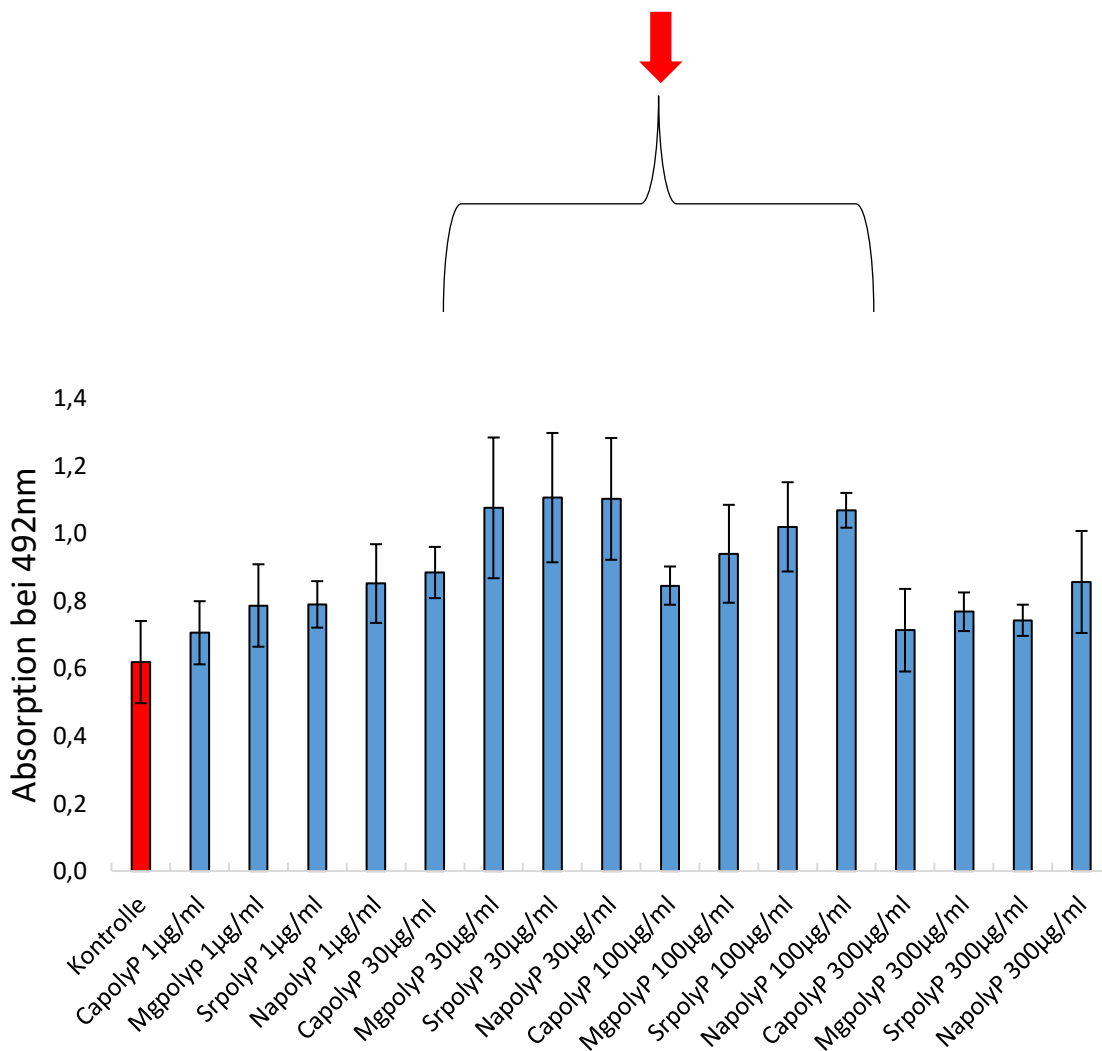


Abbildung 7 Metabolische Aktivität von Hep3B-Zellen nach 3 Tagen Inkubationszeit in Gegenwart von Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (1 µg/ml, 30 µg/ml, 100 µg/ml und 300 µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienten als Kontrolle; n = 3 bei MW ± SA.

Nach 5 Tagen Inkubationszeit zeigten die mit polyP behandelten Zellen eine deutliche Steigerung des Metabolismus. Wieder zeigten sich die höchsten NAD(P)H-Konzentrationen für eine Behandlung der Hep3B-Zellen mit 30 µg/ml polyP. Hervorzuheben ist, dass am fünften Tag auch Ca-polyP-Inkubation zu einem sehr deutlichen Anstieg der NAD(P)H-Konzentration führt. Die NAD(P)H-Konzentration ist um 52,6 % bei Ca-polyP, 47,6 % bei Mg-polyP, 56,1% bei Sr-polyP und 57,8 % bei Na-polyP im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Bemerkenswert ist auch, dass jetzt ähnliche Zunahmen auch für eine Zugabe von 100 µg/ml polyP zu verzeichnen sind. Ca-polyP zeigte bei dieser Konzentration einen Anstieg der NAD(P)H-Konzentration von 45,9 %, Mg-polyP von 52,9 %, Sr-polyP von 53,5 % und Na-polyP von 44,9 % im Vergleich zur Kontrolle ohne polyP (Abbildung 8).

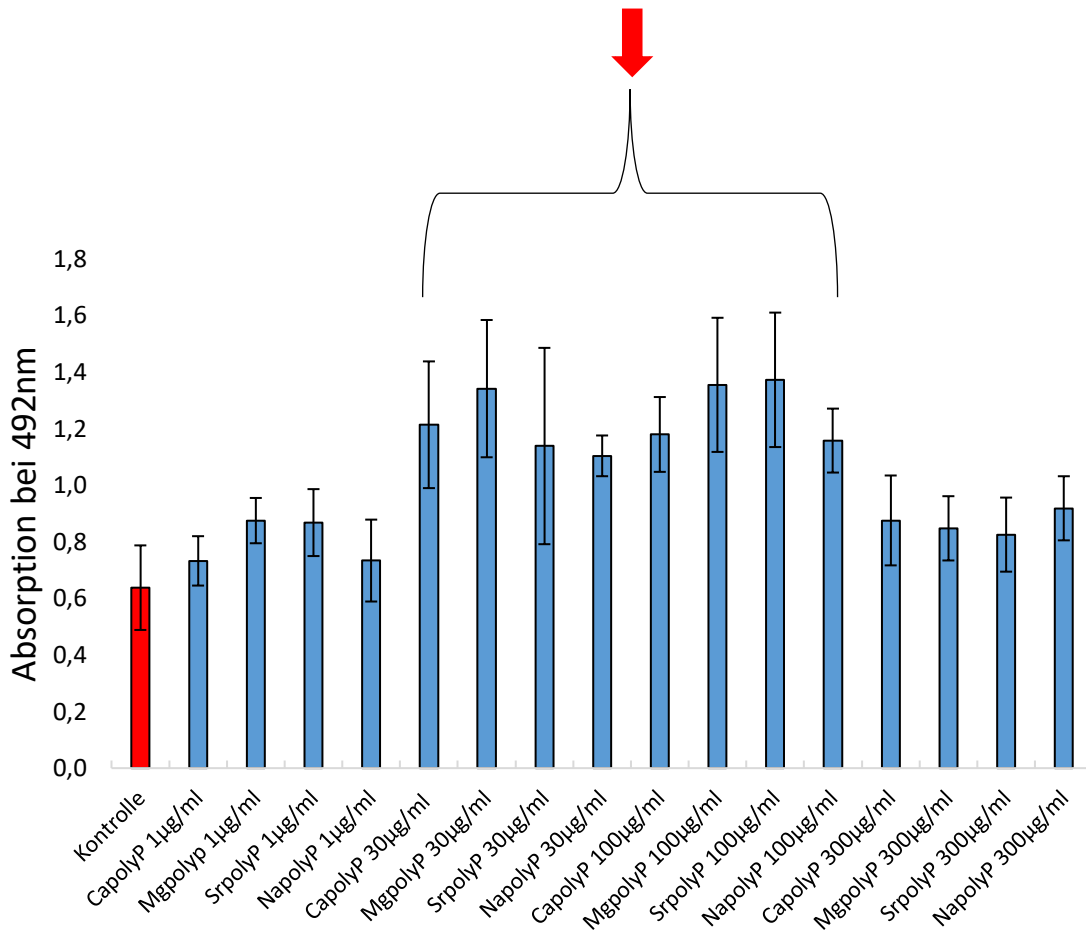


Abbildung 8 Metabolische Aktivität von Hep3B-Zellen nach 5 Tagen Inkubationszeit in Gegenwart von Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (1 µg/ml, 30 µg/ml, 100 µg/ml und 300 µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienten als Kontrolle; n = 3 bei MW ± SA.

Nach sieben Tagen Inkubation mit den verschiedenen polyP zeigt sich ein ähnliches Bild. Applikation von 30 µg/ml und 100 µg/ml polyP führen zu einer verstärkten zellulären NAD(P)H-Konzentration und somit zu einer gesteigerten metabolischen Aktivität der Hep3B-Zellen (Abbildung 9). Bei einer polyP-Konzentration von 30 µg/ml ist die NAD(P)H-Konzentration um 62,5 % bei Ca-polyP, 67,3 % bei Mg-polyP, 66,4 % bei Sr-polyP und 68,9 % bei Na-polyP im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Ähnliche Anstiege sind auch für eine Zugabe von 100 µg/ml polyP zu verzeichnen. Ca-polyP zeigte bei dieser Konzentration einen Anstieg der NAD(P)H-Konzentration von 66,9 %, Mg-polyP von 70 %, Sr-polyP von 73,3 % und NapolyP von 69,7 % im Vergleich zur Kontrolle ohne polyP.

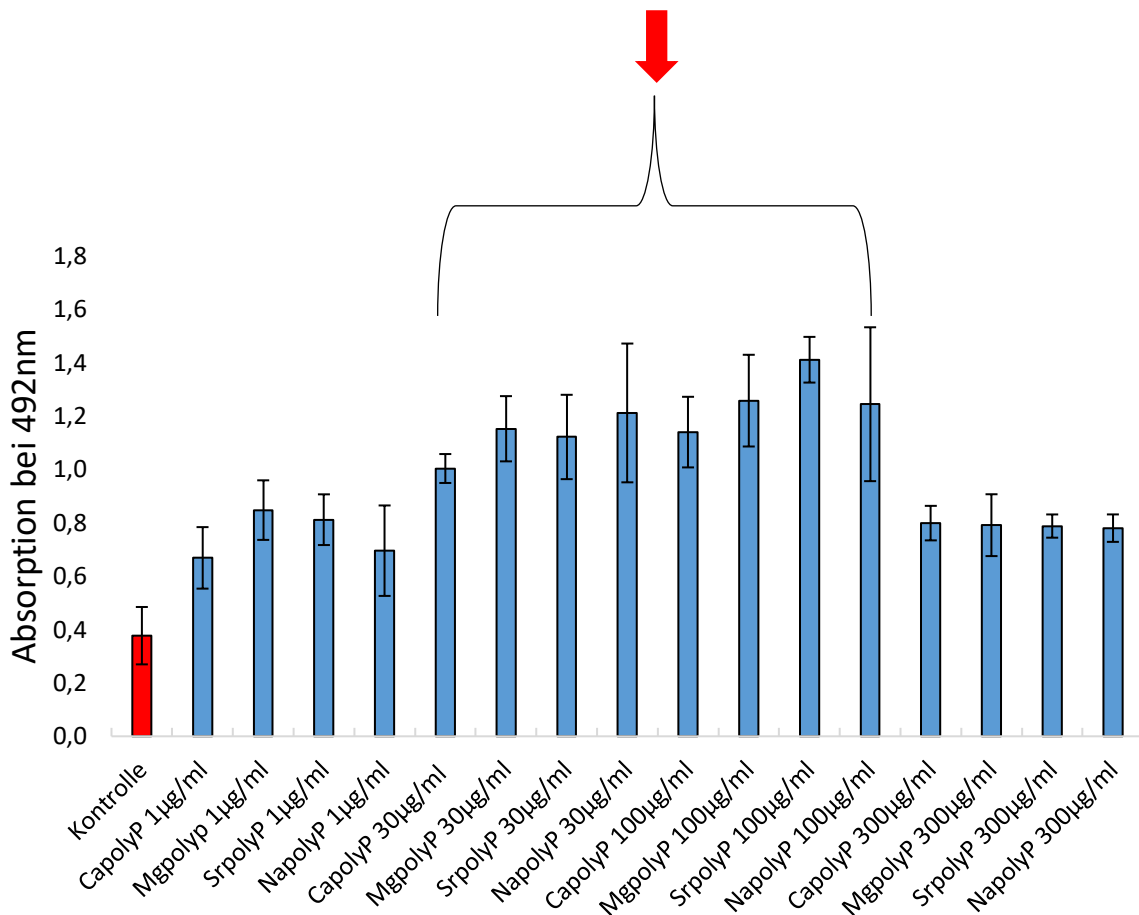


Abbildung 9 Metabolische Aktivität von Hep3B-Zellen nach 7 Tagen Inkubationszeit in Gegenwart von Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (1 µg/ml, 30 µg/ml, 100 µg/ml und 300 µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienten als Kontrolle; n = 3 bei MW ± SA.

Auffällig ist, dass zu allen drei Zeitpunkten eine Applikation von 300 µg/ml polyPs keine zusätzliche Steigerung der metabolischen Aktivität induziert. Das kann wahrscheinlich auf osmotische oder toxische Effekte zurückgeführt werden.

Zusammenfassend ist für Hep3B-Zellen eine Konzentration von 30–100 µg/ml an polyP optimal, um eine bessere Energieversorgung der Zellen zu gewährleisten.

In Caco2-Zellen zeigte sich ein vergleichbares Bild. Nach drei Tagen führte die Zugabe von polyPs in Konzentration von 1–100 µg/ml zu einem leichten Anstieg in der zellulären NAD(P)H-Konzentration (Abbildung 10). Interessant ist, dass wiederum Konzentrationen von 300 µg/ml keinen Effekt auf den NAD(P)H-Gehalt aufweisen. Bei einer polyP-Konzentration von 30 µg/ml ist die NAD(P)H-Konzentration um 25,8 % bei Ca-polyP, 32,5 % bei Mg-polyP, 32,8 % bei Sr-polyP und 26,3 % bei Na-polyP im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Ähnliche

Zunahmen sind auch für eine Zugabe von 100 µg/ml polyP zu verzeichnen. Ca-polyP zeigte bei dieser Konzentration einen Anstieg der NAD(P)H-Konzentration von 22,6 %, Mg-polyP von 30,1 %, Sr-polyP von 27,7 % und Na-polyP von 25 % im Vergleich zur Kontrolle ohne polyP.

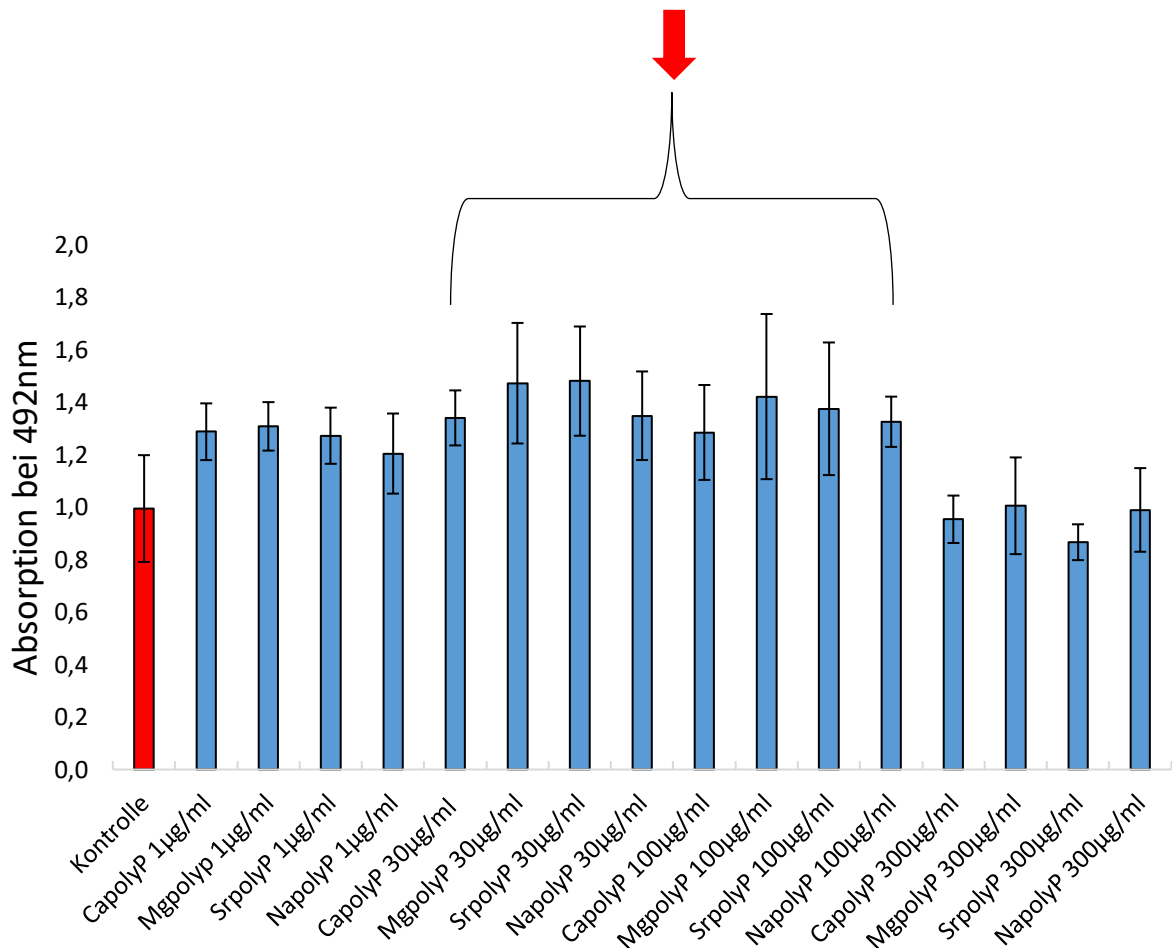


Abbildung 10 Metabolische Aktivität von Caco2-Zellen nach 3 Tagen Inkubationszeit in Gegenwart von Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (1 µg/ml, 30 µg/ml, 100 µg/ml und 300 µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienen als Kontrolle; n = 3 bei MW ± SA.

Nach fünf Tagen sind die Effekte für 30 und 100 µg/ml an polyPs wieder am deutlichsten. Bei einer polyP-Konzentration von 30 µg/ml ist die NAD(P)H-Konzentration um 56,4 % bei Ca-polyP, 56,8 % bei Mg-polyP, 57,4 % bei Sr-polyP und 57 % bei Na-polyP im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Ähnliche Anstiege sind auch für eine Zugabe von 100 µg/ml polyP zu verzeichnen. Ca-polyP zeigte bei dieser Konzentration einen Anstieg der NAD(P)H-Konzentration von 54,7 %, Mg-polyP von 58,5 %, Sr-polyP von 58,3 % und Na-polyP von 60,7 % im Vergleich zur Kontrolle ohne polyP (Abbildung 11).

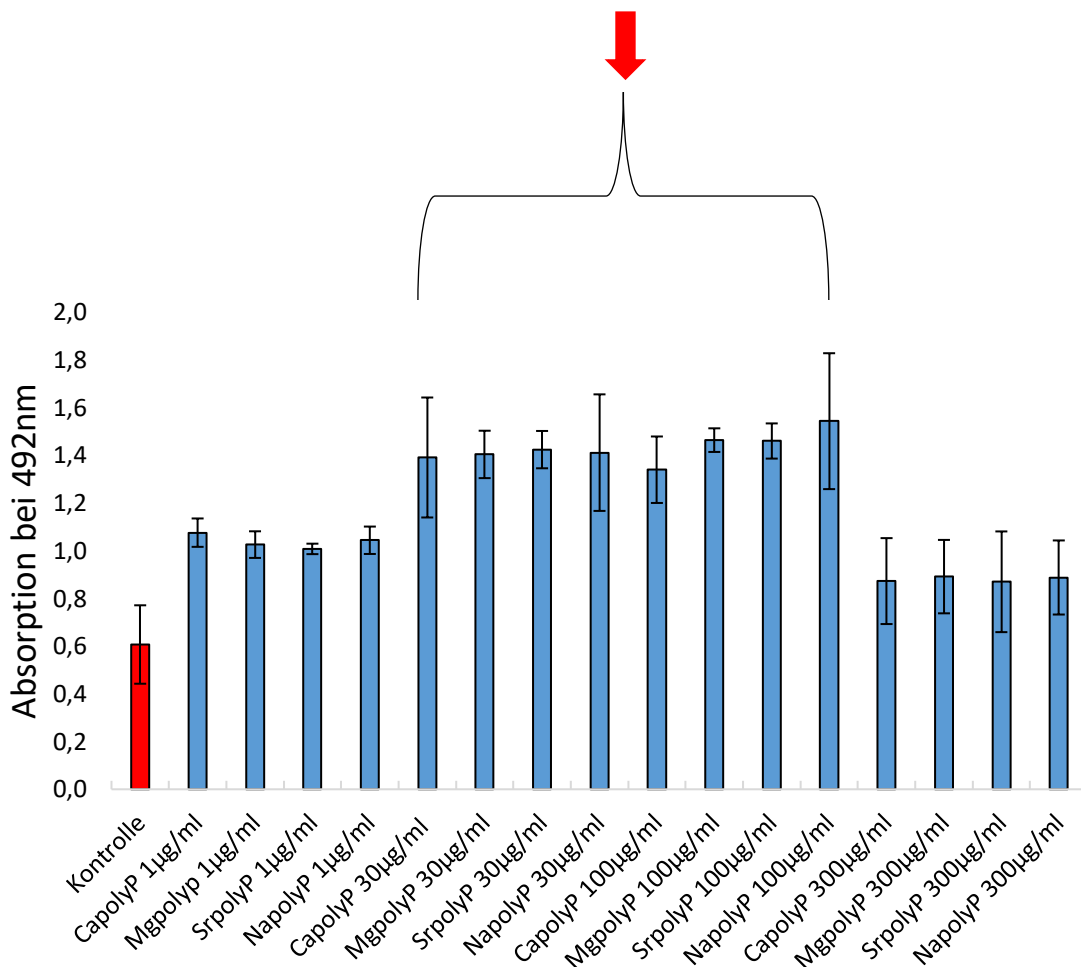


Abbildung 11 Metabolische Aktivität von Caco2-Zellen nach 5 Tagen Inkubationszeit in Gegenwart von Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (1 µg/ml, 30 µg/ml, 100 µg/ml und 300 µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienten als Kontrolle; n = 3 bei MW ± SA.

Nach 7 Tagen ist bei einer polyP-Konzentration von 30 µg/ml die NAD(P)H-Konzentration um 49,8 % bei Ca-polyP, um 60 % bei Mg-polyP, um 58,7 % bei Sr-polyP und um 54,8 % bei NapolyP im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Ähnliche Anstiege sind auch für eine Zugabe von 100 µg/ml polyP zu verzeichnen. Ca-polyP zeigte bei dieser Konzentration einen Anstieg der NAD(P)H-Konzentration von 45 %, Mg-polyP von 55,3 %, Sr-polyP von 56,1 % und NapolyP von 55 % im Vergleich zur Kontrolle ohne polyP (Abbildung 12). Damit zeigt sich auch für Caco2-Zellen, dass eine Applikation von 30–100 µg/ml von polyP am wirkungsvollsten ist, um eine optimale Energiezufuhr zu gewährleisten. 300 µg/ml von polyP induzieren keinen weiteren Anstieg an NAD(P)H. Dies entspricht den Daten, die in Hep3B-Zellen erhoben

wurden. Osmotische oder toxische Effekte könnten hierfür verantwortlich sein. Sowohl in Hep3B- als auch Caco2-Zellen sind keine oder nur geringe Unterschiede zwischen den unterschiedlichen polyP-Salzen zu erkennen. Das bedeutet, dass alle polyP-Salze gleich gut von den Zellen aufgenommen und verstoffwechselt werden können.

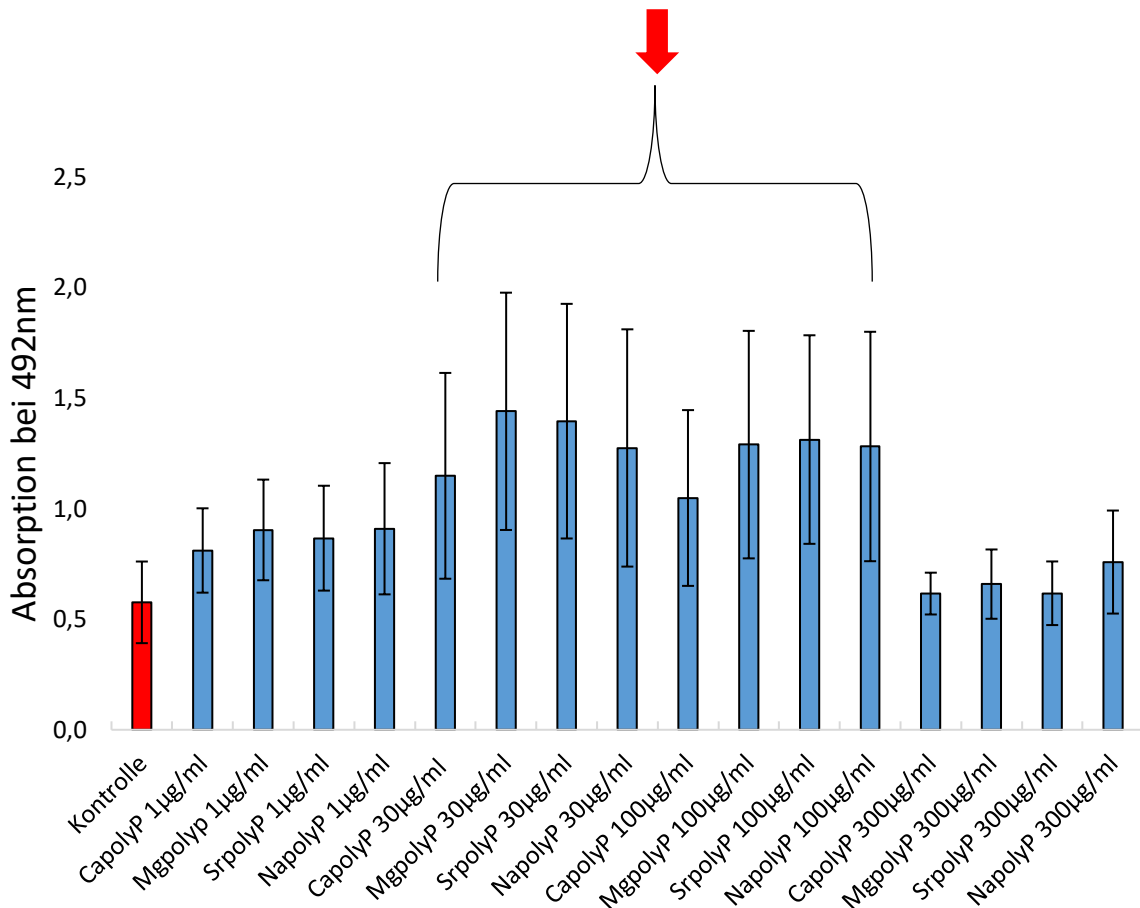


Abbildung 12 Metabolische Aktivität von Caco2-Zellen nach 7 Tagen Inkubationszeit in Gegenwart von Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (1 µg/ml, 30 µg/ml, 100 µg/ml und 300 µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienen als Kontrolle; n = 3 bei MW ± SA.

3.2 Analyse der Auswirkungen der polyP-Applikation auf den Metabolismus der Hep3B- und Caco2-Zelllinien in glukosefreiem Medium

Da die polyP-Substrate die metabolische Aktivität steigern können (Abbildungen 7, 8, 9, 10, 11 und 12), stellte sich die Frage, ob polyP-Substrate auch in der Lage sind, Glukose als

Energielieferant vollständig zu ersetzen. Um diese Frage zu beantworten, wurden die Hep3B- und Caco2-Zellen in Glukose-freiem Medium für 3 Tage kultiviert. Das Medium wurde mit 10 % dialysiertem fötalem Kälberserum (um Glukose aus dem Serum zu depletieren) oder normalen fötalem Kälberserum (FCS) supplementiert.

Zunächst wurden die Hep3B- und Caco2-Zelllinien mit einer Konzentration von 30 µg/ml der polyPs substituiert, da die Daten aus Kapitel 3.1 zeigen, dass diese Konzentration den stärksten Effekt auf den Metabolismus hat. Es wurde Glukose-freies Medium und normales FCS (Abbildung 13 und 15) und Glukose-freies Medium und dialysiertes FCS (Abbildung 14 und 16) benutzt.

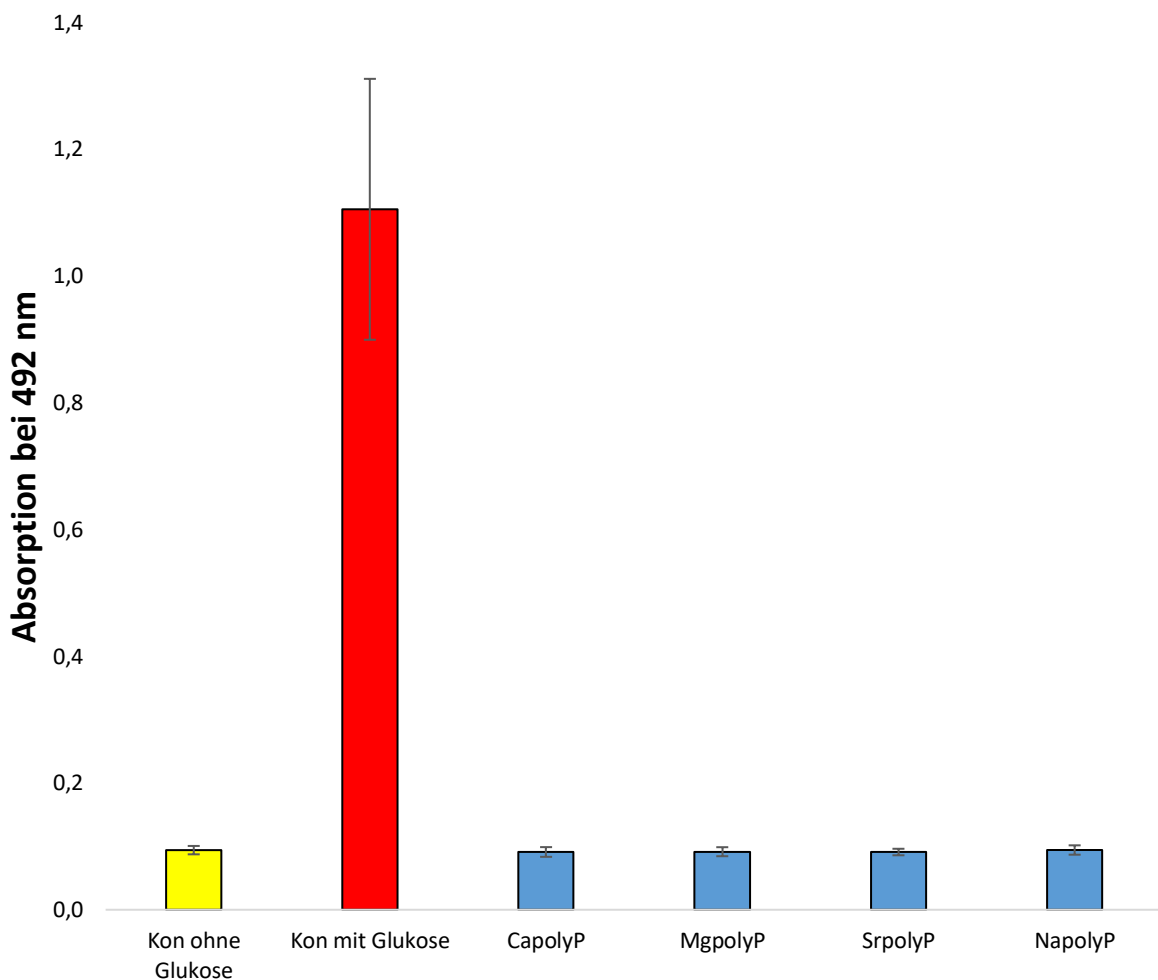


Abbildung 13 Metabolische Aktivität von Hep3B-Zellen nach 3 Tagen Inkubationszeit in Gegenwart von Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (30 µg/ml); die Zellen sind im normalen FCS-Medium ohne Glukose; Zellen ohne polyP-Substitution mit und ohne Glukose dienten als Kontrolle; n = 3 bei MW ± SA.

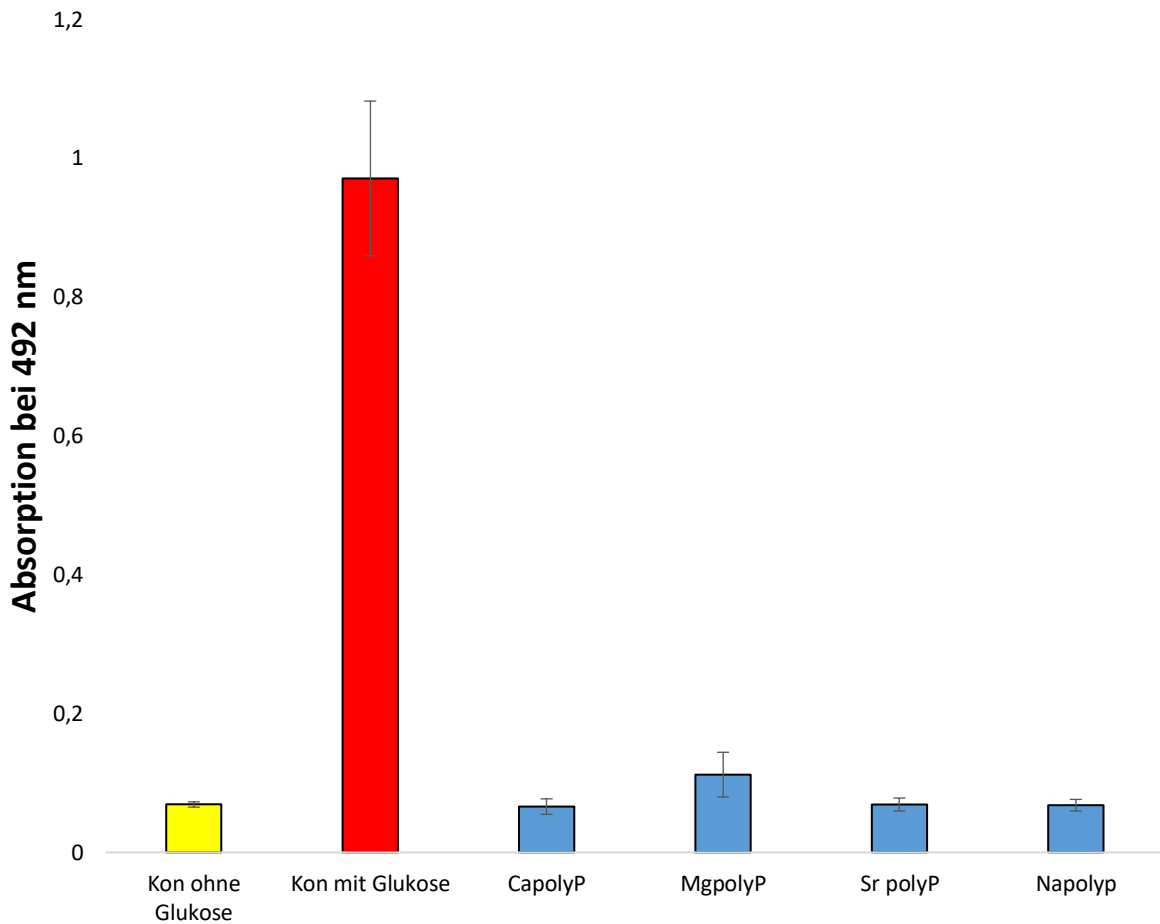


Abbildung 14 Metabolische Aktivität von Hep3B-Zellen nach 3 Tagen Inkubationszeit in Gegenwart von Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (30 µg/ml); Zellen sind im dialysierten FCS-Medium ohne Glukose; Zellen ohne polyP-Substitution mit und ohne Glukose dienten als Kontrolle; n = 3 bei MW ± SA.

Sowohl in Medium, das mit normalem (Abbildung 13) und dialysiertem FCS (Abbildung 14) supplementiert wurde, konnten polyPs nicht Glukose ersetzen. Die Hep3B-Zellen zeigten in Abwesenheit von Glukose nahezu keine metabolische Aktivität mehr. Daher ist davon auszugehen, dass der Zelltod eingeleitet wurde.

Caco2-Zellen zeigten ein identisches Bild (Abbildung 15, 16). Auch hier konnte ein Fehlen von Glukose nicht durch polyPs ausgeglichen werden. Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass polyP-Applikation zu einem deutlichen Anstieg des Metabolismus in Hep3B- und Caco2-Zellen führt. PolyPs stellen jedoch keinen gleichwertigen Ersatz für Glukose dar.

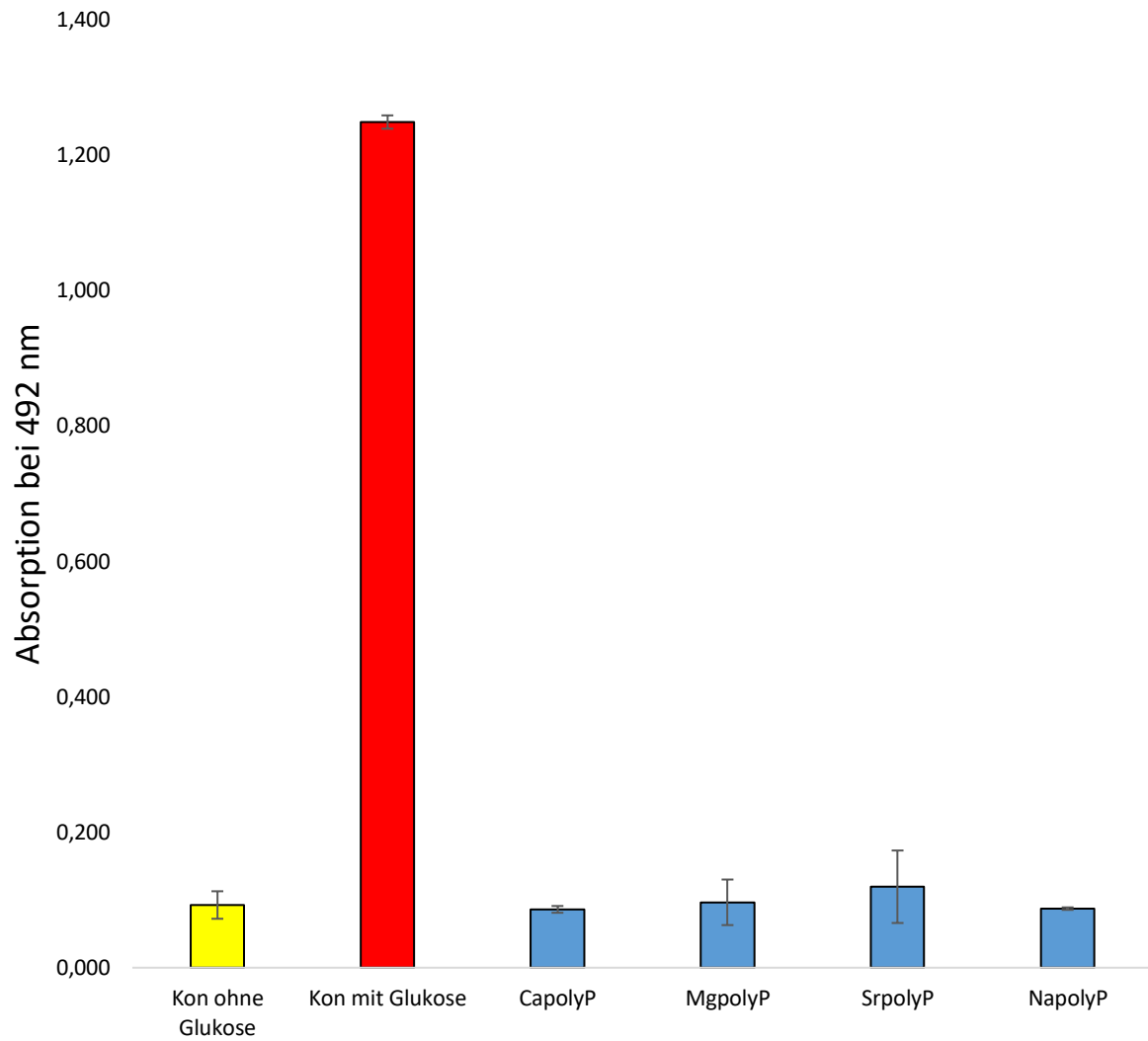


Abbildung 15: Metabolische Aktivität Caco2-Zellen nach 3 Tagen Inkubationszeit in Gegenwart von Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (30 µg/ml); Zellen sind im normalen FCS-Medium ohne Glukose; Zellen ohne polyP-Substitution dienten als Kontrolle; n = 3 bei MW ± SA.

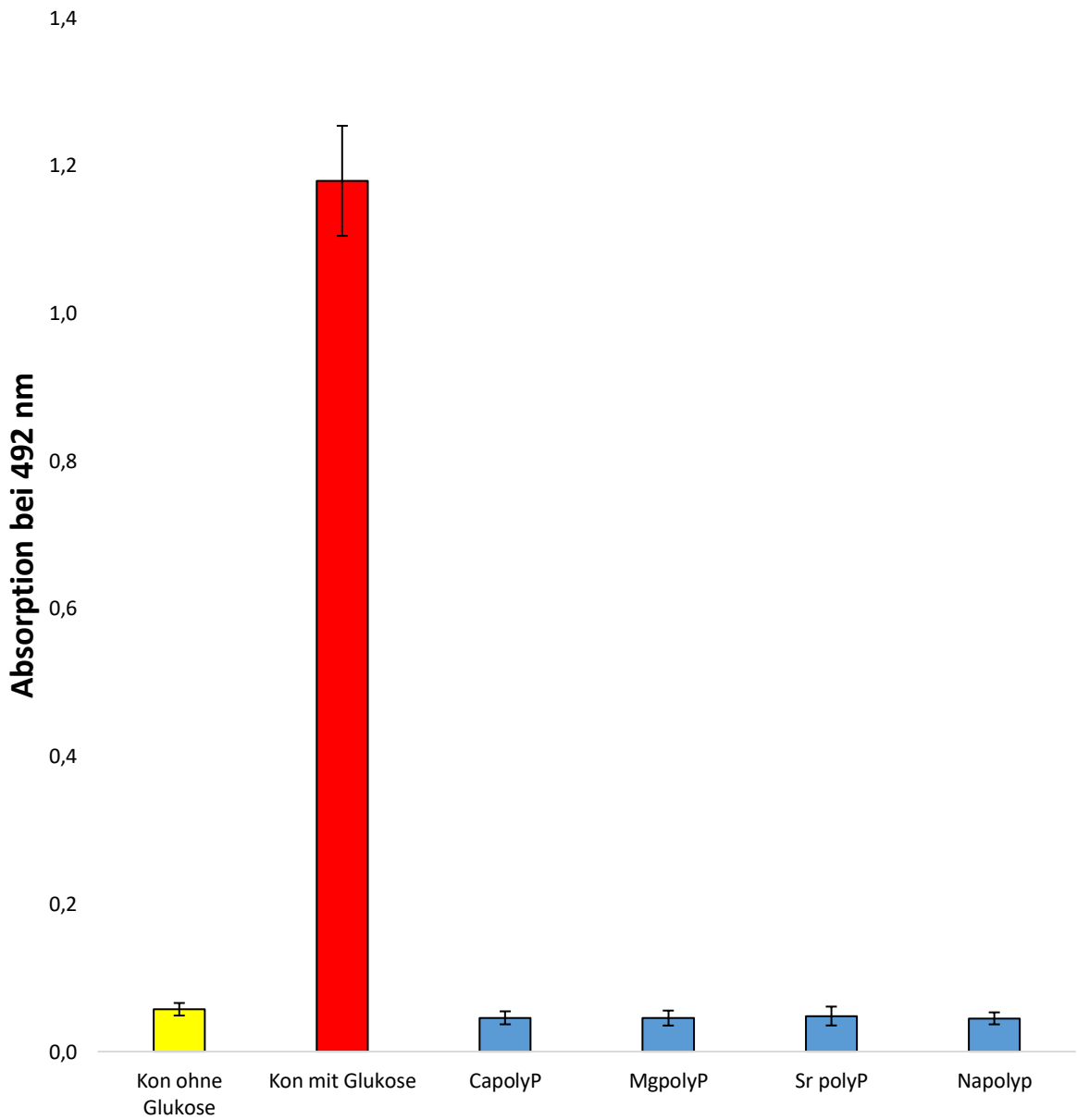


Abbildung 16 Metabolische Aktivität von Caco2-Zellen nach 3 Tagen Inkubationszeit in Gegenwart von Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (30 µg/ml); Zellen sind im dialysierten FCS-Medium ohne Glukose; Zellen ohne polyP-Substitution dienten als Kontrolle; n = 3 bei MW ± SA.

3.3 Analyse der Auswirkungen der Polyphosphat-Substitution auf den Zellzyklus von Hep3B- und Caco2-Zelllinie mittels FACS-basierter DAPI-Färbung

Die Zugabe von polyP erhöht die Produktion von Reduktionsäquivalenten (NAD(P)H), die von der Zelle zur Generierung von ATP genutzt werden können (Kapitel 3.1; Abbildungen 7, 8, 9, 10, 11 und 12). Mehr ATP kann zu einer gesteigerten Proliferation und zu Veränderungen im Zellzyklus führen. Dabei sollten weniger Zellen in der G1-Phase (einfacher Chromosomensatz) verbleiben und sich vermehrt Zellen in der S-Phase (doppelter Chromosomensatz) und G2-Phase (Vorbereitung für nächste Zellteilung) befinden. Um Auswirkungen von polyP-Substitution auf den Zellzyklus von Hep3B- und Caco2-Zellen zu untersuchen, wurde der Zellzyklus betrachtet.

Hep3B- und Caco2-Zellen wurden mit 30 µg/ml Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP substituiert. Die Zellen in polyP-freiem Medium dienten als Kontrolle. Nach einer Inkubation von 7–9 Tagen wurden Hep3B- und Caco2-Zellen mit dem DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) gefärbt, und dann via Durchflusszytometrie (FACS) analysiert.

In Abbildung 17 sieht man die primären FACS-Daten am Beispiel von Caco2-Zellen, die mit Sr-polyP neun Tage inkubiert wurden. Die Fläche P3 stellt die größte Zellpopulation dar, die sich in diesem Fall in der G1-Phase des Zellzyklus befindet. Anhand dieser Datensätze wurde für jede Zellart, jedes polyP und jede Inkubationszeit der Zellzyklus untersucht.

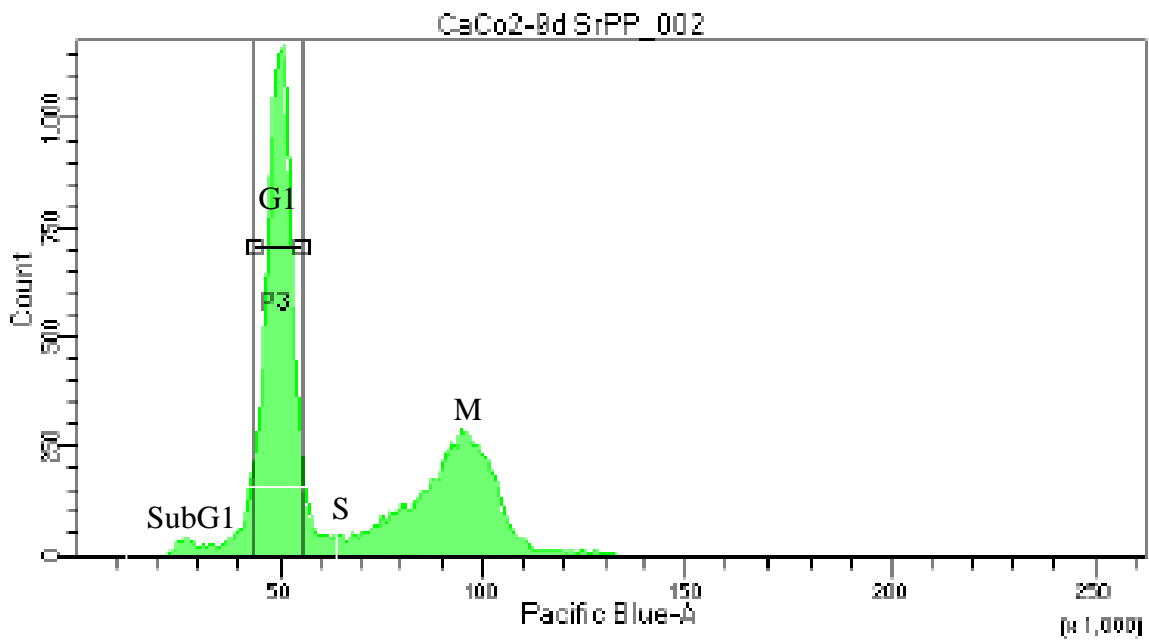


Abbildung 17 Primäre-FACS-Daten vom Zellzyklus von Caco2-Zellen nach 9 Tagen Inkubationszeit substituiert mit Sr-polyP (Konzentration 30 $\mu\text{g/ml}$); P3 stellt die Fläche dar, die die größte Zellpopulation darstellt; die P3-Zellpopulation befindet sich in der G1-Phase des Zellzyklus.

Die Zugabe von polyPs zum Medium führte zu keiner deutlichen Veränderung im Zellzyklus in Hep3B-Zellen (Abbildungen 18–20). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle blieben die Verhältnisse zwischen G1/0-, S-, G2/M-Phase gleich. Wichtig ist aber, dass bei einer Konzentration von 30 $\mu\text{g/ml}$ kein Anstieg im subG1-Peak beobachtet wurde. Diese Population zeigt die toten (apoptotischen) Zellen an. Dieser Befund validiert die zuvor erhobenen Daten und belegt, dass 30 $\mu\text{g/ml}$ keine toxischen Effekte in den Zellen induzieren.

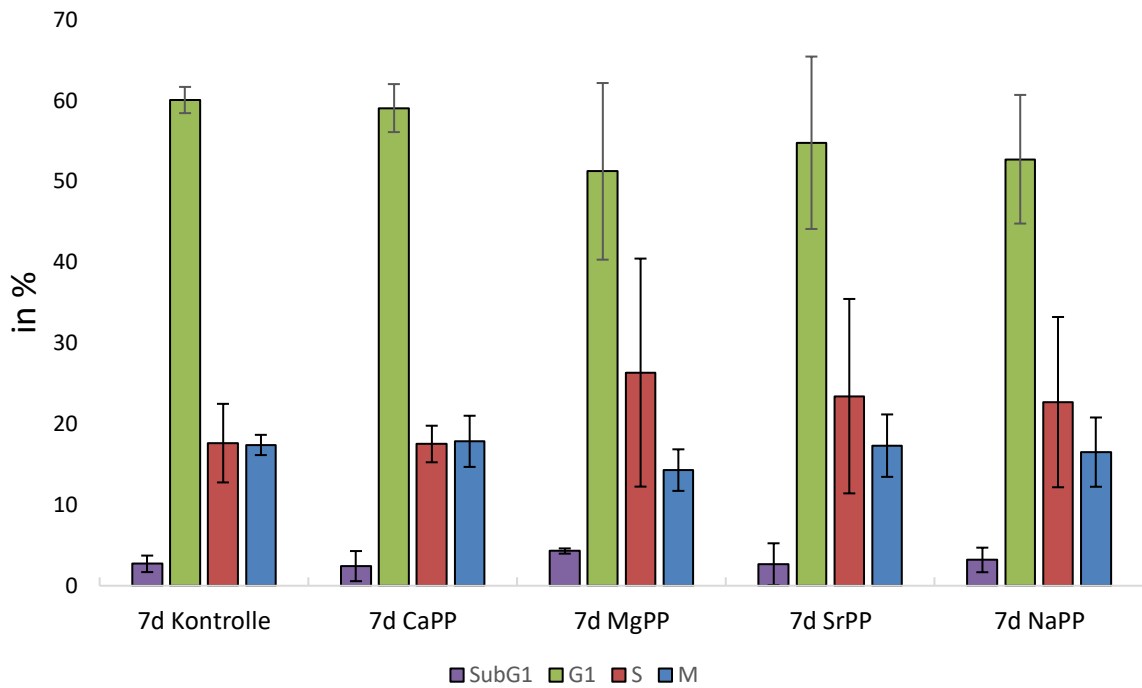


Abbildung 18 Zellzyklus von Hep3B-Zellen nach 7 Tagen Inkubationszeit substituiert mit Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (Konzentration 30 µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienten als Kontrolle; n = 3 bei MW ± SA.

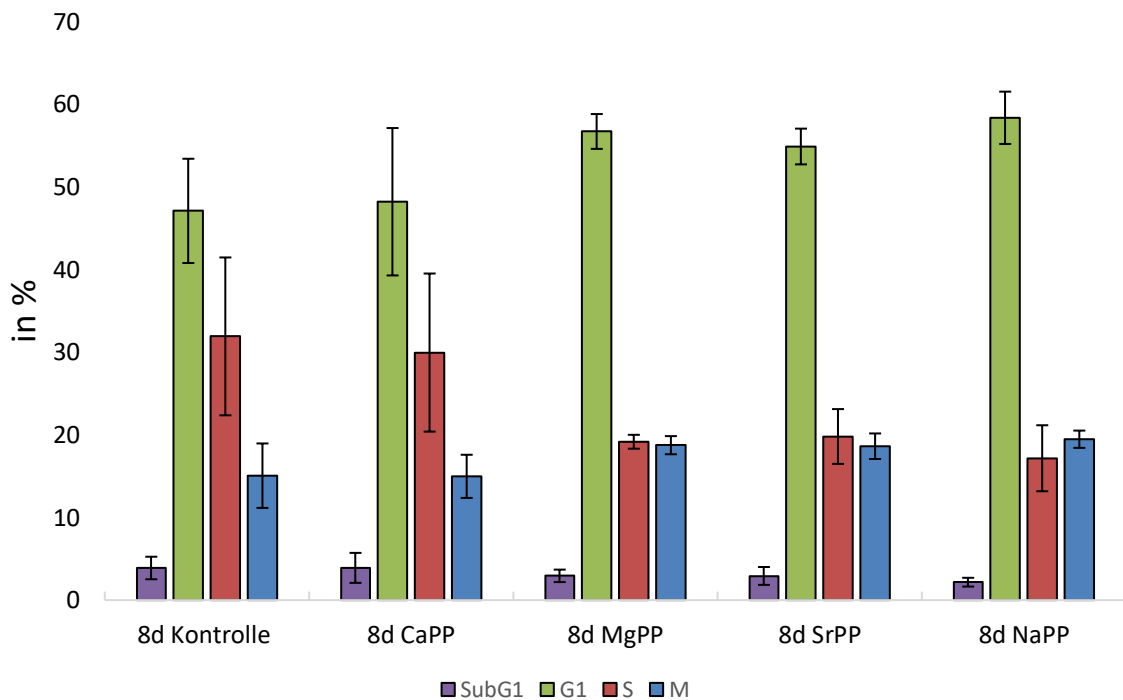


Abbildung 19 Zellzyklus von Hep3B-Zellen nach 8 Tagen Inkubationszeit substituiert mit Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (Konzentration 30 µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienten als Kontrolle; n = 3 bei MW ± SA.

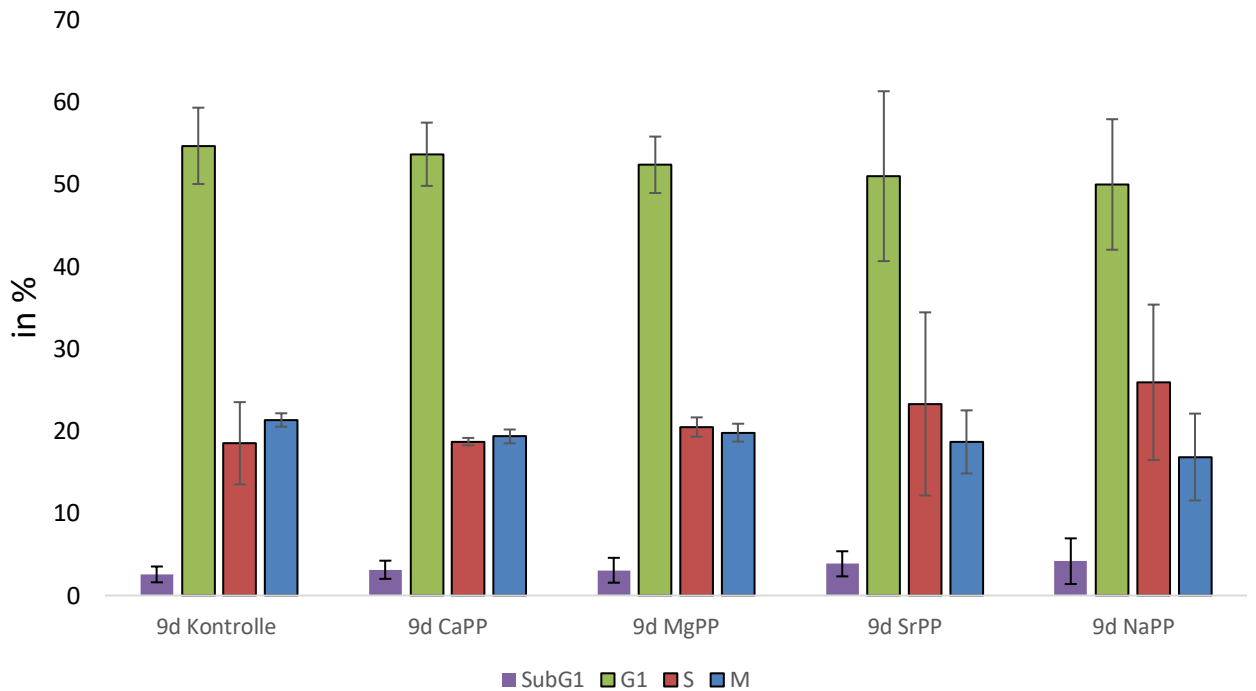


Abbildung 20 Zellzyklus von Hep3B-Zellen nach 9 Tagen Inkubationszeit substituiert mit Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (Konzentration 30 µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienten als Kontrolle; n = 3 bei MW ± SA.

Auch in Caco2-Zellen wurde keine Veränderung im Zellzyklus beobachtet (Abbildungen 21–23). Wichtig auch hier ist, dass die Zugabe von polyPs wiederum keinen toxischen Effekt aufweist. Somit erweist sich auch hier, dass eine Zugabe von 30 µg/ml an polyPs optimal ist, um den Metabolismus und auch die Energieversorgung der Zellen entscheidend zu verbessern.

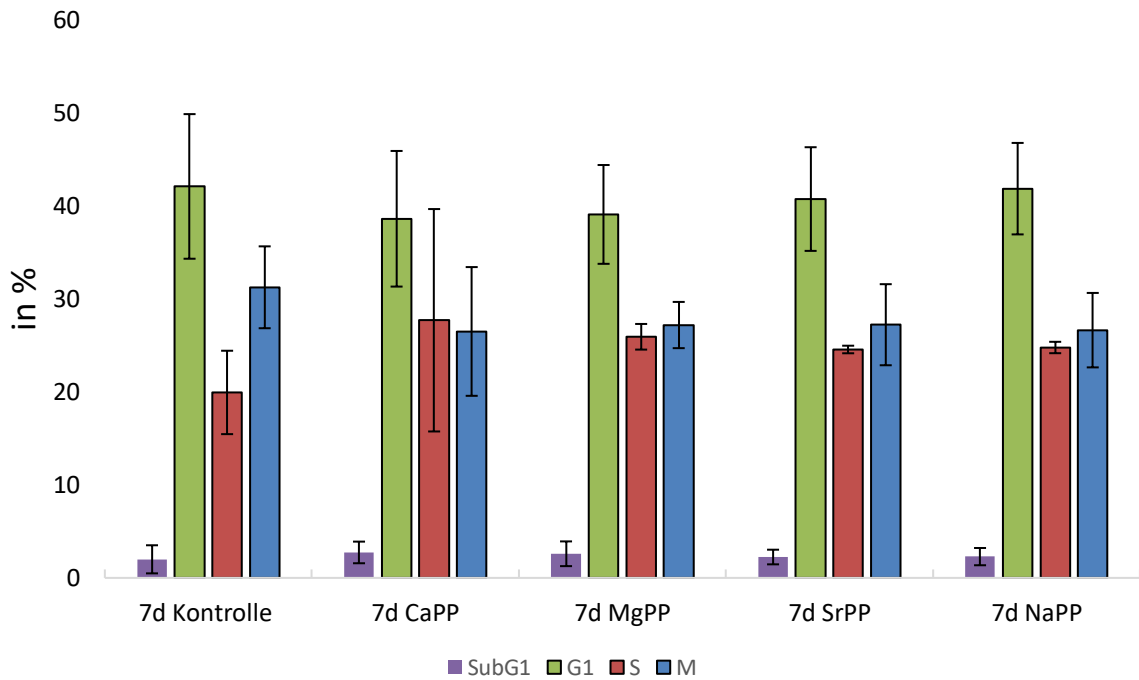


Abbildung 21 Zellzyklus von Caco2-Zellen nach 7 Tagen Inkubationszeit substituiert mit Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (Konzentration 30 µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienten als Kontrolle; n = 3 bei MW ± SA.

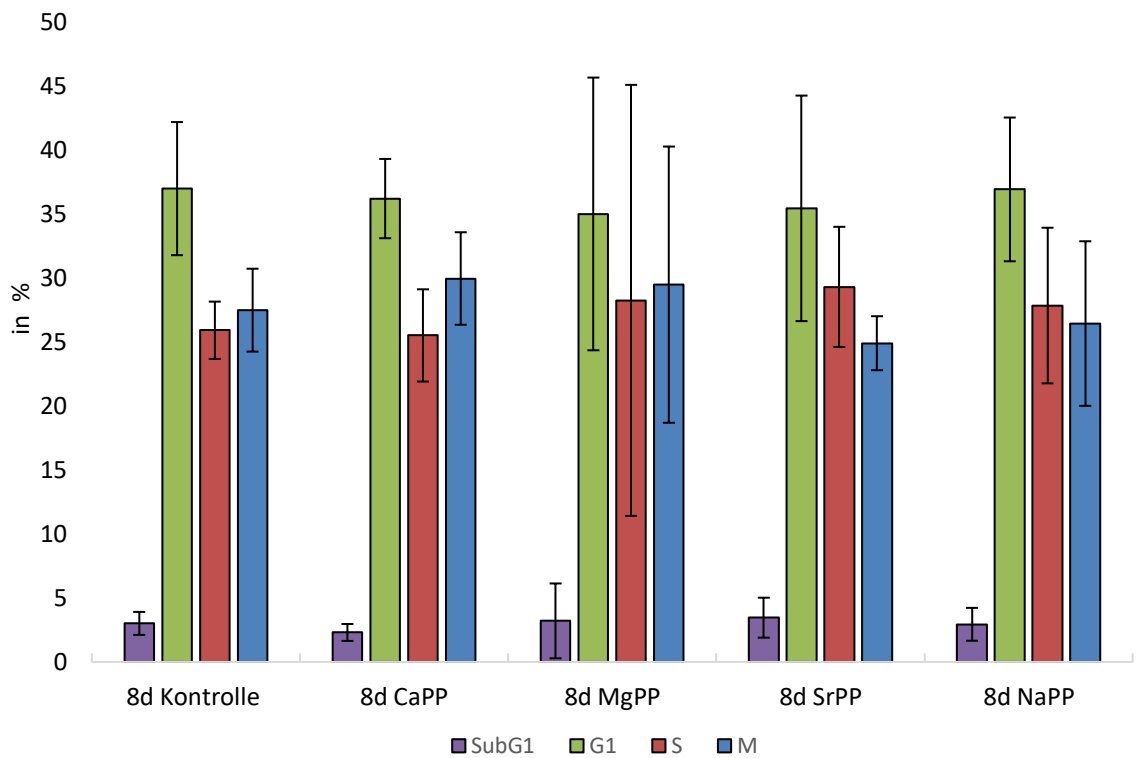


Abbildung 22 Zellzyklus von Caco2-Zellen nach 8 Tagen Inkubationszeit substituiert mit Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (Konzentration 30 µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienten als Kontrolle; n = 3 bei MW ± SA.

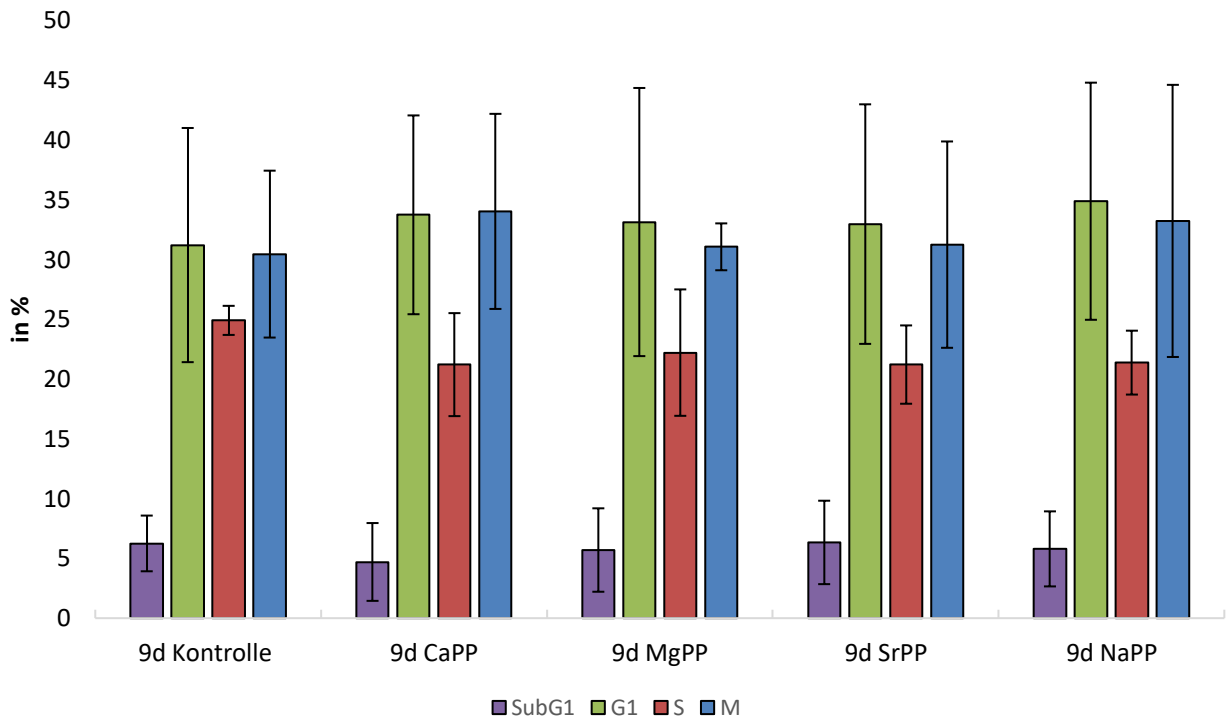


Abbildung 23 Zellzyklus von Caco2-Zellen nach 9 Tagen Inkubationszeit substituiert mit Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (Konzentration 30 µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienten als Kontrolle; n = 3 bei MW ± SA.

3.4 Analyse der Auswirkung von Polyphosphaten auf das Proliferationsverhalten der Hep3B-Zelllinie mittels FACS-basiertem CytoPainter-Proliferationsassay

Um die Auswirkungen von Polyphosphaten auf die Proliferation der Hep3B-Zellen zu untersuchen, erfolgte eine Zugabe von jeweils 30 µg/ml Ca-, Mg-, Sr, und Na-polyP für fünf Tage. Die Zellen in polyP-freiem Medium dienten als Kontrolle. Am jeweiligen Analysetag wurden Hep3B-Zellen mit einem Cell-Proliferation-Staining-Reagenz gefärbt und via Durchflusszytometrie (FACS) analysiert.

Abbildung 24 zeigt die primären FACS-Daten. Hier wird am Beispiel der Zugabe von Mg-polyP gezeigt, wie sich die Proliferation der Hep3B-Zellen am jeweiligen Analysetag änderte. Blau markiert ist die Zellpopulation am ersten Analysetag, rot die Zellpopulation am zweiten Analysetag, grün die Zellpopulation am dritten Analysetag, orange die Zellpopulation am vierten Analysetag und grau die Zellpopulation am fünften Analysetag.

Um die Proliferation zu bestimmen, wurde die Intensität der Färbung (geometrischer Mittelwert der Kurven) bestimmt. Die Zellen teilen den Farbstoff bei jeder Zellteilung auf. Somit zeigt eine Abnahme der Färbung über die Zeit die Proliferation an. Je stärker die Abnahme, desto schneller proliferieren die Zellen (Abbildung 25).

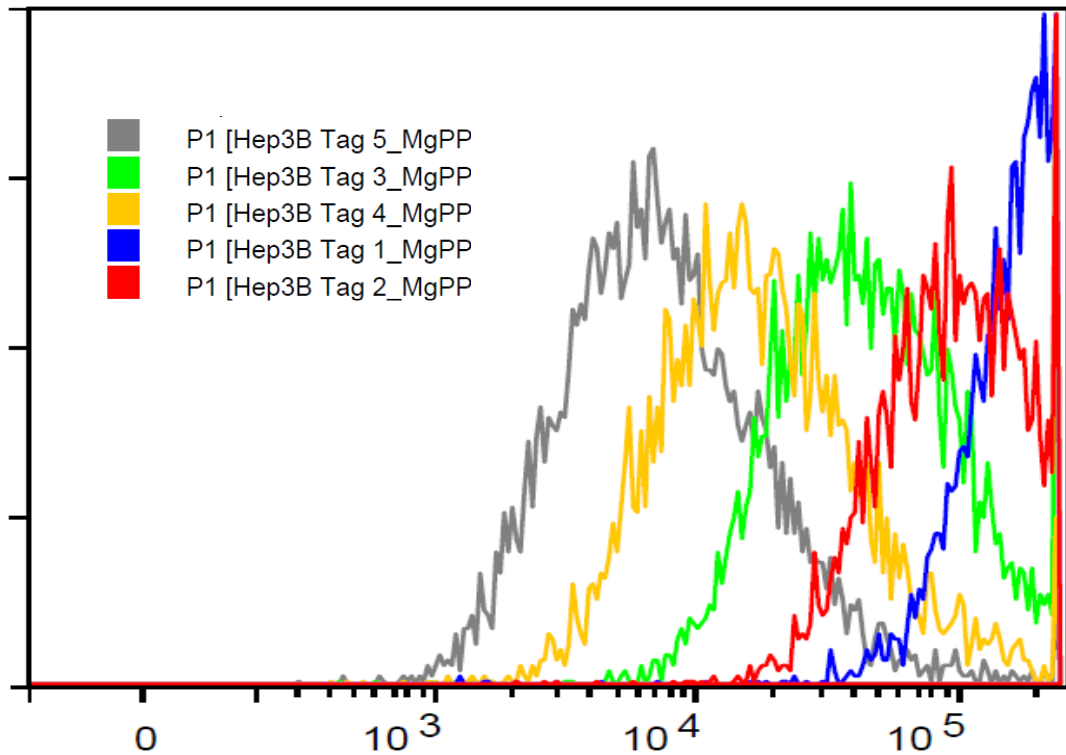


Abbildung 24 Proliferation von Hep3B-Zellen über 5 Tage in Gegenwart von Mg-polyP; Blau, Rot, Grün, Orange und Grau zeigen die Proliferation am jeweiligen Analysetag; die Abbildung wurde mit dem Computerprogramm FlowLogic erstellt.

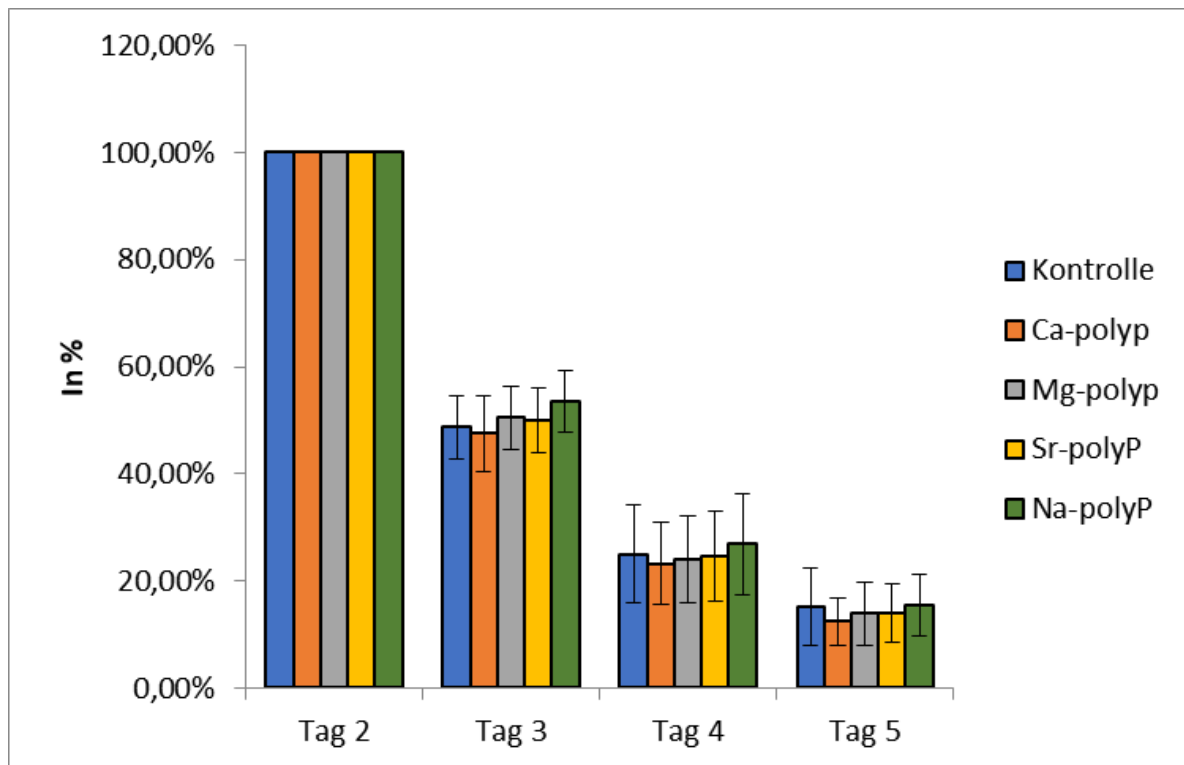


Abbildung 25 Proliferation von Hep3B-Zellen nach Inkubationszeit bis zu 5 Tagen substituiert mit Ca-, Mg-, Sr- oder Na-polyP (Konzentration 30 µg/ml); Zellen ohne polyP-Substitution dienten als Kontrolle; Analysetag 2 diente als Vergleichstag für die Analysetage 3, 4, und 5; n = 3 bei MW ± SA.

Die Proliferationsergebnisse zeigen, dass die Zugabe von Polyphosphaten die Proliferation der Zellen nicht beeinflusst, da die Kontrollzellen ohne Polyphosphate eine ähnliche Proliferationsrate zeigen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass polyPs als zusätzliche Energielieferanten für Zellen dienen können. Auch wenn sie Glukose als Energieträger nicht ersetzen können, steigern sie die Produktion von NAD(P)H. Erhöhte NAD(P)H-Werte sind ein Indikator für einen gesteigerten Metabolismus und eine erhöhte Vitalität der Zellen. 30–100 µg/ml an polyPs haben sich als optimale Konzentration erwiesen. Höhere Konzentrationen führen nicht weiter zu einer Steigerung des Metabolismus. Es gibt keine maßgeblichen Unterschiede zwischen den polyP-Salzen. Alle Verbindungen werden gleich gut von den Zellen aufgenommen. Die Zugabe von 30 µg/ml an polyPs greift weder in den Zellzyklus noch in die Proliferation von Hep3B- oder Caco2-Zellen ein und weist auch keinerlei Toxizität auf. Damit eignen sich polyPs als Mediumzusatz für die Zellkultur und bieten sich als zusätzliche Energiequelle für die 3D-Zellkultur an.

4 Diskussion

4.1 Mögliche Anwendung von polyPs in den Sphäroid-basierten Tumormodellen

Die Entwicklung und Validierung zuverlässiger *in-vitro*-Methoden als Alternative zu konventionellen *in-vivo*-Studien mit Versuchstieren ist zurzeit im Fokus der Wissenschaft (Shao et al. 2020). Konventionelle Studien auf 2D- Zellkulturmodellen sind in ihrer Aussage begrenzt. Das chemisch und räumlich definierte 3D-Netzwerk von extrazellulären Matrixkomponenten, Zell-zu-Zell- und Zell-zu-Matrix-Interaktionen, die die Differenzierung steuern sowie Proliferation und Funktion von Zellen *in vivo* bestimmen, sind unter den vereinfachten 2D-Bedingungen nicht vorhanden. Physiologisch relevante gewebeähnliche Strukturen mit den Funktionen realer Gewebe nachzubilden, kann durch traditionelle 2D-Zellmonolayer nicht erreicht werden. Somit stellt die 3D-Zellkultur eine Brücke dar, die die Lücke zwischen Tiermodellen und Studien am Menschen schließen kann.

Sphäroide werden als Modelle zur Simulation von Merkmalen von Tumormikroregionen, intervaskulären Domänen oder Mikrometastasen (Fischbach et al. 2007; Friedrich et al. 2007; Vinci et al. 2012; Shao et al. 2020) getestet. Sutherland wendete diese Technik erstmals 1986 als Tumormodell an (Sutherland R. M. et al. 1986). Seitdem wurden verschiedene Methoden zur Erzeugung von Tumor-Sphäroiden verwendet: spontane Aggregation (Deisboeck et al. 2001), Spinnerflaschen (Wartenberg et al. 2001), rotierende Zellkultursysteme (Mazzoleni et al. 2009c; Unsworth und Lelkes 1998; Shao et al. 2020), Poly-2-Hydroxyethylmethacrylat- (Poly-Hema-), beschichtete Platten (Ivascu und Kubbies 2006; Xiang et al. 2011), hängende Tropfen, Liquid Overlay auf Agar (Li et al. 2011; Friedrich et al. 2009; Weiswald et al. 2010), Gel-/Matrix-basierte Kulturen (Lee et al. 2007), Gerüste aus Polymeren (Fischbach et al. 2007) und mikrostrukturierte Platten (Hardelauf et al. 2011; Matsuda et al. 2010).

Es wurde eine Vielzahl von Methoden angewandt, um die Zellen in 3D-Aggregaten oder Sphäroiden wachsen zu lassen (Bates 2000). Im Wesentlichen werden Bedingungen benötigt, die die Adhäsionskräfte zwischen den Zellen stärken. Eine der einfachsten Methoden ist die Beschichtung von Kunststoff-Gewebekulturoberflächen mit einer dünnen Schicht aus Agarose oder ähnlichen Substraten. Unter diesen Bedingungen bilden viele Zelltypen, insbesondere von Tumoren abgeleitete Zelllinien, oft spontane homotypische Aggregationen (Mazzoleni et al. 2009a). Typischerweise bilden diese mehrschichtigen Sphäroid-Strukturen Formationen bis zu einem Durchmesser von etwa einem Millimeter. Die Größe der 3D-Strukturen wird hierbei durch die Verfügbarkeit von Nährstoffen und Sauerstoff begrenzt (Kim et al. 2004).

Vinci et al. haben eine komplette Reihe dreidimensionaler *in-vitro*-Sphäroid-basierter Assays zur Messung von Tumorwachstum, Migration, Invasion und Tumorangiogenese untersucht, und deren Anwendbarkeit in Hochdurchsatz-Formaten untersucht (Vinci et al. 2012). Es zeigte sich dabei die Anwendbarkeit der Assays zur Messung von Resistenz und Sensitivität von Tumorzellen in Bezug auf verschiedene Therapeutika. Sphäroide eigneten sich besonders gut zur Untersuchung des Tumor-Micro-Environments (Howes et al. 2007; Moser et al. 2007; McCreedy et al. 2010; Jones et al. 2005; Vinci et al. 2012).

Zurzeit liegt der Fokus der Entwicklungen von 3D-Zellkulturmodellen in auf Organoiden. Organoide sind *in vitro* kultivierte dreidimensionale Strukturen, die wichtige Aspekte von *in vivo*-Organen rekapitulieren. Sie können aus pluripotenten Stammzellen und aus adulten Stammzellen hergestellt werden (Schutgens und Clevers 2020). Organoide, die aus adulten Stammzellen gewonnen werden, nutzen den Prozess der Geweberegeneration, der von diesen Zellen determiniert wird, und können direkt aus dem gesunden oder kranken Epithel vieler Organe hergestellt werden (Schutgens und Clevers 2020). Das Anwendungsspektrum von Organoiden umfasst die Modellierung von Gewebephysiologie und Krankheiten, einschließlich maligner, erblicher und infektiöser Krankheiten (Schutgens und Clevers 2020). Die Biobanken mit von Patienten stammenden Tumor-Organoiden werden u.a. zur Medikamentenentwicklung eingesetzt und vielversprechend für die Entwicklung einer personalisierten und regenerativen Medizin (Schutgens und Clevers 2020) genutzt.

Limitierend ist in Sphäroiden und Organoiden vor allem die Energieversorgung der Zellen in der 3D-Zellkultur. Da Gefäße fehlen, entsteht im Inneren der 3D-Zellkultur eine Unterversorgung mit Nährstoffen. Genau hier kann eine Substitution mit polyPs als alternativer Energielieferant Abhilfe schaffen. Wie in den Versuchen in den Abbildungen 7–12 gezeigt, steigern polyPs die Produktion an Reduktionsäquivalenten (wie NADH und NADPH), die dann ihrerseits zur zellulären Energiegewinnung u. a. (NADH) mittels oxidativer Phosphorylierung genutzt werden können. Da dieser Vorgang aber sauerstoffabhängig ist und dieser auch nur vermindert im Zentrum der 3D-Kultur vorliegt, müssen hier noch detaillierte Studien folgen, die die Situation im Inneren der 3D-Kultur untersuchen. Da aber auf jeden Fall von einer optimierten Energieversorgung der Zellen auszugehen ist, werden polyPs definitiv zur Verbesserung dieser Zellkulturmodelle beitragen.

4.2 Mögliche Anwendung von polyP für Scaffold-basierte Tumor-Modelle

Das Ziel eines Scaffolds ist es, Eigenschaften zu erzeugen, die die physiologischen Bedingungen der extrazellulären Matrix nachbilden und als Gerüst für das Anwachsen der Zellen dienen (Haycock 2011).

Scaffolds können auch als 3D-*in-vitro*-Modell verwendet werden, z. B. bei der Testung von Medikamenten (Cheah et al. 2004; Ambekar und Kandasubramanian 2019). Hier besteht die Notwendigkeit, die native Gewebestruktur genau zu reproduzieren und die Zellen in einem bestimmten Stadium der Differenzierung zu erhalten.

Hydrogel-Scaffolds sind z. B. attraktiv für den Zelltransport und für die Gewebeentwicklung, weil sie hoch hydratisierte und dreidimensionale Netzwerke aus Polymeren darstellen, die eine Möglichkeit Platz für die Anhaftung, Proliferation und Differenzierung von Zellen bieten. Sie können auch chemische Signale an die Zellen senden (Drury und Mooney 2003). Diese Eigenschaft der Scaffolds könnte man nutzen, wenn man polyP direkt in die Scaffolds verdruckt. Das Verdrucken von polyP in die Scaffolds könnte einen positiven Effekt auf das Wachstum von Zellen im 3D-Tumormodell haben, da ich in den Hep3B- und Caco2-Modellen zeigen konnte, dass der Metabolismus und die Zellvitalität durch polyPs deutlich gesteigert werden können (Abbildungen 7–12), ohne dabei Einfluss auf die Zellphysiologie zu nehmen oder toxisch zu wirken (Abbildungen 13–25).

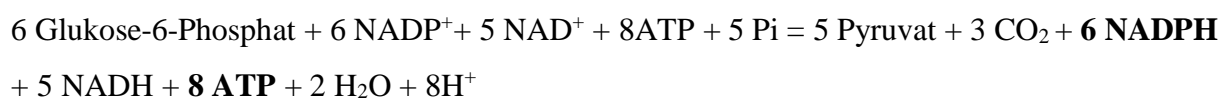
4.3 Herausforderung der Energieversorgung

Die berühmten Experimente von Joseph Priestley aus dem Jahr 1772 zeigten deutlich die Notwendigkeit des Vorhandenseins von Sauerstoff für das Überleben von Tieren (Malda et al. 2007; Joseph Priestley 1772). Er zeigte, dass eine Maus in einer versiegelten Glocke ersticken würde, aber dass die Maus länger überleben würde, wenn man zusätzlich eine Pflanze unter die Glocke stellte. Schon damals postulierte Priestley, dass es einen entscheidenden Bestandteil der Luft gab, der das Überleben der Maus in der Glocke ermöglichen konnte. Dieser wurde später als Sauerstoff identifiziert (A. Lavoisier 1789; Malda et al. 2007). Das Verständnis für die Rolle des Sauerstoffs wurde später durch die Klärung der Rolle verschiedener zellulärer Signalwege erweitert (Malda et al. 2007). Säugetierzellen benötigen Sauerstoff für die effiziente Erzeugung von Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP). Während der Zellatmung wird ATP durch Glykolyse im Zytoplasma erzeugt und anschließend durch den Krebs-Zyklus in den Mitochondrien verbraucht. Unter aeroben Bedingungen entstehen 36

ATP-Moleküle pro Molekül Glukose, während unter anaeroben Bedingungen nur 2 ATP pro Glukosemolekül entstehen. Die Nähe der Zelle zu einer Sauerstoffquelle reguliert die Prozesse der Energieentstehung (Malda et al. 2007).

Ein Mangel an Sauerstoff kann dazu führen, dass nicht genügend ATP zur Aufrechterhaltung essenzieller Zellfunktionen zur Verfügung steht.

Da polyPs die metabolische Aktivität der Caco2- und Hep3B-Zellen steigern können (Abbildungen 7–11), könnten sie theoretisch einen Sauerstoffmangel im Inneren einer 3D-Struktur ausgleichen. PolyPs induzieren einen Anstieg an den Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH. Zwar dient im allgemeinen NADH als Reduktionsäquivalent zur Energiegewinnung in der oxidativen Phosphorylierung und kann nur unter Sauerstoffverbrauch zur ATP-Produktion eingesetzt werden, aber NADPH kann auch anderweitig verwendet werden. NADPH wird benötigt, um energiereiche Fettsäuren zu synthetisieren, die Reduktion von Fettsäuren zum korrespondierenden Fettalkohol durch die Acyl-CoA-Reduktase zu ermöglichen und um Aminosäuren abzubauen und zu recyceln (DL Nelson 2008, S. 558–563). All dies sind energieabhängige Prozesse, bei denen NADPH benötigt wird. Noch wichtiger ist, dass NADPH auch als Marker für eine erhöhte Glykolyse dient. Um eine ungenügende Energieversorgung zu überbrücken, kann die Zelle die Glykolyse steigern. Dies kann z. B. bei Sauerstoffmangel eintreten. Über die Glykolyse werden pro Glukose-Molekül 2 ATP gewonnen und es entsteht Pyruvat. Unter ausreichender Sauerstoffzufuhr wird über Pyruvat im Zitronensäurezyklus NADH gewonnen, welches für die Produktion von 34 weiteren ATP verwendet wird. Kommt es aber zu einer Reduktion oder gar einem Stopp der oxidativen Phosphorylierung, muss die Glykolyse beschleunigt werden, so dass das dort produzierte ATP ausreicht. Das Pyruvat wird dann als Baustein für Aminosäuren und Lipide benutzt (DL Nelson 2008, S. 558–563). Eine Option ist, dass die Zelle Glukose über eine Kombination des Pentose-Phosphat-Weges und der Glykolyse abbaut. Hierbei wird Glukose-6-Phosphat zu Ribulose-5-P umgebaut. Ribulose-5-Phosphat kann dann in Fructose-6-Phosphat umgewandelt werden. Fructose-6-Phosphat wird dann weiter in der Glykolyse verstoffwechselt. Beim ersten Schritt, dem Umbau von Glukose-6-Phosphat zu Ribulose-5-Phosphat, entstehen 6 NADPH. Zusammenfassend bedeutet dies:



Es entstehen also 8 ATP und 6 NADPH. Damit ist NADPH ein Indikator für diesen Stoffwechselweg (DL Nelson 2008, S. 558–563). Eine Initiierung dieses Stoffwechselweges

durch polyPs kann dann das zelluläre Überleben unter schwierigen Bedingungen (niedrigem Sauerstoffpartialdruck) ermöglichen.

4.4 PolyPs als Energiespeicher

Energie wird in Zellen als ATP gespeichert. Neben ATP sind polyPs ein neuer Kandidat für eine physiologische energiespeichernde Verbindung. Dieses polymerisierte Polyanion, das aus unverzweigten Phosphatketten besteht und durch hochenergetische Phosphoanhydrid-Bindungen verbunden ist, wurde in allen biotischen Organismen von Bakterien bis zum Menschen nachgewiesen. In der hier vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass polyPs von Zellen aufgenommen werden können und zu einer Steigerung des Metabolismus führen. Gibt man polyPs als Energiespeicher zum Medium hinzu oder verdrückt man polyPs in Scaffolds, können diese also genutzt werden und Unterversorgungen mit Glukose oder Sauerstoff ausgleichen. Somit können polyPs als Energiereservoir für 3D-Zellkulturmodelle genutzt werden.

4.5 Die Ergebnisse dieser Arbeit im Kontext der aktuellen Forschung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass polyP-Substrate keine Toxizität aufweisen und den Metabolismus von Hep3B- und Caco2-Zellen steigern können. PolyP-Substrate können Glukose nicht ersetzen, was mit den Erkenntnissen von Müller et al. (Müller et al. 2017) korreliert. Müller und seine Mitarbeiter haben nachgewiesen, dass Zellen in Anwesenheit von polyP mehr Lactat produzieren (Müller et al. 2016b), was auf eine polyP-abhängige Steigerung der Glykolyse hindeutet. Nun wäre es wichtig zu analysieren, wie die im MTS-Assay gemessenen Reduktionsäquivalente (NAD(P)H) entstehen: durch gesteigerte Glykolyse oder über ein Zusammenspiel von Glykolyse und dem Pentose-Phosphat-Weg. Des Weiteren zeigte sich im Proliferations-Assay, dass es keine signifikante Steigerung der Proliferationsrate der Hep3B-Zellen unter polyP-Einfluss gab (Kapitel 3.4). Im Gegensatz dazu haben Müller et al. einen proliferativen Effekt von polyPs in SaOS-2 (Osteosarkomzelllinie) gesehen. Na-polyP wurde zu dem SaOS-2-Zellmedium mit Ca^{2+} -Ionen zugegeben, was einen dosisabhängigen Anstieg der Lebensfähigkeit der Zellen verursachte. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen verursachte Na-polyP in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ und 30 $\mu\text{g/ml}$ einen signifikanten Anstieg des Zellwachstums. Die Zugabe des Mineralisierungsaktivierungscocktails (MAC), bestehend aus β -Glycerophosphat, Ascorbinsäure und Dexamethason (Wiens et al. 2010),

förderte das Zellwachstum (Müller et al. 2017). Die Ursache für die beobachteten Unterschiede im Falle der Substitution der polyPs bei Caco2-Zellen könnte bei den verwendeten Protokollen liegen. Bei den Experimenten aus der hier vorliegenden Arbeit wurden polyPs ohne Zugabe von Ca^{2+} -Ionen und ohne weitere Proliferationsfaktoren substituiert. Daneben können die Unterschiede im Proliferationsverhalten auch durch die unterschiedlichen Eigenschaften der Zelllinien SaOS-2 und Caco2 zustande kommen.

Müller et al. zeigten, dass Mg-polyP-Partikel eine morphogenetische Aktivität aufweisen, da sie das Wachstum von Chondrozyten fördern (Müller et al. 2019). Es wurden Ca-polyP-Partikel aus CaCl_2 und Na-polyP hergestellt, die durch Alkalische Phosphatase (ALP) abgebaut werden können. Auch diese Partikel waren in der Lage, eine Reihe von Genen zu induzieren, die an der Knochenbildung beteiligt sind (Alford et al. 2015; Wang et al. 2018). Tierstudien mit normalen und diabetischen Mäusen zeigten, dass sowohl die Ca-polyP-Partikel wie auch die Mg-polyP-Partikel die Wundheilung bei diabetischen Tieren stark beschleunigen. Sr-polyP fördert nachweislich die Knochenbildung und den Aufbau der Knochenmikroarchitektur bei Osteoporose. In Anbetracht dieser Tatsache wurden Sr-polyP-Partikel aus SrCl_2 und Na-polyP hergestellt. Neben ihrer morphogenetischen Aktivität induzierten diese Partikel *in vitro* stark den Regenerationsprozess von Knochendefekten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die 3D-Zellkultur von höchster Relevanz für die Medizin ist. Sie stellt die Grundlage der personalisierten Therapie dar. Krankheitsbilder wie Krebs weisen stark schwankende Charakteristika auf und sind individuell sehr unterschiedlich. Zurzeit wird die Therapiestrategie anhand sehr weniger Parameter festgelegt. Eine individualisierte Strategie, die unter Berücksichtigung des individuellen Immunstatus der Patientinnen und Patienten und des Tumor-Micro-Environments erfolgt, wäre ein großer Fortschritt in der modernen Tumorthherapie.

4.6 Ausblick

Es ist eine große Herausforderung, Scaffolds mit primären Zellen zusammen mit polyPs verdrucken zu können und anschließend primäre Zellen in und auf Scaffolds zu kultivieren. Diese Verfahren könnten in Zukunft Tiermodelle ergänzen und vielleicht sogar ersetzen. Die Energieversorgung der Zellen im Inneren einer 3D-Zellkultur ist sehr schwer zu gewährleisten und aufrecht zu erhalten. Deshalb ist es von essenzieller Bedeutung, Substrate für die 3D-Kultur zu definieren, die die Energieversorgung im Inneren der 3D-Zellkultur ermöglichen. Eine Option dafür wäre die Verwendung von polyPs.

Müller et al. haben bereits ALP und Adenylatkinase (ADK) als Schlüsselenzyme für die Konversion von polyP in ADP/ATP in SaOS-2-Zellen identifiziert. Basierend auf den Ergebnissen der hier vorgelegten Dissertation wäre es von großer Bedeutung, die Konversion von polyP in ADP/ATP in Caco2- und Hep3B-Zellen genauer zu untersuchen, was eine wichtige Grundlage für weitere patienten-individuelle Therapiemodelle darstellen kann. Zusammenfassend können polyPs eine optimale Energiequelle für die Zellen im Inneren des 3D-Modells für kolorektale und hepatozelluläre Karzinome sein.

5 Zusammenfassung

Eine individualisierte Anti-Tumor-Strategie, die unter Berücksichtigung des individuellen Immunstatus und Micro-Environments des zu behandelnden Tumors erfolgt, ist dringend notwendig. Neben Tiermodellen rücken zunehmend 3D-Zellkulturmodelle wie Sphäroide, Organoide oder auch Scaffoldmodelle, in denen Zellen verdrückt werden, in den Fokus der Wissenschaft. Bei all diesen Modellen ist die Energieversorgung der Zellen im Inneren eines 3D-Modells eine der größten Herausforderungen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Möglichkeiten untersucht, mit verschiedenen polyP-Substraten eine optimierte Energiezufuhr für 3D-Zellkulturmodelle zu erzielen.

Die Untersuchungen erfolgten zunächst in Hep3B- und Caco2-Zellen in 2D-Zellkultur. Es wurden verschiedene polyPs (Ca-, Mg-, Sr- und Na-polyP) untersucht. Alle polyPs wiesen weder toxische Effekte auf noch beeinflussten sie den Zellzyklus oder das Zellwachstum. Hervorzuheben ist, dass alle polyPs zu einer deutlichen Steigerung des zellulären Metabolismus führten. Die Zugabe von polyPs zum Kulturmedium erhöhte die Mengen an Reduktionsäquivalenten (NAD(P)H) deutlich. Dies lässt auf eine deutliche Steigerung der Glykolyse bzw. des Pentose-Phosphat-Weges schließen. Somit können polyPs Glukose als Energielieferant nicht ersetzen, aber (i) die Umsetzung von Glukose beschleunigen und (ii) als ergänzende Energiequelle dienen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die Grundvoraussetzung gelegt werden, um polyPs in Folgeexperimenten in 3D-Scaffolds des kolorektalen und des hepatozellulären Karzinoms zu verdrücken. Wie bei jedem 3D-Gewebemodell besteht auch hier die größte Herausforderung darin, eine gleichmäßige Energieversorgung, auch im Inneren des Zellkulturmodells, zu gewährleisten. Es wurde bereits gezeigt, dass polyPs verdrückt werden können und somit gleichmäßig über das gesamte Scaffold verteilt werden können. Dadurch könnten polyPs eine gleichmäßige Energieversorgung innerhalb dieser 3D-Zellkulturmodelle ermöglichen.

Mithilfe solcher Scaffoldmodelle können dann 3D-Gewebemodelle etabliert und mit anderen Zellen, wie z. B. Immunzellen, des gleichen Spenders ko-kultiviert werden. Die Erstellung solcher komplexen Zellkulturmodelle kann dann genauere Untersuchungen zu diversen Erkrankungen wie Tumor- und Autoimmunerkrankungen liefern. Das Zusammenspiel verschiedener Zelltypen ermöglicht nicht nur genauere Einsichten in die Wirkung verschiedener Therapeutika, sondern erlaubt auch patientenindividuelle Therapien und stellt somit einen ersten Schritt in die personalisierte Medizin dar.

Damit ist die hier gezeigte Möglichkeit, polyPs als alternative, ergänzende Energiequelle zu nutzen, von großer Bedeutung. PolyPs können sich beim Verdrucken überall im Scaffold befinden, sie sind – wie hier gezeigt – leicht und effizient von den Zellen zu verstoffwechseln und sie werden über anaerobe Stoffwechselwege wie Glykolyse und Pentose-Phosphatweg umgesetzt. Somit spielt die Sauerstoffversorgung innerhalb des 3D-Scaffoldmodells nur eine untergeordnete Rolle. Der Weg zum Scaffoldmodell mit gleichmäßiger Energieversorgung ist somit geebnet und komplexe Zellkulturmodelle können nun weiter untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

A. Lavoisier (1789): *Traité élémentaire de chimie, présenté dans un ordre nouveau et d'après les découvertes modernes*, 2 vols.

Akinyemiju, Tomi; Abera, Semaw; Ahmed, Muktar; Alam, Noore; Alemayohu, Mulubirhan Assefa; Allen, Christine et al. (2017): The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level: Results From the Global Burden of Disease Study 2015. In: *JAMA Oncol* 3 (12), S. 1683–1691. DOI: 10.1001/jamaoncol.2017.3055.

Akiyama, M.; Crooke, E.; Kornberg, A. (1993): An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its ppx gene in a polyphosphate operon. In: *Journal of Biological Chemistry* 268 (1), S. 633–639. DOI: 10.1016/s0021-9258(18)54198-3.

Alford, Andrea I.; Kozloff, Kenneth M.; Hankenson, Kurt D. (2015): Extracellular matrix networks in bone remodeling. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 65, S. 20–31. DOI: 10.1016/j.biocel.2015.05.008.

Alpert, Joseph S. (2020): The Great Meat Debate. In: *The American Journal of Medicine* 133 (7), S. 769–770. DOI: 10.1016/j.amjmed.2020.02.002.

Ambekar, Rushikesh S.; Kandasubramanian, Balasubramanian (2019): Progress in the Advancement of Porous Biopolymer Scaffold: Tissue Engineering Application. In: *Ind. Eng. Chem. Res.* 58 (16), S. 6163–6194. DOI: 10.1021/acs.iecr.8b05334.

Andreeva, Nadezhda A.; Kulakovskaya, Tatiana V.; Kulaev, Igor S. (1998a): Purification and properties of exopolyphosphatase isolated from *Saccharomyces cerevisiae* vacuoles. In: *FEBS Letters* 429 (2), S. 194–196. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)00591-2.

Andreeva, Nadezhda A.; Kulakovskaya, Tatiana V.; Kulaev, Igor S. (1998b): Purification and properties of exopolyphosphatase isolated from *Saccharomyces cerevisiae* vacuoles. In: *FEBS Letters* 429 (2), S. 194–196. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)00591-2.

Andreeva, Nadezhda A.; Okorokov, Lev A. (1993): Purification and characterization of highly active and stable polyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* cell envelope. In: *Yeast* 9 (2), S. 127–139. DOI: 10.1002/YEA.320090204.

Anstee, Quentin M.; Reeves, Helen L.; Kotsiliti, Elena; Govaere, Olivier; Heikenwalder, Mathias (2019): From NASH to HCC: current concepts and future challenges. In: *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16 (7), S. 411–428. DOI: 10.1038/s41575-019-0145-7.

Aretz, Stefan; Steinke-Lange, Verena; Vilz, Tim O.; Rädle, Jochen (2021): Hereditäre Darmkrebssyndrome: Diagnostik und Management. In: *Onkologe* 27 (3), S. 203–218. DOI: 10.1007/s00761-020-00884-6.

Ascoli, Alberto (1899): Ueber die Plasminsäure. In: *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 28 (5-6), S. 426–438. DOI: 10.1515/bchm2.1899.28.5-6.426.

Ault-Riché, D.; Fraley, C. D.; Tzeng, C. M.; Kornberg, A. (1998): Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology* 180 (7), S. 1841–1847. DOI: 10.1128/JB.180.7.1841-1847.1998.

Azevedo, Cristina; Livermore, Thomas; Saiardi, Adolfo (2015): Protein polyphosphorylation of lysine residues by inorganic polyphosphate. In: *Molecular Cell* 58 (1), S. 71–82. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.02.010.

Bates, R. (2000): Spheroids and cell survival. In: *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 36 (2-3), S. 61–74. DOI: 10.1016/S1040-8428(00)00077-9.

Bayard, Quentin; Meunier, Léa; Peneau, Camille; Renault, Victor; Shinde, Jayendra; Nault, Jean-Charles et al. (2018): Cyclin A2/E1 activation defines a hepatocellular carcinoma subclass with a rearrangement signature of replication stress. In: *Nat Commun* 9 (1), S. 5235. DOI: 10.1038/s41467-018-07552-9.

Blatter, Robert; Tschupp, Benjamin; Aretz, Stefan; Bernstein, Inge; Colas, Chrystelle; Evans, D. Gareth et al. (2020): Disease expression in juvenile polyposis syndrome: a retrospective survey on a cohort of 221 European patients and comparison with a literature-derived cohort of 473 SMAD4/BMP1A pathogenic variant carriers. In: *Genet Med* 22 (9), S. 1524–1532. DOI: 10.1038/s41436-020-0826-1.

Bolondi, Luigi; Gramantieri, Laura (2011): From liver cirrhosis to HCC. In: *Internal and emergency medicine* 6 Suppl 1, S. 93–98. DOI: 10.1007/s11739-011-0682-8.

C. Peter Wolk; Anneliese Ernst; Jeff Elhai (1994): Heterocyst Metabolism and Development. In: *The Molecular Biology of Cyanobacteria*: Springer, Dordrecht, S. 769–823. Online verfügbar unter https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-0227-8_27.

- Calderaro, Julien; Ziol, Marianne; Paradis, Valérie; Zucman-Rossi, Jessica (2019): Molecular and histological correlations in liver cancer. In: *Journal of Hepatology* 71 (3), S. 616–630. DOI: 10.1016/j.jhep.2019.06.001.
- Chang, Mei-Hwei; You, San-Lin; Chen, Chien-Jen; Liu, Chun-Jen; Lai, Ming-Wei; Wu, Tzee-Chung et al. (2016): Long-term Effects of Hepatitis B Immunization of Infants in Preventing Liver Cancer. In: *Gastroenterology* 151 (3), 472-480.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.05.048.
- Chang, Robert; Nam, Jae; Sun, Wei (2008a): Direct Cell Writing of 3D Microorgan for In Vitro Pharmacokinetic Model. In: *Tissue Engineering Part C: Methods* 14 (2), S. 157–166. DOI: 10.1089/ten.tec.2007.0392.
- Chang, Robert; Nam, Jae; Sun, Wei (2008b): Effects of dispensing pressure and nozzle diameter on cell survival from solid freeform fabrication-based direct cell writing. In: *Tissue engineering. Part A* 14 (1), S. 41–48. DOI: 10.1089/ten.a.2007.0004.
- Cheah, Chi-Mun; Chua, Chee-Kai; Leong, Kah-Fai; Cheong, Chee-How; Naing, May-Win (2004): Automatic algorithm for generating complex polyhedral scaffold structures for tissue engineering. In: *Tissue Engineering* 10 (3-4), S. 595–610. DOI: 10.1089/107632704323061951.
- Chiang, Derek Y.; Villanueva, Augusto; Hoshida, Yujin; Peix, Judit; Newell, Philippa; Minguéz, Beatriz et al. (2008): Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. In: *Cancer Res* 68 (16), S. 6779–6788. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0742.
- Chu, D. T.; Plattner, J. J.; Katz, L. (1996): New directions in antibacterial research. In: *J. Med. Chem.* 39 (20), S. 3853–3874. DOI: 10.1021/jm960294s.
- Deisboeck, T. S.; Berens, M. E.; Kansal, A. R.; Torquato, S.; Stemmer-Rachamimov, A. O.; Chiocca, E. A. (2001): Pattern of self-organization in tumour systems: complex growth dynamics in a novel brain tumour spheroid model. In: *Cell Proliferation* 34 (2), S. 115–134. DOI: 10.1046/j.1365-2184.2001.00202.x.
- DGVS S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms (2021): DGVS S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome Langversion 2.0 – Juni 2021 AWMF-Registernummer: 032 - 053OL.

DGVS S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Kolorektalen Karzinom (2019): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom.

DL Nelson, M. Cox (2008): Absolute Ultimate Guide for Lehninger Principles of Biochemistry.

Docampo (2006): Inclusions in Prokaryotes, Microbiol. Monogr. R. Docampo, Acidocalcisomes and polyphosphate granules, in Inclusions in Prokaryotes, Microbiol. Monogr., ed. J. M. Shively, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2006, pp. 53–70.

Douaiher, Jeffrey; Ravipati, Advaitaa; Grams, Benjamin; Chowdhury, Sanjib; Alalise, Olusegun; Are, Chandrakanth (2017): Colorectal cancer-global burden, trends, and geographical variations. In: *Journal of surgical oncology* 115 (5), S. 619–630. DOI: 10.1002/jso.24578.

Drury, Jeanie L.; Mooney, David J. (2003): Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. In: *Biomaterials* 24 (24), S. 4337–4351. DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00340-5.

Duan, Bin; Hockaday, Laura A.; Kang, Kevin H.; Butcher, Jonathan T. (2013): 3D bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. In: *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 101 (5), S. 1255–1264. DOI: 10.1002/jbm.a.34420.

Ducreux M. (2021): IMbrave150: Exploratory analysis to examine the association between treatment response and overall survival (OS) in patients (pts) with unresectable hepatocellular ...

Dunn, T.; Gable, K.; Beeler, T. (1994): Regulation of cellular Ca²⁺ by yeast vacuoles. In: *Journal of Biological Chemistry* 269 (10), S. 7273–7278. DOI: 10.1016/s0021-9258(17)37279-4.

EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma (2018): EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. In: *Journal of Hepatology* 69 (1), S. 182–236. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.03.019.

Edelman, David B.; Keefer, Edward W. (2005): A cultural renaissance: in vitro cell biology embraces three-dimensional context. In: *Experimental Neurology* 192 (1), S. 1–6. DOI: 10.1016/j.expneurol.2004.10.005.

English, Dallas R.; Young, Joanne P.; Simpson, Julie A.; Jenkins, Mark A.; Southey, Melissa C.; Walsh, Michael D. et al. (2008): Ethnicity and risk for colorectal cancers showing somatic BRAF V600E mutation or CpG island methylator phenotype. In: *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17 (7), S. 1774–1780. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0091.

Estes, Chris; Anstee, Quentin M.; Arias-Loste, Maria Teresa; Bantel, Heike; Bellentani, Stefano; Caballeria, Joan et al. (2018a): Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030. In: *Journal of Hepatology* 69 (4), S. 896–904. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.05.036.

Estes, Chris; Razavi, Homie; Loomba, Rohit; Younossi, Zobair; Sanyal, Arun J. (2018b): Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 67 (1), S. 123–133. DOI: 10.1002/hep.29466.

Fantini, Massimo Claudio; Guadagni, Ilaria (2021): From inflammation to colitis-associated colorectal cancer in inflammatory bowel disease: Pathogenesis and impact of current therapies. In: *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 53 (5), S. 558–565. DOI: 10.1016/j.dld.2021.01.012.

Fischbach, Claudia; Chen, Ruth; Matsumoto, Takuya; Schmelzle, Tobias; Brugge, Joan S.; Pulverini, Peter J.; Mooney, David J. (2007): Engineering tumors with 3D scaffolds. In: *Nature methods* 4 (10), S. 855–860. DOI: 10.1038/NMETH1085.

Fortuna, Richard; Anderson, H. Clarke; Carty, Robert; Sajdera, Stanley W. (1979): Enzymatic characterization of the chondrocytic alkaline phosphatase isolated from bovine fetal epiphyseal cartilage. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* 570 (2), S. 291–302. DOI: 10.1016/0005-2744(79)90149-9.

Friedman, Scott L.; Neuschwander-Tetri, Brent A.; Rinella, Mary; Sanyal, Arun J. (2018): Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. In: *Nat Med* 24 (7), S. 908–922. DOI: 10.1038/s41591-018-0104-9.

Friedrich, Juergen; Ebner, Reinhard; Kunz-Schughart, Leoni A. (2007): Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge? In: *International journal of radiation biology* 83 (11-12), S. 849–871. DOI: 10.1080/09553000701727531.

Friedrich, Juergen; Seidel, Claudia; Ebner, Reinhard; Kunz-Schughart, Leoni A. (2009): Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. In: *Nature Protocols* 4 (3), S. 309–324. DOI: 10.1038/nprot.2008.226.

Garland, Victoria; Cioffi, Joseph; Kirelik, Danielle; Pascual, Lauren; Borum, Marie L. (2020): African-Americans Are Less Frequently Assessed For Hereditary Colon Cancer. In: *Journal of the National Medical Association*. DOI: 10.1016/j.jnma.2020.09.146.

Ghouri, Yezaz Ahmed; Mian, Idrees; Rowe, Julie H. (2017): Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. In: *Journal of Carcinogenesis* 16, S. 1. DOI: 10.4103/jcar.JCar_9_16.

Guichard, Cécile; Amadeo, Giuliana; Imbeaud, Sandrine; Ladeiro, Yannick; Pelletier, Laura; Maad, Ichrafe Ben et al. (2012): Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. In: *Nat Genet* 44 (6), S. 694–698. DOI: 10.1038/ng.2256.

Guillemot, Fabien; Souquet, Agnès; Catros, Sylvain; Guillotin, Bertrand (2010): Laser-assisted cell printing: principle, physical parameters versus cell fate and perspectives in tissue engineering. In: *Nanomedicine* 5 (3), S. 507–515. DOI: 10.2217/nnm.10.14.

Guo, Feng; Chen, Chen; Holleczeck, Bernd; Schöttker, Ben; Hoffmeister, Michael; Brenner, Hermann (2021): Strong Reduction of Colorectal Cancer Incidence and Mortality After Screening Colonoscopy: Prospective Cohort Study From Germany. In: *The American journal of gastroenterology* 116 (5), S. 967–975. DOI: 10.14309/ajg.0000000000001146.

Hardelauf, Heike; Frimat, Jean-Philippe; Stewart, Joanna D.; Schormann, Wiebke; Chiang, Ya-Yu; Lampen, Peter et al. (2011): Microarrays for the scalable production of metabolically relevant tumour spheroids: a tool for modulating chemosensitivity traits. In: *Lab Chip* 11 (3), S. 419–428. DOI: 10.1039/c0lc00089b.

Hay, Elizabeth D.; Dodson, James W. (1973): SECRETION OF COLLAGEN BY CORNEAL EPITHELIUM I. Morphology of the Collagenous Products Produced by Isolated Epithelia Grown on Frozen-Killed Lens. In: *J Cell Biol* 57 (1), S. 190–213. DOI: 10.1083/jcb.57.1.190.

Haycock, John W. (2011): 3D Cell Culture. Totowa, NJ: Humana Press (695).

Heimbach, Julie K.; Kulik, Laura M.; Finn, Richard S.; Sirlin, Claude B.; Abecassis, Michael M.; Roberts, Lewis R. et al. (2018): AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 67 (1), S. 358–380. DOI: 10.1002/hep.29086.

Hengge-Aronis, Regine (1993): Survival of hunger and stress: The role of rpoS in early stationary phase gene regulation in E. coli. In: *Cell* 72 (2), S. 165–168. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90655-A.

Hoffman, Robert M. (1993): To do tissue culture in two or three dimensions? that is the question. In: *Stem Cells* 11 (2), S. 105–111. DOI: 10.1002/stem.5530110205.

Howes, Amy L.; Chiang, Gary G.; Lang, Elizabeth S.; Ho, Caroline B.; Powis, Garth; Vuori, Kristiina; Abraham, Robert T. (2007): The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, PX-866, is a potent inhibitor of cancer cell motility and growth in three-dimensional cultures. In: *Molecular Cancer Therapeutics* 6 (9), S. 2505–2514. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0698.

Huang, Daniel Q.; El-Serag, Hashem B.; Loomba, Rohit (2021): Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention. In: *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 18 (4), S. 223–238. DOI: 10.1038/s41575-020-00381-6.

Hull, C. W. (1984): Apparatus for Production of Three-Dimensional Objects by Stereolithography. In: *United States Patent, Appl., No. 638905, Filed*. Online verfügbar unter <https://ci.nii.ac.jp/naid/10007148184/>.

Hyman, David M.; Taylor, Barry S.; Baselga, José (2017): Implementing Genome-Driven Oncology. In: *Cell* 168 (4), S. 584–599. DOI: 10.1016/j.cell.2016.12.015.

Ioannou, George N.; Beste, Lauren A.; Green, Pamela K.; Singal, Amit G.; Tapper, Elliot B.; Waljee, Akbar K. et al. (2019): Increased Risk for Hepatocellular Carcinoma Persists Up to 10 Years After HCV Eradication in Patients With Baseline Cirrhosis or High FIB-4 Scores. In: *Gastroenterology* 157 (5), 1264-1278.e4. DOI: 10.1053/j.gastro.2019.07.033.

Ivascu, Andrea; Kubbies, Manfred (2006): Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. In: *Journal of biomolecular screening* 11 (8), S. 922–932. DOI: 10.1177/1087057106292763.

Iwami, K.; Noda, T.; Ishida, K.; Morishima, K.; Nakamura, M.; Umeda, N. (2010): Bio rapid prototyping by extruding/aspirating/refilling thermoreversible hydrogel. In: *Biofabrication* 2 (1), S. 14108. DOI: 10.1088/1758-5082/2/1/014108.

Iyer (2017): Estrogen receptor expression in chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma pathogenesis. Online verfügbar unter

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc5645614/>.

Jepsen; Ott; Andersen (2012): Risk for Hepatocellular Carcinoma in Patients With Alcoholic Cirrhosis. In: *Annals of Internal Medicine* 2012.

JH Schwachofer (1990): Schwachofer JH (1990) Multicellular tumor spheroids in radiotherapy research (review). *Anticancer Res* 10:963–969. In: *Anticancer Res* 10, S. 963.

Jones, Neil P.; Peak, Joanna; Brader, Sharon; Eccles, Suzanne A.; Katan, Matilda (2005): PLCgamma1 is essential for early events in integrin signalling required for cell motility. In: *Journal of cell science* 118 (Pt 12), S. 2695–2706. DOI: 10.1242/jcs.02374.

Joseph Priestley (1772): XIX. Observations on different kinds of air. In: *Phil. Trans. R. Soc.* 62, S. 147–264. DOI: 10.1098/rstl.1772.0021.

Kanwal, Fasiha; Kramer, Jennifer; Asch, Steven M.; Chayanupatkul, Maneerat; Cao, Yumei; El-Serag, Hashem B. (2017): Risk of Hepatocellular Cancer in HCV Patients Treated With Direct-Acting Antiviral Agents. In: *Gastroenterology* 153 (4), 996-1005.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.06.012.

Kanwal, Fasiha; Kramer, Jennifer R.; Mapakshi, Srikar; Natarajan, Yamini; Chayanupatkul, Maneerat; Richardson, Peter A. et al. (2018): Risk of Hepatocellular Cancer in Patients With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. In: *Gastroenterology* 155 (6), 1828-1837.e2. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.08.024.

Keasling, J. D.; Bertsch, L.; Kornberg, A. (1993): Guanosine pentaphosphate phosphohydrolase of *Escherichia coli* is a long-chain exopolyphosphatase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (15), S. 7029–7033. DOI: 10.1073/PNAS.90.15.7029.

Kerbel, RS; Kobayashi, H. (1994): Intrinsic or acquired drug resistance and metastasis: are they linked phenotypes? Online verfügbar unter [https://scholar.google.de/scholar?hl=de&as_sdt=0%2C5&q=+Kerbel+RS%2C+Kobayashi+H%2C+Graham+CH+%281994%29+Intrinsic+or+acquired+drug+resistance+and+metastasis%3A+are+they+linked+phenotypes%3F+J+Cell+Biochem+56%3A37%E2%80%9393474&btnG=](https://scholar.google.de/scholar?hl=de&as_sdt=0%2C5&q=+Kerbel+RS%2C+Kobayashi+H%2C+Graham+CH+%281994%29+Intrinsic+or+acquired+drug+resistance+and+metastasis%3A+are+they+linked+phenotypes%3F+J+Cell+Biochem+56%3A37%E2%80%9393474&btnG=,), zuletzt aktualisiert am 17.03.2021, zuletzt geprüft am 17.03.2021.

Kew, Michael C. (2003): Synergistic interaction between aflatoxin B1 and hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis. In: *Liver international : official journal of the International*

Association for the Study of the Liver 23 (6), S. 405–409. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2003.00869.x.

Kim, Jong Bin; Stein, Robert; O'Hare, Mike J. (2004): Three-dimensional in vitro tissue culture models of breast cancer-- a review. In: *Breast Cancer Research and Treatment* 85 (3), S. 281–291. DOI: 10.1023/B:BREA.0000025418.88785.2b.

Kolesky, David B.; Homan, Kimberly A.; Skylar-Scott, Mark A.; Lewis, Jennifer A. (2016): Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (12), S. 3179–3184. DOI: 10.1073/pnas.1521342113.

Kolter, R.; Siegele, D. A.; Tormo, A. (1993): The Stationary Phase of The Bacterial Life Cycle. In: *Annual review of microbiology* 47 (1), S. 855–874. DOI: 10.1146/ANNUREV.MI.47.100193.004231.

Kornberg, A. (1995): Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. In: *Journal of Bacteriology* 177 (3), S. 491–496. DOI: 10.1128/jb.177.3.491-496.1995.

Kornberg, A. (1999): Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. In: *Progress in molecular and subcellular biology* 23, S. 1–18. DOI: 10.1007/978-3-642-58444-2_1.

Kornberg, A.; Rao, N. N.; Ault-Riché, D. (1999a): Inorganic polyphosphate. A molecule of many functions. In: *Annual review of biochemistry* 68, S. 89–125. DOI: 10.1146/annurev.biochem.68.1.89.

Kornberg, Arthur (1993a): ATP and inorganic pyro- and polyphosphate. In: *Protein Science* 2 (1), S. 131–132. DOI: 10.1002/PRO.5560020116.

Kornberg, Arthur (1993b): ATP and inorganic pyro- and polyphosphate. In: *Protein Science* 2 (1), S. 131–132. DOI: 10.1002/PRO.5560020116.

Kornberg, Arthur; Kornberg, S. R.; Simms, Ernest S. (1956): Metaphosphate synthesis by an enzyme from *Escherichia coli*. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 20, S. 215–227. DOI: 10.1016/0006-3002(56)90280-3.

Kornberg, Arthur; Rao, Narayana N.; Ault-Riché, Dana (1999b): Inorganic Polyphosphate: A Molecule of Many Functions. In: *Annual review of biochemistry* 68 (1), S. 89–125. DOI: 10.1146/annurev.biochem.68.1.89.

Kornberg, S. R. (1957a): Adenosine triphosphate synthesis from polyphosphate by an enzyme from *Escherichia coli*. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 26 (2), S. 294–300. DOI: 10.1016/0006-3002(57)90008-2.

Kornberg, S. R. (1957b): Adenosine triphosphate synthesis from polyphosphate by an enzyme from *Escherichia coli*. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 26 (2), S. 294–300. DOI: 10.1016/0006-3002(57)90008-2.

Kryou, Christina; Leva, Valentina; Chatzipetrou, Marianneza; Zergioti, Ioanna (2019a): Bioprinting for Liver Transplantation. In: *Bioengineering (Basel, Switzerland)* 6 (4), S. 95. DOI: 10.3390/bioengineering6040095.

Kryou, Christina; Leva, Valentina; Chatzipetrou, Marianneza; Zergioti, Ioanna (2019b): Bioprinting for Liver Transplantation. In: *Bioengineering (Basel, Switzerland)* 6 (4). DOI: 10.3390/bioengineering6040095.

Kudo, Masatoshi; Finn, Richard S.; Qin, Shukui; Han, Kwang-Hyub; Ikeda, Kenji; Piscaglia, Fabio et al. (2018): Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. In: *The Lancet* 391 (10126), S. 1163–1173. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)30207-1.

Kulaev, I. S.; Vagabov, V. M.; Kulakovskaia, T. V. (2005): The biochemistry of inorganic polyphosphates. Chichester, West Sussex: J. Wiley.

Kulaev, Igor S.; Andreeva, Nadezhda A.; Lichko, Lidiya P.; Kulakovskaya, Tatyana V. (1997): Comparison of exopolyphosphatases of different yeast cell compartments. In: *Microbiological Research* 152 (3), S. 221–226. DOI: 10.1016/S0944-5013(97)80031-6.

Kulaev, Igor S.; Vagabov, Vladimir M. (1983): Polyphosphate Metabolism in Micro-Organisms: Elsevier (Advances in Microbial Physiology).

Kulaev, Igor' Stepanovich; Vagabov, V. M.; Kulakovskaia, Tat'iana Valentinovna (2004): The biochemistry of inorganic polyphosphates. 2nd ed. Chichester, West Sussex, Hoboken, NJ: J. Wiley.

Kunz-Schughart, Leoni A.; Freyer, James P.; Hofstaedter, Ferdinand; Ebner, Reinhard (2004): The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. In: *Journal of biomolecular screening* 9 (4), S. 273–285. DOI: 10.1177/1087057104265040.

Kupfer, Sonia S.; Burke, Carol A. (2020): Patients in Whom to Consider Genetic Evaluation and Testing for Hereditary Colorectal Cancer Syndromes. In: *The American journal of gastroenterology* 115 (1), S. 1–4. DOI: 10.14309/ajg.0000000000000362.

Lee, Genee Y.; Kenny, Paraic A.; Lee, Eva H.; Bissell, Mina J. (2007): Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. In: *Nature methods* 4 (4), S. 359–365. DOI: 10.1038/nmeth1015.

Lee Ruby M.; Hartmann, Paul A.; STAHR, H. MICHAEL; OLSON, DENNIS G.; WILLIAMS, FRED D. (1994): Antibacterial Mechanism of Long-Chain Polyphosphates in *Staphylococcus aureus*. In: *Journal of Food Protection* 57 (4), S. 289–294. DOI: 10.4315/0362-028X-57.4.289.

Li, Qun; Chen, Chaoyu; Kapadia, Amit; Zhou, Qiong; Harper, Mary Kay; Schaack, Jerome; Labarbera, Daniel V. (2011): 3D models of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer metastasis: high-throughput screening assay development, validation, and pilot screen. In: *Journal of biomolecular screening* 16 (2), S. 141–154. DOI: 10.1177/1087057110392995.

Lichko, Lidia; Kulakovskaya, Tatyana; Kulaev, Igor (1998): Membrane-bound and soluble polyphosphatases of mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*: identification and comparative characterization. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1372 (2), S. 153–162. DOI: 10.1016/S0005-2736(98)00013-3.

Liebermann, Leo (1890): Nachweis der Metaphosphorsäure im Nuclein der Hefe. In: *Pflüger, Arch.* 47 (1), S. 155–160. DOI: 10.1007/BF01789810.

Lin, Chih-Wen; Lin, Chih-Che; Mo, Lein-Ray; Chang, Chi-Yang; Perng, Daw-Shyong; Hsu, Chia-Chang et al. (2013): Heavy alcohol consumption increases the incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus-related cirrhosis. In: *Journal of Hepatology* 58 (4), S. 730–735. DOI: 10.1016/j.jhep.2012.11.045.

Llovet, Josep M.; Baere, Thierry de; Kulik, Laura; Haber, Philipp K.; Greten, Tim F.; Meyer, Tim; Lencioni, Riccardo (2021a): Locoregional therapies in the era of molecular and immune treatments for hepatocellular carcinoma. In: *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18 (5), S. 293–313. DOI: 10.1038/s41575-020-00395-0.

Llovet, Josep M.; Kelley, Robin Kate; Villanueva, Augusto; Singal, Amit G.; Pikarsky, Eli; Roayaie, Sasan et al. (2021b): Hepatocellular carcinoma. In: *Nature reviews. Disease primers* 7 (1), S. 6. DOI: 10.1038/s41572-020-00240-3.

Llovet, Josep M.; Montal, Robert; Sia, Daniela; Finn, Richard S. (2018): Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma. In: *Nat Rev Clin Oncol* 15 (10), S. 599–616. DOI: 10.1038/s41571-018-0073-4.

Llovet, Josep M.; Ricci, Sergio; Mazzaferro, Vincenzo; Hilgard, Philip; Gane, Edward; Blanc, Jean-Frédéric et al. (2008): Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. In: *The New England journal of medicine* 359 (4), S. 378–390. DOI: 10.1056/NEJMoa0708857.

Llovet, Josep M.; Villanueva, Augusto (2016): Liver cancer: Effect of HCV clearance with direct-acting antiviral agents on HCC. In: *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13 (10), S. 561–562. DOI: 10.1038/nrgastro.2016.140.

Lorenz, B.; Leuck, J.; Köhl, D.; Muller, W. E.; Schröder, H. C. (1997): Anti-HIV-1 activity of inorganic polyphosphates. In: *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* 14 (2), S. 110–118. DOI: 10.1097/00042560-199702010-00003.

Malda, Jos; Klein, Travis J.; Upton, Zee (2007): The roles of hypoxia in the in vitro engineering of tissues. In: *Tissue Engineering* 13 (9), S. 2153–2162. DOI: 10.1089/ten.2006.0417.

Marrero; Kulik; Sirlin; Zhu (2019): Diagnosis, staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 practice guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc6465784/>.

Matsuda, Yoko; Ishiwata, Toshiyuki; Kawamoto, Yoko; Kawahara, Kiyoko; Peng, Wei-Xia; Yamamoto, Tetsushi; Naito, Zenya (2010): Morphological and cytoskeletal changes of pancreatic cancer cells in three-dimensional spheroidal culture. In: *Medical Molecular Morphology* 43 (4), S. 211–217. DOI: 10.1007/s00795-010-0497-0.

Mazzoleni, Giovanna; Di Lorenzo, D.; Steimberg, N. (2009a): Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? In: *Genes & nutrition* 4 (1), S. 13–22. DOI: 10.1007/s12263-008-0107-0.

Mazzoleni, Giovanna; Di Lorenzo, D.; Steimberg, N. (2009b): Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? In: *Genes & nutrition* 4 (1), S. 13–22. DOI: 10.1007/s12263-008-0107-0.

Mazzoleni, Giovanna; Di Lorenzo, D.; Steimberg, N. (2009c): Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? In: *Genes & nutrition* 4 (1), S. 13–22. DOI: 10.1007/s12263-008-0107-0.

McCready, Jessica; Sims, Jessica D.; Chan, Doug; Jay, Daniel G. (2010): Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. In: *BMC Cancer* 10 (1), S. 294. DOI: 10.1186/1471-2407-10-294.

McGlynn, Katherine A.; London, W. Thomas (2011): The global epidemiology of hepatocellular carcinoma: present and future. In: *Clinics in Liver Disease* 15 (2), 223-43, vii-x. DOI: 10.1016/j.cld.2011.03.006.

McGlynn, Katherine A.; Petrick, Jessica L.; El-Serag, Hashem B. (2021): Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma. In: *Hepatology* 73 Suppl 1, S. 4–13. DOI: 10.1002/HEP.31288.

Mittal, Sahil; El-Serag, Hashem B. (2013): Epidemiology of hepatocellular carcinoma. Consider the population. In: *Journal of clinical gastroenterology* 47 Suppl, S2-6. DOI: 10.1097/MCG.0b013e3182872f29.

Mittal, Sahil; El-Serag, Hashem B.; Sada, Yvonne H.; Kanwal, Fasiha; Duan, Zhigang; Temple, Sarah et al. (2016): Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis in United States Veterans is Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. In: *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 14 (1), 124-31.e1. DOI: 10.1016/j.cgh.2015.07.019.

Moser, Christian; Lang, Sven A.; Kainz, Silvia; Gaumann, Andreas; Fichtner-Feigl, Stefan; Koehl, Gudrun E. et al. (2007): Blocking heat shock protein-90 inhibits the invasive properties and hepatic growth of human colon cancer cells and improves the efficacy of oxaliplatin in p53-deficient colon cancer tumors in vivo. In: *Molecular Cancer Therapeutics* 6 (11), S. 2868–2878. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0410.

Müller, M.; Schilling, T.; Sayan, A. E.; Kairat, A.; Lorenz, K.; Schulze-Bergkamen, H. et al. (2005): TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. In: *Cell death and differentiation* 12 (12), S. 1564–1577. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401774;

Müller, Martina; Schleithoff, Elisa Schulze; Stremmel, Wolfgang; Melino, Gerry; Krammer, Peter H.; Schilling, Tobias (2006): One, two, three--p53, p63, p73 and chemosensitivity. In: *Drug Resistance Updates* 9 (6), S. 288–306. DOI: 10.1016/j.drug.2007.01.001.

Müller, Werner E. G.; Neufurth, Meik; Tolba, Emad; Wang, Shunfeng; Geurtsen, Werner; Feng, Qingling et al. (2016a): A biomimetic approach to ameliorate dental hypersensitivity by

amorphous polyphosphate microparticles. In: *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 32 (6), S. 775–783. DOI: 10.1016/j.dental.2016.03.027.

Müller, Werner E. G.; Schröder, Heinz C.; Tolba, Emad; Diehl-Seifert, Bärbel; Wang, Xiaohong (2016b): Mineralization of bone-related SaOS-2 cells under physiological hypoxic conditions. In: *The FEBS journal* 283 (1), S. 74–87. DOI: 10.1111/febs.13552.

Müller, Werner E. G.; Schröder, Heinz C.; Wang, Xiaohong (2019): Inorganic Polyphosphates As Storage for and Generator of Metabolic Energy in the Extracellular Matrix. In: *Chemical reviews* 119 (24), S. 12337–12374. DOI: 10.1021/acs.chemrev.9b00460.

Müller, Werner E. G.; Tolba, Emad; Schröder, Heinz C.; Wang, Xiaohong (2015): Polyphosphate: A Morphogenetically Active Implant Material Serving as Metabolic Fuel for Bone Regeneration. In: *Macromolecular Bioscience* 15 (9), S. 1182–1197. DOI: 10.1002/mabi.201500100.

Müller, Werner E. G.; Wang, Shunfeng; Neufurth, Meik; Kokkinopoulou, Maria; Feng, Qingling; Schröder, Heinz C.; Wang, Xiaohong (2017): Polyphosphate as a donor of high-energy phosphate for the synthesis of ADP and ATP. In: *Journal of cell science* 130 (16), S. 2747–2756. DOI: 10.1242/jcs.204941.

Murray, K. D.; Bremer, H. (1996): Control of spoT-dependent ppGpp synthesis and degradation in *Escherichia coli*. In: *Journal of Molecular Biology* 259 (1), S. 41–57. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0300.

Nakagawa, Hayato; Umemura, Atsushi; Taniguchi, Koji; Font-Burgada, Joan; Dhar, Debanjan; Ogata, Hisanobu et al. (2014): ER stress cooperates with hypernutrition to trigger TNF-dependent spontaneous HCC development. In: *Cancer Cell* 26 (3), S. 331–343. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.07.001.

Nakamura, M.; Iwanaga, S.; Henmi, C.; Arai, K.; Nishiyama, Y. (2010): Biomatrices and biomaterials for future developments of bioprinting and biofabrication. In: *Biofabrication* 2 (1), S. 14110. DOI: 10.1088/1758-5082/2/1/014110.

Nault, Jean-Charles; Ningarhari, Massih; Rebouissou, Sandra; Zucman-Rossi, Jessica (2019): The role of telomeres and telomerase in cirrhosis and liver cancer. In: *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16 (9), S. 544–558. DOI: 10.1038/s41575-019-0165-3.

- Nee, Judy; Chippendale, Ryan Z.; Feuerstein, Joseph D. (2020): Screening for Colon Cancer in Older Adults: Risks, Benefits, and When to Stop. In: *Mayo Clinic proceedings* 95 (1), S. 184–196. DOI: 10.1016/j.mayocp.2019.02.021.
- Nikolova, Maria P.; Chavali, Murthy S. (2019): Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. In: *Bioactive Materials* 4, S. 271–292. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2019.10.005.
- Offenbacher, Steven; Kline, Edward S. (1984): Evidence for polyphosphate in phosphorylated nonhistone nuclear proteins. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 231 (1), S. 114–123. DOI: 10.1016/0003-9861(84)90368-0.
- Ohashi, Kazuto; Kawai, Shigeyuki; Murata, Kousaku (2012): Identification and characterization of a human mitochondrial NAD kinase. In: *Nature Communications* 3 (1), S. 1248. DOI: 10.1038/ncomms2262.
- Okeke, Edith; Davwar, Pantong Mark; Roberts, Lewis; Sartorius, Kurt; Spearman, Wendy; Malu, Abraham; Duguru, Mary (2020): Epidemiology of Liver Cancer in Africa: Current and Future Trends. In: *Seminars in Liver Disease* 40 (2), S. 111–123. DOI: 10.1055/s-0039-3399566.
- Pallerla, Srinivas Reddy; Knebel, Sandra; Polen, Tino; Klauth, Peter; Hollender, Juliane; Wendisch, Volker F.; Schoberth, Siegfried M. (2005): Formation of volutin granules in *Corynebacterium glutamicum*. In: *FEMS Microbiology Letters* 243 (1), S. 133–140. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.11.047.
- Petrick, Jessica L.; Florio, Andrea A.; Znaor, Ariana; Ruggieri, David; Laversanne, Mathieu; Alvarez, Christian S. et al. (2020a): International trends in hepatocellular carcinoma incidence, 1978-2012. In: *International Journal of Cancer* 147 (2), S. 317–330. DOI: 10.1002/ijc.32723.
- Petrick, Jessica L.; Florio, Andrea A.; Znaor, Ariana; Ruggieri, David; Laversanne, Mathieu; Alvarez, Christian S. et al. (2020b): International trends in hepatocellular carcinoma incidence, 1978-2012. In: *International Journal of Cancer* 147 (2), S. 317–330. DOI: 10.1002/ijc.32723.
- Pflaum, Johanna; Schlosser, Sophie; Müller, Martina (2014): p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. In: *Front. Oncol.* 4, S. 285. DOI: 10.3389/fonc.2014.00285.

Rao, N. N.; Torriani, A. (1990): Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*. In: *Molecular Microbiology* 4 (7), S. 1083–1090. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1990.tb00682.x.

Rao, Narayana N.; Gómez-García, María R.; Kornberg, Arthur (2009): Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. In: *Annual review of biochemistry* 78 (1), S. 605–647. DOI: 10.1146/annurev.biochem.77.083007.093039.

Raskov, Hans; Pommergaard, Hans-Christian; Burcharth, Jakob; Rosenberg, Jacob (2014): Colorectal carcinogenesis--update and perspectives. In: *World journal of gastroenterology* 20 (48), S. 18151–18164. DOI: 10.3748/wjg.v20.i48.18151.

Renehan, Andrew G.; Tyson, Margaret; Egger, Matthias; Heller, Richard F.; Zwahlen, Marcel (2008): Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. In: *The Lancet* 371 (9612), S. 569–578. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60269-X.

Rich, Nicole E.; Yopp, Adam C.; Singal, Amit G.; Murphy, Caitlin C. (2020): Hepatocellular Carcinoma Incidence Is Decreasing Among Younger Adults in the United States. In: *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 18 (1), 242-248.e5. DOI: 10.1016/j.cgh.2019.04.043.

Roskelley, C. D.; Desprez, P. Y.; Bissell, M. J. (1994): Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (26), S. 12378–12382. DOI: 10.1073/pnas.91.26.12378.

Sa, Rina; Song, Huali; Wei, Meihua; Su, Hailong; Hong, Yao; Zhou, Lulu; Bai, Yunfei (2020): The impact of APC polymorphisms on the transition from polyps to colorectal cancer (CRC). In: *Gene* 740, S. 144486. DOI: 10.1016/j.gene.2020.144486.

Schilling, Tobias; Kairat, Astrid; Melino, Gerry; Krammer, Peter H.; Stremmel, Wolfgang; Oren, Moshe; Müller, Martina (2010): Interference with the p53 family network contributes to the gain of oncogenic function of mutant p53 in hepatocellular carcinoma. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 394 (3), S. 817–823. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.03.082.

Schröder, Heinz C.; Müller, Werner E.G. (1999): Inorganic Polyphosphates. *Biochemistry, Biology, Biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Progress in Molecular and Subcellular Biology).

Schulze, Kornelius; Imbeaud, Sandrine; Letouzé, Eric; Alexandrov, Ludmil B.; Calderaro, Julien; Rebouissou, Sandra et al. (2015): Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. In: *Nat Genet* 47 (5), S. 505–511. DOI: 10.1038/ng.3252.

Schutgens, Frans; Clevers, Hans (2020): Human Organoids: Tools for Understanding Biology and Treating Diseases. In: *Annual review of pathology* 15, S. 211–234. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032611.

Secco, David; Wang, Chuang; Shou, Huixia; Whelan, James (2012): Phosphate homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the key role of the SPX domain-containing proteins. In: *FEBS Letters* 586 (4), S. 289–295. DOI: 10.1016/j.febslet.2012.01.036.

Shao, Changmin; Chi, Junjie; Zhang, Hui; Fan, Qihui; Zhao, Yuanjin; Ye, Fangfu (2020): Development of Cell Spheroids by Advanced Technologies. In: *Adv. Mater. Technol.* 5 (9), S. 2000183. DOI: 10.1002/admt.202000183.

Skorko, Romuald (1989): Polyphosphate as a source of phosphoryl group in protein modification in the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. In: *Biochimie* 71 (9-10), S. 1089–1093. DOI: 10.1016/0300-9084(89)90115-6.

St Croix, B.; Kerbel, R. S. (1997): Cell adhesion and drug resistance in cancer. In: *Current Opinion in Oncology* 9 (6), S. 549–556. DOI: 10.1097/00001622-199711000-00010.

Sukocheva (2018): Estrogen, estrogen receptors, and hepatocellular carcinoma: Are we there yet? Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc5757114/>.

Sung, Hyuna; Ferlay, Jacques; Siegel, Rebecca L.; Laversanne, Mathieu; Soerjomataram, Isabelle; Jemal, Ahmedin; Bray, Freddie (2021): Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 71 (3), S. 209–249. DOI: 10.3322/caac.21660.

Sutherland R. M.; Sordat B, Bamat J.; Gabbert H; Bourrat B.; Mueller-Klieser W (1986): Oxygenation and Differentiation in Multicellular Spheroids of Human Colon Carcinoma Diskussion. In: *Cancer Res.*

Sutti, Salvatore; Albano, Emanuele (2020): Adaptive immunity: an emerging player in the progression of NAFLD. In: *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17 (2), S. 81–92. DOI: 10.1038/s41575-019-0210-2.

Tammenkoski, Marko; Koivula, Katja; Cusanelli, Emilio; Zollo, Massimo; Steegborn, Clemens; Baykov, Alexander A.; Lahti, Reijo (2008): Human metastasis regulator protein H-prune is a short-chain exopolyphosphatase. In: *Biochemistry* 47 (36), S. 9707–9713. DOI: 10.1021/bi8010847.

Trinchet, Jean-Claude; Bourcier, Valérie; Chaffaut, Cendrine; Ait Ahmed, Mohand; Allam, Setty; Marcellin, Patrick et al. (2015): Complications and competing risks of death in compensated viral cirrhosis (ANRS CO12 CirVir prospective cohort). In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 62 (3), S. 737–750. DOI: 10.1002/hep.27743.

Unsworth, B. R.; Lelkes, P. I. (1998): Growing tissues in microgravity. In: *Nature Medicine* 4 (8), S. 901–907. DOI: 10.1038/nm0898-901.

van Veen, H. W.; Abee, T.; Kleefsman, A. W.; Melgers, B.; Kortstee, G. J.; Konings, W. N.; Zehnder, A. J. (1994a): Energetics of alanine, lysine, and proline transport in cytoplasmic membranes of the polyphosphate-accumulating *Acinetobacter johnsonii* strain 210A. In: *Journal of Bacteriology* 176 (9), S. 2670–2676. DOI: 10.1128/JB.176.9.2670-2676.1994.

van Veen, H. W.; Abee, T.; Kortstee, G. J.; Pereira, H.; Konings, W. N.; Zehnder, A. J. (1994b): Generation of a proton motive force by the excretion of metal-phosphate in the polyphosphate-accumulating *Acinetobacter johnsonii* strain 210A. In: *Journal of Biological Chemistry* 269 (47), S. 29509–29514. DOI: 10.1016/s0021-9258(18)43909-9.

van Veen, H. W.; Abee, T.; Kortstee, G. J.; Pereira, H.; Konings, W. N.; Zehnder, A. J. (1994c): Generation of a proton motive force by the excretion of metal-phosphate in the polyphosphate-accumulating *Acinetobacter johnsonii* strain 210A. In: *Journal of Biological Chemistry* 269 (47), S. 29509–29514. DOI: 10.1016/s0021-9258(18)43909-9.

Vinci, Maria; Gowan, Sharon; Boxall, Frances; Patterson, Lisa; Zimmermann, Miriam; Court, William et al. (2012): Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. In: *BMC biology* 10, S. 29. DOI: 10.1186/1741-7007-10-29.

Voelz, H.; Voelz, U.; Ortigoza, R. O. (1966): The "polyphosphate overplus" phenomenon in *Myxococcus xanthus* and its influence on the architecture of the cell. In: *Archiv für Mikrobiologie* 53 (4), S. 371–388. DOI: 10.1007/BF00409874.

- Vogelstein, B.; Fearon, E. R.; Hamilton, S. R.; Kern, S. E.; Preisinger, A. C.; Leppert, M. et al. (1988): Genetic alterations during colorectal-tumor development. In: *The New England journal of medicine* 319 (9), S. 525–532. DOI: 10.1056/NEJM198809013190901.
- Wang, J.; Chenivesse, X.; Henglein, B.; Bréchet, C. (1990): Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. In: *Nature* 343 (6258), S. 555–557. DOI: 10.1038/343555a0.
- Wang, Xiaohong; Schröder, Heinz C.; Müller, Werner E. G. (2018): Amorphous polyphosphate, a smart bioinspired nano-/bio-material for bone and cartilage regeneration: towards a new paradigm in tissue engineering. In: *Journal of materials chemistry. B* 6 (16), S. 2385–2412. DOI: 10.1039/c8tb00241j.
- Wanner, B. L.; Chang, B. D. (1987): The *phoBR* operon in *Escherichia coli* K-12. In: *Journal of Bacteriology* 169 (12), S. 5569–5574. DOI: 10.1128/jb.169.12.5569-5574.1987.
- Wartenberg, M.; Dönmez, F.; Ling, F. C.; Acker, H.; Hescheler, J.; Sauer, H. (2001): Tumor-induced angiogenesis studied in confrontation cultures of multicellular tumor spheroids and embryoid bodies grown from pluripotent embryonic stem cells. In: *FASEB J* 15 (6), S. 995–1005. DOI: 10.1096/fj.00-0350com.
- Weiswald, Louis-Bastien; Guinebretière, Jean-Marc; Richon, Sophie; Bellet, Dominique; Saubaméa, Bruno; Dangles-Marie, Virginie (2010): In situ protein expression in tumour spheres: development of an immunostaining protocol for confocal microscopy. In: *BMC Cancer* 10 (1), S. 106. DOI: 10.1186/1471-2407-10-106.
- Welzel; Graubard; Quraishi (2013): Population-attributable fractions of risk factors for hepatocellular carcinoma in the United States. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc4105976/>.
- Wiens, Matthias; Wang, Xiaohong; Schlossmacher, Ute; Lieberwirth, Ingo; Glasser, Gunnar; Ushijima, Hiroshi et al. (2010): Osteogenic potential of biosilica on human osteoblast-like (SaOS-2) cells. In: *Calcified tissue international* 87 (6), S. 513–524. DOI: 10.1007/s00223-010-9408-6.
- Wild; E Weiderpass; BW Stewart (2020): World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Licence: CC BY-NC-ND 3.0 ...

Wong, Carlos K. H.; Lam, Cindy L. K.; Poon, Jensen T. C.; McGhee, Sarah M.; Law, Wai-Lun; Kwong, Dora L. W. et al. (2012): Direct medical costs of care for Chinese patients with colorectal neoplasia: a health care service provider perspective. In: *Journal of evaluation in clinical practice* 18 (6), S. 1203–1210. DOI: 10.1111/j.1365-2753.2011.01776.x.

Wong, Martin C. S.; Huang, Junjie; Lok, Veeleah; Wang, Jingxuan; Fung, Franklin; Ding, Hanyue; Zheng, Zhi-Jie (2021): Differences in Incidence and Mortality Trends of Colorectal Cancer Worldwide Based on Sex, Age, and Anatomic Location. In: *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 19 (5), 955-966.e61. DOI: 10.1016/j.cgh.2020.02.026.

Wood, Harland G.; Clark, Joan E. (1988): Biological Aspects of Inorganic Polyphosphates. In: *Annual review of biochemistry* 57 (1), S. 235–260. DOI: 10.1146/ANNUREV.BI.57.070188.001315.

Xiang, Xinran; Phung, Yen; Feng, Mingqian; Nagashima, Kunio; Zhang, Jingli; Broaddus, V. Courtney et al. (2011): The development and characterization of a human mesothelioma in vitro 3D model to investigate immunotoxin therapy. In: *PLOS ONE* 6 (1), e14640. DOI: 10.1371/journal.pone.0014640.

Xiaohong Wang; Heinz C. Schröder; Werner E. G. Müller (2018): Amorphous polyphosphate, a smart bioinspired nano-/bio-material for bone and cartilage regeneration: towards a new paradigm in tissue engineering.

Xu, Tao; Jin, Joyce; Gregory, Cassie; Hickman, J. J. James J.; Boland, Thomas (2005): Inkjet printing of viable mammalian cells. In: *Biomaterials* 26 (1), S. 93–99. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.04.011.

Xu, Tao; Zhao, Weixin; Zhu, Jian-Ming; Albanna, Mohammad Z.; Yoo, James J.; Atala, Anthony (2013): Complex heterogeneous tissue constructs containing multiple cell types prepared by inkjet printing technology. In: *Biomaterials* 34 (1), S. 130–139. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.09.035.

YA Ghouri (2017): Review of hepatocellular carcinoma: Epidemiology, etiology, and carcinogenesis. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc5490340/>.

Yamada, Kenneth M.; Cukierman, Edna (2007): Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D. In: *Cell* 130 (4), S. 601–610. DOI: 10.1016/j.cell.2007.08.006.

Zentrum für Krebsregisterdaten (2021): Krebs in Deutschland für 2015/2016. Online verfügbar unter https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/ZfKD/zfkd_node.html.

ZfKD (2021): ZfKD. Online verfügbar unter https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/ZfKD/zfkd_node.html.

Zhang, Haiyu; Gómez-García, María R.; Shi, Xiaobing; Rao, Narayana N.; Kornberg, Arthur (2007): Polyphosphate kinase 1, a conserved bacterial enzyme, in a eukaryote, *Dictyostelium discoideum*, with a role in cytokinesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (42), S. 16486–16491. DOI: 10.1073/pnas.0706847104.

Zhang, Tao; Ahn, Korea; Emerick, Brooks; Modarai, Shirin R.; Opdenaker, Lynn M.; Palazzo, Juan et al. (2020): APC mutations in human colon lead to decreased neuroendocrine maturation of ALDH⁺ stem cells that alters GLP-2 and SST feedback signaling: Clue to a link between WNT and retinoic acid signalling in colon cancer development. In: *PLOS ONE* 15 (10), e0239601. DOI: 10.1371/journal.pone.0239601.

Zhang, Xiaoying (2015): Tissue Engineering Applications of Three-Dimensional Bioprinting. In: *Cell Biochemistry and Biophysics* 72 (3), S. 777–782. DOI: 10.1007/s12013-015-0531-x.

Zhao, Rui; Michor, Franziska (2013): Patterns of proliferative activity in the colonic crypt determine crypt stability and rates of somatic evolution. In: *PLOS Computational Biology* 9 (6), e1003082. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003082.

Zouzo, Vaia; Brooks, Claire; Kulke, Claire; Renji, Elizabeth; Cameron, Fiona; Tamhne, Sarang et al. (2021): P11 Characteristics of children with intussusception in Peutz-Jeghers Syndrome in a specialist centre over a 10 year period. In: *Frontline Gastroenterology* 12 (Suppl 1), A17.2-A18. DOI: 10.1136/flgastro-2021-bspghan.22.

Zucman-Rossi, Jessica; Villanueva, Augusto; Nault, Jean-Charles; Llovet, Josep M. (2015): Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. In: *Gastroenterology* 149 (5), 1226-1239.e4. DOI: 10.1053/j.gastro.2015.05.061.

7 Publikationsliste

Teile der vorliegenden Arbeit wurden als Posterbeiträge auf wissenschaftlichen Kongressen vorgestellt. Im Folgenden sind die Titel dieser Publikationen aufgelistet.

Posterbeiträge:

L. Glisic, N. Kühn, E. Aschenbrenner, K. Pollinger, M. Neufurth, W. Müller, FP Armbruster, M. Müller, C. Kunst (2018): *Einfluss von polyP-Substraten auf das Wachstumsverhalten humaner Tumorzelllinien als Grundlage für die Etablierung eines innovativen Zellkulturmodells*. In: *Z Gastroenterol* 2018; 56(05): e23-e24. DOI: 10.1055/s-0038-1648610.

L. Glisic, N. Kühn, E. Aschenbrenner, K. Pollinger, M. Neufurth, W. Müller, FP Armbruster, C. Kunst, K. Gülow, M. Müller-Schilling, *Einfluss von Polyphosphat-Substraten auf das Wachstumsverhalten humaner Tumorzelllinien als Grundlage für die Etablierung eines innovativen Zellkulturmodells*, 46. Jahrestagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern, Juni 2018.

L. Glisic, N. Kühn, E. Aschenbrenner, K. Pollinger, M. Neufurth, W. Müller, FP Armbruster, C. Kunst, K. Gülow, M. Müller-Schilling (2021): *Einfluss von polyP-Substraten auf das Wachstumsverhalten des HCCs als Grundlage für ein innovatives Tumormodell*. In: *Z Gastroenterol* 2021; 59(01): e46. DOI: 10.1055/s-0040-1722070.

L. Glisic, N. Kühn, E. Aschenbrenner, K. Pollinger, M. Neufurth, W. Müller, FP Armbruster, C. Kunst, K. Gülow, M. Müller-Schilling, *Einfluss von polyP-Substraten auf das Wachstumsverhalten humaner Tumorzelllinien als Grundlage für die Etablierung eines innovativen Zellkulturmodells*, 48. Jahrestagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern, Juli 2021.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Allen voran gilt mein größter Dank der Lehrstuhlinhaberin Frau Prof. Dr. Martina Müller-Schilling für die Ermöglichung der Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I sowie für die Förderung experimenteller Doktorarbeiten. Während der Entstehung dieser Doktorarbeit habe ich immer an einen bestimmten Spruch von Frau Professor Müller-Schilling gedacht. Frau Professor Müller-Schilling sagte immer: „Man sollte immer einen guten Plan und gute Laune haben und so wird jede Arbeit erfolgreich.“ Dieser Spruch hat mich die ganze Zeit begleitet, motiviert und wird für immer in meiner Erinnerung bleiben. Ich bedanke mich bei Frau Professor Müller-Schilling besonders für die lebhaften und hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen und für die Möglichkeit zur Teilnahme an mehreren internationalen und nationalen Kongressen. Besonders in Erinnerung bleiben wird mir der DGIM-Kongress 2018 in Mannheim. Nach dem Kongress in Mannheim erfolgte die Einladung von Frau Professor Müller-Schilling nach Heidelberg, wo Frau Professor Müller-Schilling ihre ersten Schritte in ihrer wissenschaftlichen Karriere gemacht hatte. Eine persönliche Stadtführung durch Frau Professor Müller-Schilling durch Heidelberg, schöne Anekdoten aus ihrer Zeit an der Klinik in Heidelberg und ein gemeinsames Abendessen in Hotel Europäischer Hof in Heidelberg werden mir immer in Erinnerung bleiben. Der Besuch in Heidelberg hat mich in schweren Momenten während der Entstehung dieser Doktorarbeit immer stark motiviert, voranzukommen, da ich immer an Frau Professor Müller-Schilling und ihren Anfang in Heidelberg gedacht habe. Nur durch diese Motivation und das riesige persönliche Engagement von Frau Professor Müller-Schilling konnte diese Doktorarbeit entstehen. Mein spezieller Dank an Frau Professor Müller-Schilling erfolgt auch für eine sehr persönliche und individuelle Betreuung. Das gilt nicht nur für die Lösungen der wissenschaftlichen Herausforderungen, sondern auch für die persönlichen Probleme, die im Leben vorkommen können und die sich auf die wissenschaftliche Arbeit auswirken. Frau Professor Müller-Schilling war immer zu persönlichen Gesprächen und Beratung bereit und hat durch ihre sehr emphatische und herzliche Art für jedes Problem eine entsprechende und gute Lösung gefunden. Ohne diese Unterstützung und wissenschaftliche Kompetenz von Frau Professor Müller-Schilling wäre die Entstehung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Wenn man eine Doktormutter wie Frau Professor Müller-Schilling hat, ist das eine Ehre und das Rezept für eine erfolgreiche und gute wissenschaftliche Arbeit. Ich kann Frau Professor Müller-Schilling als

Doktormutter sehr empfehlen und man kann als Doktorand sehr froh sein, wenn man eine Doktormutter wie Frau Professor Müller-Schilling hat.

Ich möchte mich auch bei Frau PD Dr. Claudia Kunst, Frau Dr. Sophie Schlosser und Herrn PD Dr. Karsten Gülow für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung sowie für das große Interesse am Gelingen der Arbeit bedanken. Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Frau Professor Müller-Schilling sowie des Forschungsbaus H1 möchte ich mich für das sehr angenehme Arbeitsklima bedanken. Mein großer Dank geht hierbei an Elisabeth Aschenbrenner, Kirstin Pollinger und Manuela Gunckel.

Bei meiner Mutter möchte ich mich für die großartige Unterstützung und den großen Rückhalt in jeglicher Hinsicht während meines Studiums und während dieser Arbeit bedanken.

9 Curriculum vitae

Name: Lazar Glisic
Geburtsdatum: 16.01.1992
Geburtsort: Belgrad (Republik Serbien)
Adresse: Dr.-Gessler-Straße 15
93051 Regensburg
Kontakt: lazarglisic@homail.com

Hochschul- und Schullaufbahn:

Erhalt der Approbation: 06/2020

Studium der Betriebswirtschaftslehre
an der Universität Regensburg:

10/2019 – aktuell

Praktisches Jahr:

05/2019 – 05/2020

Doktorand bei Frau Prof. Dr. Müller-Schilling seit

09/2017

Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg:

10/2013

Gymnasiumabitur („Große Matura“) und

Erhalt der Hochschulreife:

06/2011

Gymnasium Smederevo, Smederevo:

09/2007 – 06/2011

Nationalabitur („Kleine Matura“):

06/2007

Grundschule Dimitrije Davidovic, Smederevo:

09/1999 – 06/2007

Berufliche Laufbahn:

Assistenzarzt in der Facharztweiterbildung für Gastroenterologie an der Klinik und Poliklinik
für Innere Medizin I bei Frau Prof. Martina Müller-Schilling: 07/2020 – aktuell

10 Promotionserklärung

Erklärung nach § 3 der Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg.

Hiermit erkläre ich, Lazar Glisic, geboren am 16.01.1992, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, August 2021

Lazar Glisic