

**Organotypische Schnittkulturen aus humanen Adenokarzinomen des Magens und des  
gastroösophagealen Überganges**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von:  
Karl Justus Körfer  
geboren am 17.07.1990 in Hannover

angefertigt an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig  
Universitäres Krebszentrum Leipzig (UCCL)  
Institut für Anatomie

Betreuer: Prof. Dr. med. Florian Lordick, Prof. Dr. med. Ingo Bechmann

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom:  
21.03.2017

## **Inhaltsverzeichnis**

1. Einleitung	5
1.1 Magenkarzinom und Karzinome des gastroösophagealen Überganges	5
Epidemiologie	5
Ätiologie und Pathogenese	6
Histologie	7
Symptome und Diagnose	8
1.2 Aktuelle Therapie	9
Lokalisierte Tumorstadien	10
Fortgeschrittene Tumorstadien	11
Biologisch zielgerichtete Therapieoptionen	12
1.3 Präklinische Tumormodelle	13
Tumormikroumgebung	13
Zellkulturen	15
Xenograft-Modelle	16
Gewebe-Schnittkulturen	16
2. Fragestellung	18
3. Literaturverzeichnis der Einleitung	19
4. Publikation	24
5. Zusammenfassung	35
6. Anlagen	37
7. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	40
8. Lebenslauf	41
9. Danksagungen	42

Bibliographische Beschreibung:

Körper, Karl Justus

Organotypische Schnittkulturen aus humanen Adenokarzinomen des Magens und des gastroösophagealen Überganges

Universität Leipzig, Dissertation

42 S.<sup>1</sup>, 86 Lit.<sup>2</sup>, 5 Abb., 1 Tab., 1 Publikation

Referat:

Adenokarzinome des Magens und des gastroösophagealen Überganges sind eine Gruppe sehr aggressiver Tumoren des oberen Gastrointestinaltrakts. Mit 952.000 Neuerkrankungen pro Jahr und einer hohen Mortalität (723.000 pro Jahr weltweit) gehören sie zu den häufigsten und in der Mehrzahl tödlich verlaufenden Tumorerkrankungen. Eine unbefriedigende Therapieresponse und die biologische Heterogenität dieser Tumorentität tragen zur schlechten Prognose bei und unterstreichen die Notwendigkeit der Entwicklung von zielgenauen und effektiven Therapiestrategien.

In diesem Projekt wurde untersucht, ob sich Schnittkulturen aus Adenokarzinomen des Magens und des gastroösophagealen Überganges erstellen lassen und ob ein Effekt nach zytotoxischer Therapie *in vitro* zu erkennen ist. Nach Gewebeentnahme aus operativen Resektaten erfolgte eine umgehende Präparation im Labor. Anschließend wurde das Tumorgewebe in 400 µm durchmessende Dünnschicht-Präparate geschnitten und über sechs Tage in RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) kultiviert. An verschiedenen Kultivierungszeitpunkten (Tag 2, 4 und 6) wurde die Morphologie, Tumorzellularität und Vitalität mittels Auszählung der Gesamtzellzahl und der Tumorzellzahl in immunhistochemisch gefärbten Schnitten analysiert. Zudem wurden die Schnittkulturen über zwei Tage *in vitro* mit klinisch gängigen Chemotherapeutika für das Magenkarzinom (5-FU und Cisplatin) exponiert.

Wir konnten zeigen, dass sich das Tumorgewebe mit nur geringen histomorphologischen Veränderungen über sechs Tage erfolgreich kultivieren ließ. Die Morphologie der Tumorzellen, die Drüsenarchitektur sowie das umliegende Stromagewebe blieben über den gesamten Kultivierungszeitraum gut erhalten. Es wurde kein signifikanter Abfall in der Gesamtzellzahl und Tumorzellzahl beobachtet, was die Stabilität und Vitalität der Schnittkulturen bestätigt.

---

<sup>1</sup>Seitenzahl insgesamt <sup>2</sup>Zahl der im Literaturverzeichnis ausgewiesenen Literaturangaben

Der Kultivierungszeitraum von 6 Tagen ermöglicht es, in diesem System verschiedene Experimente durchzuführen. Nach zwei Tagen Exposition mit Chemotherapeutika in vitro konnten vermehrt Chemotherapie-induzierte Prozesse wie die Erhöhung des Anteils apoptotischer Zellen und eine Senkung der Tumorzellularität dargestellt werden. Diese in vitro Chemotherapie-Response konnte jedoch nicht bei jeder Patientenprobe beobachtet werden, was die klinische Erfahrung bezüglich unterschiedlich ausgeprägter und teils fehlender in vivo Response der Magenkarzinome und Karzinome des gastroösophagealen Übergangs auf Chemotherapie widerspiegelt.

## **1. Einleitung**

Im folgenden Abschnitt wird die Tumorentität des Magenkarzinoms und der Karzinome des gastroösophagealen Überganges im Allgemeinen dargestellt. Es werden die Herausforderungen zur Verbesserung der Therapie durch klinische und präklinische Forschungsansätze skizziert.

### **1.1 Magenkarzinom und Karzinome des gastroösophagealen Überganges**

Magenkarzinome und Karzinome des gastroösophagealen Überganges sind maligne epitheliale Tumore, die sich morphologisch am häufigsten als Adenokarzinome darstellen [1]. Zu den klassischen Lokalisationen der Magenkarzinome gehören der Magenkorpus und das Antrum. Abgrenzbar von diesen Lokalisationen sind die Karzinome des gastroösophagealen Überganges (*Adenocarcinoma of the esophagogastric junction*, AEG), die in folgende drei Typen nach Siewert unterschieden werden können: Adenokarzinome des distalen Ösophagus (AEG Typ I), Adenokarzinome der Kardialia (AEG Typ II) und subkardial gelegenen Adenokarzinome des Magens (AEG Typ III) [2]. In der aktuellen deutschen S3-Leitlinie „Magenkarzinom“ werden zwar beide Lokalisationen (Kardial- und nicht-Kardial-Magenkarzinome) in einer Gruppe zusammengefasst, jedoch sind Unterschiede hinsichtlich der Epidemiologie, der Pathogenese und der Prognose beider Lokalisationen vorhanden [3].

### **Epidemiologie**

Mit 952.000 Neuerkrankungen und einer hohen Mortalität von 723.000 Todesfällen im Jahr 2012 gehören Magenkarzinome und AEG zu den häufigsten und in der Mehrzahl der Fälle tödlich verlaufenden Tumorerkrankungen weltweit [4]. Während die Inzidenz der distalen Magenkarzinome sinkt [5], kann eine zunehmende Inzidenz von Neuerkrankungen im Bereich der AEG-Karzinome insbesondere in der westlichen Welt beobachtet werden [6,7]. Dies ist teilweise durch die Zunahme der Adipositas und der chronischen gastro-ösophagealer Refluxkrankheit zu erklären [8]. Die Abnahme der distalen Magenkarzinome in der westlichen Welt hingegen lässt sich u.a. auf eine reduzierte *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) Infektionsrate, bessere Nahrungsmittelhygiene und sinkenden Tabakkonsum zurückzuführen [9]. Beim Magenkarzinom lässt sich eine ungleiche weltweite Verteilung der Inzidenz erkennen, die auf unterschiedlichen regionalen Lebens- und Ernährungsgewohnheiten und unterschiedlicher Prävalenz von *H. pylori* Infektionen beruht [10]. Die höchsten Inzidenzraten werden in Ostasien, Osteuropa und Südamerika und die niedrigsten Raten in Nordamerika beschrieben [11].

## **Ätiologie und Pathogenese**

Das Magenkarzinom entwickelt sich wie andere gastrointestinale Tumore als mehrstufiger Prozess über eine chronische Gastritis, Schleimhautatrophie, intestinale Metaplasie und Dysplasie zu einem Karzinom [12]. Bei 50 % der Patienten mit langjähriger H. pylori-Infektion entwickelt sich eine chronische Typ-B-Gastritis mit atrophischen Schleimhautveränderungen [13]. Weitere Risikofaktoren für die Entwicklung eines Magenkarzinoms sind Tabakkonsum [14], eine salzreiche Ernährung [15] und hoher Alkoholkonsum [16].

Die Hauptrisikofaktoren für AEG-Tumoren sind Adipositas [17] und die gastroösophageale Refluxerkrankung [18]. Ca. 10 % der Patienten mit einer Refluxerkrankung leiden an einer Refluxösophagitis; hierbei führt häufiger Reflux von Magensekret zu einer Entzündung der distalen Ösophagusschleimhaut. Bei wiederum ca. 10 % dieser Patienten entwickeln sich in der Folge metaplastische Schleimhautveränderungen (Barrett-Schleimhaut). Aus dieser metaplastisch veränderten Schleimhaut entsteht in ca. 10 % der Fälle über die Gesamtlebensspanne ein Adenokarzinom [19]. Neuere Studien stellen diese Zahlen zum Teil in Frage [20,21].

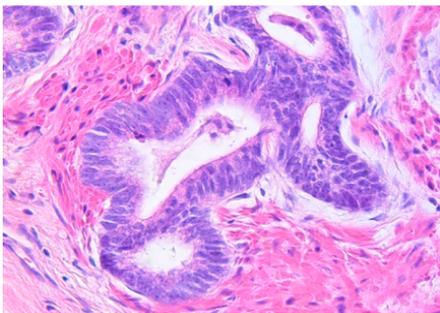
90 % der Magenkarzinome treten sporadisch auf, und in 10 % der Fälle ist eine familiäre Häufung zu erkennen. Zu den erblich bedingten Magenkarzinomen (1-3 %) zählen folgende Typen: hereditary diffuse gastric cancer (HDGC) [22] und gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS) [23]. Beim HDGC liegen ursächlich meist Alterationen des E-Cadherin-Gens (CDH1) vor [24,25], wohingegen beim GAPPS bisher keine ursächlichen Genmutationen identifiziert werden konnten [23].

Die molekulare Pathogenese bei sporadisch auftretenden Magenkarzinomen ist komplex und beinhaltet viele genetische und epigenetische Alterationen, chromosomale Aberrationen und veränderte Signalkaskaden. Diese Alterationen und veränderten Signalkaskaden bieten möglicherweise Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer zielgerichteter pharmakologischer Substanzen. Die Amplifikation des humanen epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) spielt hierbei eine wichtige Rolle. Der HER2-Rezeptor gehört zu der Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren und ist beteiligt an der Signalkaskade für Zellwachstum und Zelldifferenzierung [26]. Eine Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktor (Epithelial Growth Factor, EGF) liegt bei rund 30 % aller Magenkarzinome vor [27]. Der EGF-Rezeptor ist ein transmembraner Glykoproteinrezeptor der EGF Familie, dessen Aktivierung eine Phosphorylierung von intrazellulären Tyrosinkinase und nachfolgenden Aktivierung von Signalkaskaden wie

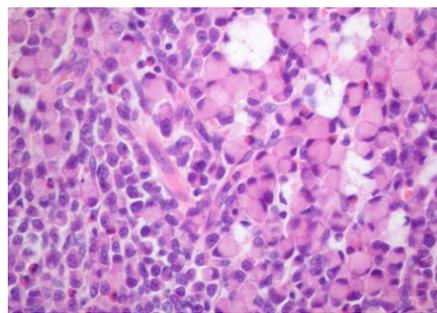
Ras/Raf/MAPK oder Akt/mTOR bewirkt [28,29]. Insgesamt sind 15 % aller Magenkarzinome HER2-positiv, dabei weist der intestinale Typ nach Lauren eine häufigere HER2-positive Rate (33 %) auf als der diffuse Typ mit nur 6 % HER2-positiven Fällen [30].

### **Histologie**

Die morphologische und molekulare inter- und intratumorale Heterogenität sind charakteristisch für Magen- und AEG-Karzinome. Häufig sind mehrere verschiedene histologische Muster in einem Tumor zu erkennen [31]. Traditionell können Magen- und AEG-Karzinome nach Lauren in einen intestinalen und einen diffusen Subtyp unterteilt werden [32], hinzu kommt noch ein intermediärer oder Mischtyp [33]. Die WHO definiert zur Zeit fünf histologische Subtypen: den tubulären, den muzinösen und den papillären Typ, die dem intestinalen Typ nach Lauren entsprechen, sowie die wenig kohäsiv wachsenden Tumoren, die dem diffusen Typ nach Lauren entsprechen und zuletzt werden gemischte Typen beschrieben [34]. Der intestinale Typ nach Lauren (siehe Abb. 1) ist meist gut bis mäßig differenziert und ist durch drüsenartige Strukturen charakterisiert, die von desmoplastischem Stroma umgeben sind. Die Tumorzellen sind typischerweise groß, ihre Nuclei sind pleomorph und zeigen vermehrt Mitosen [35]. Der diffuse Typ nach Lauren (siehe Abb. 2) hingegen zeichnet sich durch einzelne oder in kleinen Gruppen verteilte Tumorzellen ohne eine Drüsenstruktur aus. Dieser Typ kann sich als Siegelringzellkarzinom oder als wenig kohäsiv wachsender Tumor darstellen. Siegelringzellen sind Tumorzellen, bei denen zytoplasmatische gelegene und mit Mucin gefüllte Vakuolen den Zellkern an den Rand der Zelle drängen [31].



*Abb. 1: intestinaler Typ nach Lauren*



*Abb. 2: diffuser Typ nach Lauren*

## Symptome und Diagnose

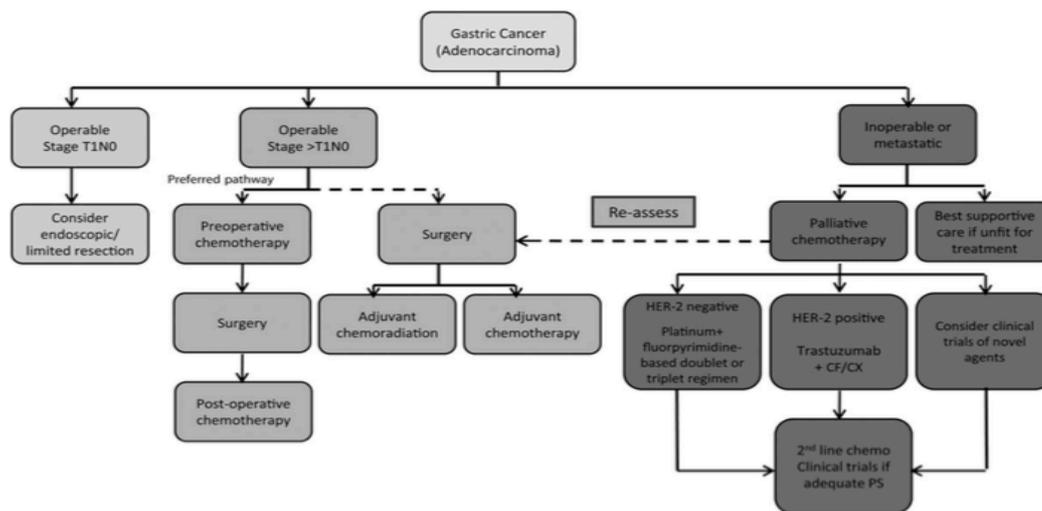
Magen- und AEG-Karzinome werden meist erst in fortgeschrittenen Stadien symptomatisch, sodass die Diagnose spät erfolgt und häufig eine kurative Therapie nicht mehr möglich ist [36]. Zu den typischen Symptomen gehören: Dysphagie (vor allem bei AEG), rezidivierendes Erbrechen, Inappetenz, Gewichtsverlust oder gastrointestinale Blutungen [37]. Die Primärdiagnose wird durch Endoskopie des oberen Gastrointestinaltrakts, Biopsie und histologischer Untersuchung des suspekten Gewebes gestellt. Für die klinische Zuordnung zur jeweils aktuell gültigen Union Internationale Contre le Cancer (UICC)-Klassifikation (klinisches Staging) werden bildgebende Verfahren wie Oberbauchsonographie und Kontrastmittelcomputertomographie (Thorax, Abdomen und Becken) durchgeführt. Die lokale Infiltrationstiefe des Tumors wird neben der hochauflösenden Computertomographie mittels Endosonographie bestimmt [37]. Magenkarzinome werden mittels TNM-Klassifikation hinsichtlich der Ausdehnung (Größe, Infiltrationstiefe) des Primärtumors (T), des Lymphknotenbefalls (N) und Metastasen (M) kategorisiert [38]. Diese Kategorisierung wird einem Tumorstadium der UICC-Klassifikation zugewiesen (siehe Tab. 1) aus der die Prognose und die stadienabhängige Therapie abgeleitet wird.

<i><u>Stage grouping</u></i>	<i><u>T stage</u></i>	<i><u>N stage</u></i>	<i><u>M stage</u></i>
Stage IA	T1	N0	M0
Stage IB	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stage IIA	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stage IIB	T1	N3	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4a	N0	M0
Stage IIIA	T2	N3	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N1	M0
Stage IIIB	T3	N3	M0
	T4a	N2	M0
	T4b	N0-1	M1
Stage IIIC	T4a	N3	M0
	T4b	N2-3	M0
Stage IV	Any T	Any N	M1

**Tab. 1:** UICC-Klassifikation beim Magenkarzinom aus: TNM: classification of malignant tumours, 7<sup>th</sup> edition, Sobin et al., 2010 [38]

## 1.2 Aktuelle Therapie

Abhängig vom Tumorstadium, dem Alter und dem Allgemeinzustand der Patienten erfolgt die Entscheidung, ob eine kurative (operable Stadien) oder eine palliative (nicht operable und/oder metastasierte Stadien) Therapie durchgeführt wird. Im Vergleich zu anderen Tumorentitäten hat das Magenkarzinom nach palliativer sowie auch nach potentiell kurativer Therapie eine schlechte Prognose. Patienten mit einem inoperablen oder metastasierten Tumorleiden haben eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von weniger als 10 %. Das mediane Überleben nach Diagnosestellung beträgt selbst unter aktiven Therapien weniger als 12 Monate [39]. Patientenkollektive, die unter kurativer Zielsetzung behandelt werden, weisen ein medianes Überleben von ca. 40 Monate auf; nur 40 % der Patienten erreichen ein 5-Jahres-Überleben [40]. Neben den etablierten Therapiekonzepten besteht die Möglichkeit, Patienten im Rahmen klinischer Studien zu behandeln, um neue Therapieansätze und -strategien zu untersuchen. Im Bereich der medikamentösen Therapie haben in den letzten Jahren Substanzen mit spezifischem Wirkungsmechanismus, wie Trastuzumab, ein gegen HER2 gerichteter Antikörper, an Bedeutung gewonnen. Nach positiven Ergebnissen in klinischen Studien wurde Trastuzumab in die Therapie des fortgeschrittenen Magenkarzinoms implementiert. Klinische Studien dauern meist mehrere Jahre, abhängig von dem gewählten Studiendesign und der eingeschlossenen Patientenzahl. Zudem wird der Nutzen eines neuen Medikamentes an einer randomisierten Gruppe von Patienten geprüft, woraus Empfehlungen für die klinische Routineversorgung abgeleitet werden. Die für das Magenkarzinom charakteristische inter- und intratumorale Heterogenität führt dazu, dass zahlreiche Patienten (teilweise trotz positiver Studienergebnisse) wenig bis keinen Nutzen von den in Studien ermittelten Therapieempfehlungen haben. Es besteht daher zunehmend das Bestreben nach personalisierten Therapiekonzepten entsprechend der individuellen Tumorbiologie. Um diesen Ansatz zu untersuchen, könnten Dünnschnittkulturen ein attraktives ex vivo Tumormodell darstellen. Abbildung 3 zeigt die aktuell empfohlenen Algorithmen der Europäischen Gesellschaft für medizinische Onkologie (ESMO) zur Behandlung des Magenkarzinoms, die im folgenden Kapitel explizit beschrieben werden [41].



**Abb. 3:** Behandlungsalgorithmus für Magenkarzinome nach der ESMO Richtlinie, aus: *Gastric cancer: ESMO-ESSO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*, Waddell et al., *Annals of Oncology*, 2013 [41]

### Lokalisierte Tumorstadien

Bei Magenkarzinomen und AEG in lokalisierten Stadien (ohne Fernmetastasierung) ist die operative Therapie das Mittel der Wahl. Bei Patienten mit einem Magenfrühkarzinom (Stadium  $\leq$ IA) kann der Tumor, sofern er gut differenziert, kleiner als 2cm groß und auf die Mukosa beschränkt ist, mittels endoskopischer Resektion abgetragen werden. Das primäre Ziel der operativen Verfahren ist eine komplette Resektion des Tumors mit tumorfreien Resektionsrändern (R0). Bei Patienten mit einem Tumorstadium IB-III ist eine radikale Gastrektomie und Lymphadenektomie indiziert [3].

Die deutsche S3-Leitlinie „Magenkarzinom“ und die europäischen Leitlinien sehen für Patienten mit einem lokalisierten Tumorstadium jenseits der T1-Kategorie ein multimodales Therapiekonzept vor. Dieses besteht aus der Gastrektomie sowie einer perioperativen Chemotherapie (bevorzugt gegenüber dem rein adjuvanten Verfahren) vor. Fünf verschiedene Substanzklassen finden in der Chemotherapie des Magenkarzinoms bevorzugt Verwendung: Fluoropyrimidine (5-FU), Platin-Verbindungen, Taxane, Topoisomerase-Hemmer und Anthracycline. Diese Substanzen werden in verschiedenen Regimen verabreicht, wobei die optimale Kombination noch nicht genau definiert ist [42]. Weltweit werden unterschiedliche Konzepte bezüglich der optimalen perioperativen Strategie diskutiert. In Europa wird eine perioperative Chemotherapie mit Platin-Verbindungen, 5-FU und mit oder ohne Epirubicin empfohlen [3], während man in Asien meistens auf eine neoadjuvante Therapie verzichtet und nur postoperative Chemotherapie (vor allem Capecitabine (orale Form von 5-FU)+Oxaliplatin oder S1 (5-FU-Prodrug)) verabreicht [43]. In Nordamerika, insbesondere in den USA, werden

Patienten bevorzugt adjuvant mit einer Radiochemotherapie (45 Gy + 5-FU) behandelt [44]. Die Unterschiede begründen sich aus zum Teil historisch gewachsenen divergenten Entwicklungen der regionalen Studiengruppen; zum Teil aus unterschiedlichen anzutreffenden Tumorstadien und -lokalisationen bei Erstdiagnose.

Im neoadjuvanten Therapiesetting kann nur bei weniger als einem Viertel der Patienten ein gutes klinisches Ansprechen (Response) erreicht werden und die histopathologisch gesicherte komplette Response wird mit den etablierten Therapieschemata in weniger als 5 % der Fälle beobachtet. Zudem ist das 5-Jahres-Überleben mit rund 40 % in kurativer Therapieintention immer noch unbefriedigend niedrig [45]. Das schlechte Gesamtüberleben und die unzureichende Response auf eine neoadjuvante Chemotherapie lassen vermuten, dass etwa 75 % der Patienten wenig von den etablierten neoadjuvanten Therapiekonzepten profitieren (sogenannte Non-Responder). Zudem konnten Studien zeigen, dass Non-Responder eine wesentlich schlechtere Prognose nach der Operation haben als Chemotherapie-Responder [46]. Diese Patienten verlieren wertvolle Zeit und leiden an den unerwünschten Nebenwirkungen der Therapie. Daher ist es von enormer Relevanz, diesen Teil der Patienten vor Therapiebeginn zu identifizieren und ihnen zukünftig personalisierte und potenziell wirksamere Therapiekonzepte anzubieten. Studien haben verschiedene Möglichkeiten untersucht, ob und wie eine Vorhersage der Response bestimmt werden kann. Dazu gehört die Untersuchung von histomorphologischen und molekularen Tumorcharakteristika [47], Gewebebiomarker [30] sowie die frühe Response-Evaluation mittels metabolischer Bildgebung (PET-CT) [48]. Die Entwicklung neuer Tumor-basierter translationaler Forschungsmodelle (z.B. Xenografts oder organotypische Schnittkulturen) soll diesen Forschungsansatz unterstützen [49–51].

### **Fortgeschrittene Tumorstadien**

Bei Patienten mit lokal weit fortgeschrittener oder metastasierter Tumorerkrankung ist eine Chemotherapie in palliativer Intention indiziert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Chemotherapie Vorteile hinsichtlich der Überlebensdauer gegenüber alleiniger symptomorientierter Therapie („best supportive care“) hat [52]. Eine Vielzahl von Kombinationen der verschiedenen Therapeutika (Doubletten und Tripletten) stehen für die palliative Chemotherapie zur Verfügung. Diese Schemata müssen sorgfältig je nach Allgemeinzustand, Komorbidität und Organfunktionen des Patienten ausgewählt werden [53]. Tripletten sind effektiver aber mit größerer Toxizität behaftet, so dass diese Schemata nur bei jüngeren Patienten mit gutem Allgemeinzustand und guten Organfunktionen angewendet werden sollten [54]. Die ESMO-Leitlinien empfehlen auf Basis der REAL-2-Studie in der

Erstlinientherapie eine Kombination aus 5-FU (oder bei oraler Gabe: Capecitabine) und Platin-Verbindungen [55,56]. Alternative Optionen in der Erstlinientherapie sind Taxan-basierte Kombinationen oder Irinotecan plus 5-FU [57]. Zusätzlich wird bei Patienten mit HER2-positiven Tumoren Trastuzumab (monoklonaler Antikörper gegen HER2) verwendet. In der Trastuzumab-For-Gastric-Cancer (ToGA)-Studie wurde bei Patienten mit einem fortgeschrittenen und HER2-positiven Magenkarzinom oder AEG die Standardchemotherapie (5-FU/Capecitabine+Cisplatin) mit der Standardchemotherapie plus Trastuzumab verglichen [30]. Es konnte eine Differenz von median 2,7 Monaten im Gesamtüberleben zu Gunsten der Chemotherapie in Kombination mit Trastuzumab nachgewiesen werden, so dass in fortgeschrittenen Stadien und bei HER2-Überexpression in der klinischen Praxis jetzt zusätzlich zur Chemotherapie Trastuzumab verabreicht wird [41].

### **Biologisch zielgerichtete Therapieoptionen**

In Studien zur Erst- und Zweitlinientherapie werden zur Zeit weitere Medikamente mit verschiedenen molekularen Zielstrukturen (Targets) untersucht. Neben dem etablierten Medikament Trastuzumab (HER2-Inhibition), sind weitere Targets wie EGFR, HER3, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF), Phosphoinositid-3-Kinasen (Pi3K) oder Mammalian-Target-of-Rapamycin (mTOR) und die Hepatozyten-Wachstumsfaktor/Mesenchymal Epithelial Transition (HGF/c-MET)-Achse identifiziert worden. Substanzen gegen diese Targets sind zur Zeit Gegenstand klinischer Forschung.

Der HER2-Inhibitor Trastuzumab ist in der Therapie von fortgeschrittenen bzw. metastasierten Magenkarzinomen integriert und führt zu einer signifikanten Verbesserung des Gesamtüberlebens [30]. Ein weiterer monoklonaler Antikörper dieser Gruppe ist Pertuzumab, der zur Verstärkung der Wirkung einer anti-HER2 Therapie und Verzögerung von Resistenz gegenüber Trastuzumab entwickelt wurde. Auch eine Hemmung der Angiogenese spielt eine wichtige Rolle bei der Behandlung des fortgeschrittenen Magenkarzinoms. Der vaskuläre epitheliale Wachstumsfaktor (VEGF) ist an der Kontrolle von Angiogenese, Tumorstadium und Metastasierung beteiligt. Bevacizumab ist ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF und Ramucirumab ist ein komplett humaner monoklonaler Antikörper gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptor (VEGFR-2) [58]. Der Tyrosinkinase-Rezeptor c-Met mit seinem Liganden HGF können beim Magenkarzinom überexprimiert sein und sind mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet [59]. Hier sind Rilotumumab, der gegen HGF gerichtet ist, und zum anderen Onartuzumab, der direkt am c-Met Rezeptor angreift, zu nennen [60,61]. Des Weiteren kann die Dysregulation in der PI3K/Akt/mTOR-Signalkaskade

in einem Teil der Tumoren identifiziert werden und steht in Verbindung mit schlechterer Prognose und Chemoresistenz [62]. Neuerer Gegenstand der Forschung ist die Immuntherapie von Malignomen. Nivolumab ist ein komplett humaner, monoklonaler Antikörper, der beim metastasierten malignen Melanom und beim metastasierten nicht kleinzelligen Lungenkarzinom eingesetzt wird [63,64]. Er blockiert die Ligandenaktivierung von dem Programmierten Zelltod 1 (PD-1) Rezeptor auf aktivierten T-Lymphozyten, wodurch die Immunantwort des Körpers auf die Tumorzellen erhöht wird und es folglich zu einer Suppression des Tumorwachstums kommt [65]. Ob sich solche Substanzen mit einem immunmodulatorischen Wirkungsmechanismus als wirkungsvoll beim Magenkarzinom erweisen, ist Gegenstand laufender Studien.

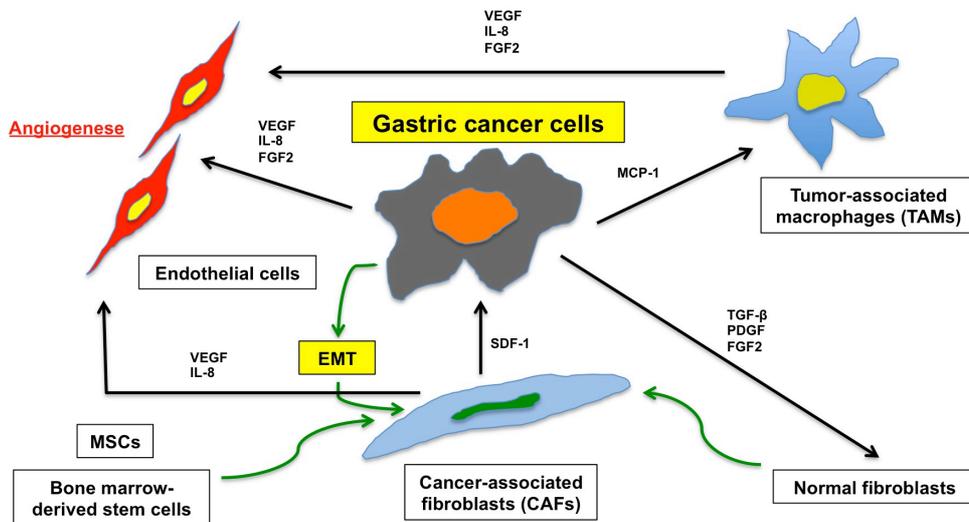
### **1.3 Präklinische Tumormodelle**

Derzeit verwendete präklinische Tumormodelle in der Magenkarzinom-Forschung basieren hauptsächlich auf Zellkulturen und auf Maus-Xenografts. Präklinische Modelle sind essentiell für das Verständnis von Tumorbiologie, Heterogenität und der Entstehung von Therapieresistenz. Das Ansprechen eines Tumors auf die neoadjuvante Chemotherapie kann derzeit allerdings mittels der verfügbaren Modelle noch nicht mit ausreichender Sicherheit vorhergesagt werden. Neue patienten-nähere Modelle könnten interessant für die Entwicklung personalisierter Therapiekonzepte, für die Vorhersage des Ansprechens auf verschiedene Chemotherapeutika sowie für die Untersuchung und Etablierung neuer zielgerichteter Therapien sein. Im Folgenden werden verschiedene präklinische Tumormodelle vorgestellt und verglichen.

### **Tumormikroumgebung**

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Tumore komplexe biologische Systeme sind, die nicht allein aus Krebszellen bestehen. Tumorgewebe besteht daneben auch aus den verschiedenen Zellen des Tumorstromas, die von extrazellulärer Matrix umgeben sind. Die Interaktion zwischen Tumorzellen und Stromazellen ist von entscheidender Bedeutung bei Metastasierung, Invasion und Progression von Tumoren. Das Tumorstroma beinhaltet u.a. folgende Zelltypen: aktivierte Fibroblasten, Endothelzellen und Immunzellen. Tumorzellen sezernieren Wachstumsfaktoren, angiogene Faktoren und Zytokine, die mit den Stromazellen interagieren [66]. Abbildung 4 zeigt schematisch eine Magenkarzinomzelle, die umliegende Mikroumgebung und die Interaktionswege zwischen den verschiedenen Stromazellen [67]. Magenkarzinomzellen produzieren verschiedene angiogene und anderweitig das Stroma modulierende Faktoren wie VEGF, Interleukin (IL)-8 und Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2

(FGF2) [68–70]. Des Weiteren schütten die Tumorzellen Botenstoffe aus, die die Rekrutierung von Makrophagen ins Stromagewebe ermöglichen. Die durch das Monocyte-Chemoattractant-Protein-1 (MCP-1) rekrutierten Tumor-assoziierten-Makrophagen (tumor-associated macrophages, TAMs) weisen ein hohes Potential für angiogene Aktivität auf [71]. Zudem sekretieren Tumorzellen Botenstoffe wie den Transforming-Growth-Factor (TGF)-beta, den Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF) und FGF2, die zu einer Aktivierung von Tumor-assoziierten Fibroblasten (cancer-associated fibroblasts, CAFs) führt. CAFs fördern im Vergleich zu Fibroblasten durch Sekretion von Stromalcell-Derived-Factor 1 (SDF-1) das Tumorwachstum und die Angiogenese [72]. Worthley et al. konnten zeigen, dass mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (MSCs) sich in CAFs differenzieren können [73]. Außerdem haben MSCs die Fähigkeit sich in Stromagewebe von Tumoren zu entwickeln und in verletztes oder entzündetes Gewebe einzuwandern [74]. Ein anderer Ursprung der CAFs ist die Epithelial-zu-Mesenchymale Transition (EMT), die eine Veränderung von epithelialen Zellen zu Fibroblastischen Zellen beschreibt [75]. Hierbei verlieren Krebszellen ihren epithelialen Charakter und formen sich zu einer spindel-förmigen Morphologie mit invasiven und migrierenden Eigenschaften. Die Expression von EMT-assoziierten Genen wie dem E-Cadherin oder dem beta-Catenin wurden beim Magenkarzinom beschrieben [76]. Nicht nur Tumorzellen weisen genetische Alterationen auf, sondern auch Stromazellen wie Fibroblasten oder Endothelzellen zeigen Veränderungen im genetischen Material [77,78]. Schließt man all diese Faktoren ein, lässt sich zusammenfassen, dass die Einbeziehung der Tumormikroumgebung in der Entwicklung neuer Tumomodelle und neuer Targets in der Tumorthherapie von wesentlicher Bedeutung ist. Die Untersuchung der Interaktion zwischen Tumorzellen und Stromazellen ist essentiell für das Verstehen der Tumobiologie (Tumorwachstum, Angiogenese und Invasion).



*Abb. 4: Tumormikroumgebung, modifiziert nach: Cancer-Stromal Cell Interaction and Tumor Angiogenesis in Gastric Cancer, Y. Kitadai, Cancer Microenvironment, 2010 [67]*

## Zellkulturen

Zellkulturen bestehen aus Zellen einer Gewebeart, die außerhalb des Organismus in einem Nährmedium kultiviert werden. Hierfür werden immortalisierte (unbegrenzte Vermehrung der Zellen) humane Zelllinien von Karzinomen verwendet, die meist über Jahre etabliert wurden. Zellkulturen haben den Vorteil, dass sie einfach zu kultivieren sind, schnelles und unbegrenztes Wachstum besitzen und eine homogene Zellpopulation für Experimente und Analysen bieten [79]. All diese Aspekte ermöglichen meist eine gut vergleichbare und reproduzierbare quantitative Auswertung der Ergebnisse, so dass sie ein verlässliches System bieten, in dem Grundlagenforschung sowie Untersuchung zellulärer Mechanismen und Charakteristika sehr gut durchführbar sind [80]. Allerdings haben Zelllinien den Nachteil eines artifiziiellen Phänotyps, da durch jahrelange Kultivierung der Tumorzellen und vielen durchlaufenen Generationen eine evolutionär bedingte Selektion der Zellen resultiert, die sich besser an die Kulturbedingungen angepasst haben. Sich häufiger teilende Tumorzellen werden selektioniert und bleiben prozentual in Folgegenerationen mit einem höheren Anteil erhalten. Daher ist es kritisch zu betrachten, ob Zelllinien überhaupt noch die initial heterogenen Tumorzellverbände widerspiegeln [81]. Außerdem sind Zellkulturen durch homogene isolierte Zellklone charakterisiert, die keine Tumormikroumgebung aufweisen, so dass die architektonische und zelluläre Komplexität eines Tumors nicht repräsentiert werden kann

[82]. Dies ist anders bei einer primären Zellkultur, hierbei werden Tumorzellen aus humanen Karzinomen extrahiert und anschliessend über einen begrenzten Zeitraum kultiviert.

### **Xenograft-Modelle**

Auf Grund der fehlenden Mikroumgebung in Zellkulturen und der daraus resultierenden eingeschränkten Übertragbarkeit auf den humanen Tumor im Patienten wurden Xenograft-Modelle entwickelt. Hierbei werden immundefizienten Mäusen Tumorzellen aus primären Zelllinien oder frisch reseziertes humanes Tumorgewebe injiziert und so eine Tumorneubildung in der Maus initiiert [49,83,84]. In diesem Modell breiten sich die Tumorzellen im murinem Stromagewebe aus und vermehren sich. Die Heterogenität der verschiedenen Zellpopulationen ist gegeben, jedoch besteht hier ein Interspezies-Problem, da das Stromagewebe von der immundefizienten Maus stammt [85]. Trotz der überwiegenden Vorteile dieses Systems sind Xenograft-Modelle vergleichsweise teuer, und sie benötigen im Vergleich zu Zellkulturen mehr Zeit. Zudem stellen mäßige Anwuchsraten von etwa 65 % eine weitere Schwierigkeit in diesem System dar [85]. Die Verwendung von immundefizienten Mäusen ist kritisch zu diskutieren, da neue Therapien, die an Zielen des menschlichen Immunsystems angreifen, unzureichend in Xenograft-Modellen untersucht werden können. Außerdem bietet es kein vollständig humanes System, da die Tumorzellen in murinem Stromagewebe eingebettet sind. Hinzu kommen ethische Kritikpunkte, da mit Tieren experimentiert wird und somit Belastungen für das Versuchstier entstehen [85].

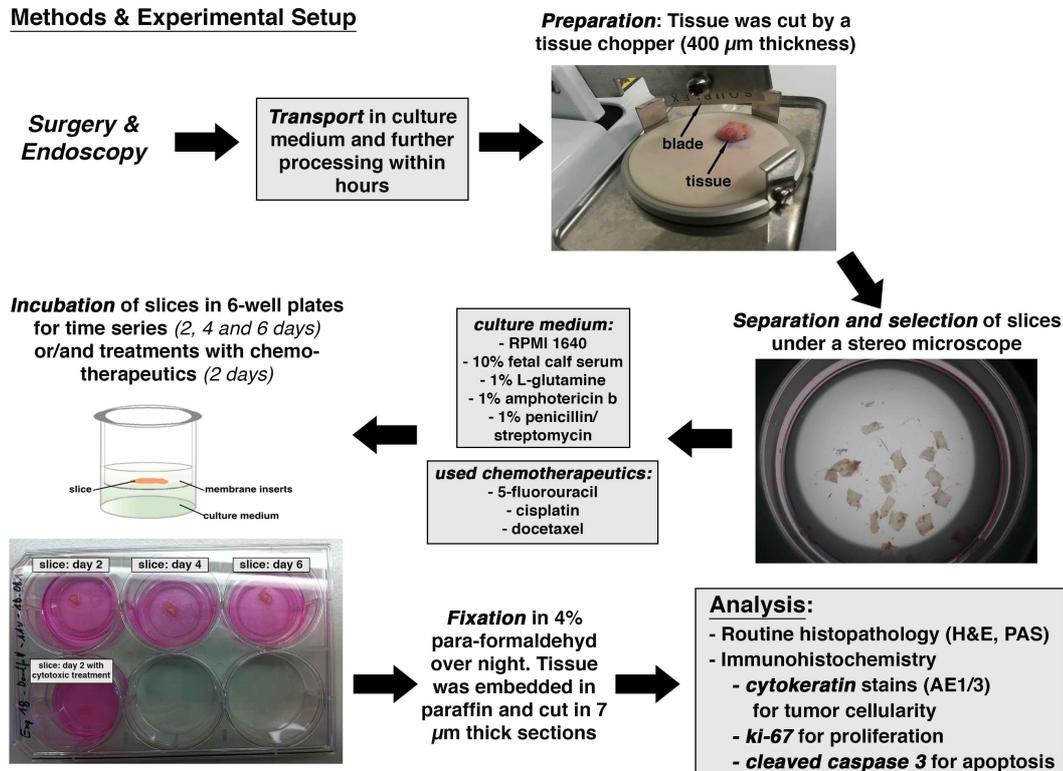
### **Gewebe-Schnittkulturen**

Organotypische Schnittkulturen wurden initial an Hippokampusgewebe etabliert und werden seither für neurobiologische Experimente verwendet [86]. In der Arbeitsgruppe der Anatomie Leipzig wurde diese Methode auf Tumorgewebe übertragen und konnte bei verschiedenen Tumorentitäten (humanen Glioblastomen und Kopf-Hals-Tumoren) erfolgreich etabliert werden [50,51]. Das Fließschema in Abbildung 5 zeigt den Ablauf und Arbeitsschritte zur Erstellung von Schnittkulturen aus humanen Magenkarzinomen und AEG. Die genauen Abläufe werden in der Publikation beschrieben.

Schnittkulturen bieten den Vorteil, dass das Gewebe mit gutem Erhalt der verschiedenen Zellpopulationen und der Zellmatrix ex vivo untersucht werden kann. Somit stellen Schnittkulturen aus Tumorgewebe ein komplett humanes präklinisches Tumormodell dar, in dem die Mikroumgebung und die Heterogenität der Zellen erhalten bleibt. Im Vergleich zu Xenograft-Modellen ist eine rasche Erstellung (wenige Stunden) von Schnittkulturen möglich und es werden keine Versuchstiere benötigt. In diesem System kann das Tumorgewebe mit

zytotoxischen Substanzen oder Röntgenstrahlung *in vitro* behandelt werden, und es lassen sich die daraus resultierende Effekte wie zum Beispiel die Steigerung von apoptotischen Prozessen oder Senkung von Proliferation beobachten. Der Kultivierungszeitraum (bis zu 14 Tagen beim Glioblastom, bis zu 7 Tagen bei Hals/Kopf-Tumoren und bis zu 6 Tage beim Magenkarzinom) bietet ausreichend Zeit, um verschiedene Experimente mit dem Tumorgewebe *in vitro* durchzuführen [50,51].

### Methods & Experimental Setup



**Abb. 5:** Experimenteller Aufbau und Ablauf der Erstellung von Schnittkulturen aus Magenkarzinomen

## **2. Fragestellung**

Magenkarzinome und AEG haben trotz vieler neuer Ansätze und Fortschritte in der Wissenschaft eine schlechte Prognose und eine unbefriedigende Response auf Chemotherapie. Patienten, die nicht oder unzureichend auf eine Chemotherapie ansprechen oder die einen Tumorprogress erleiden, nennt man Non-Responder. Sie stellen die Mehrheit der Patienten (75 %) dar. Diese Patienten werden mit Substanzen therapiert, die nur eine begrenzte oder fehlende antitumorale Wirkung haben; jedoch sind sie den toxischen und unerwünschten Nebenwirkungen der Behandlung ausgesetzt. Die Identifizierung von Non-Respondern wäre für die Therapie des Magenkarzinoms von enormer Relevanz. Neue präklinische Modelle, die eine in vivo Situation widerspiegeln, sind für die Entwicklung von genauen und personalisierten Therapiekonzepten von großer Bedeutung. Daher sollte in dieser Studie untersucht werden,

- (I) ob und wie lange sich Schnitte von Magenkarzinomen und AEG kultivieren lassen,
- (II) wie die optimalen Präparations- und Kulturbedingungen sind,
- (III) ob Magenkarzinome und AEG gleichermaßen erfolgreich etabliert werden können,
- (IV) ob und welche Effekte eine zytotoxische Therapie in vitro mit den gängigen Chemotherapeutika (5-FU und Cisplatin) auf das kultivierte Gewebe hat.

### 3. Literaturverzeichnis der Einleitung

1. Stolte M, editor. Verdauungstrakt und Peritoneum. 3., neubearb. Aufl. Berlin: Springer; 2013.
2. Siewert JR, Stein HJ. Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction. *Br. J. Surg.* 1998;85:1457–9.
3. Moehler M, Al-Batran S-E, Andus T, Anthuber M, Arends J, Arnold D, et al. S3-Leitlinie „Magenkarzinom“ - *Z. Für Gastroenterol.* 2011;49:461–531.
4. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. *Int. Agency Res. Cancer.* 2015. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
5. Bertuccio P, Chatenoud L, Levi F, Praud D, Ferlay J, Negri E, et al. Recent patterns in gastric cancer: a global overview. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer.* 2009;125:666–73.
6. Cook MB, Chow W-H, Devesa SS. Oesophageal cancer incidence in the United States by race, sex, and histologic type, 1977-2005. *Br. J. Cancer.* 2009;101:855–9.
7. Bosetti C, Levi F, Ferlay J, Garavello W, Lucchini F, Bertuccio P, et al. Trends in oesophageal cancer incidence and mortality in Europe. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer.* 2008;122:1118–29.
8. El-Serag HB. Time trends of gastroesophageal reflux disease: a systematic review. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 2007;5:17–26.
9. Guggenheim DE, Shah MA. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J. Surg. Oncol.* 2013;107:230–6.
10. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer.* 2006;118:3030–44.
11. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* 2011;61:69–90.
12. Park YH, Kim N. Review of Atrophic Gastritis and Intestinal Metaplasia as a Premalignant Lesion of Gastric Cancer. *J. Cancer Prev.* 2015;20:25–40.
13. Meining A, Morgner A, Miehlke S, Bayerdörffer E, Stolte M. Atrophy-metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence in the stomach: a reality or merely an hypothesis? *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2001;15:983–98.
14. Nishino Y, Inoue M, Tsuji I, Wakai K, Nagata C, Mizoue T, et al. Tobacco smoking and gastric cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2006;36:800–7.
15. Tsugane S. Salt, salted food intake, and risk of gastric cancer: epidemiologic evidence. *Cancer Sci.* 2005;96:1–6.
16. Duell EJ, Travier N, Lujan-Barroso L, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault M-C, Morois S, et al. Alcohol consumption and gastric cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort. *Am. J. Clin. Nutr.* 2011;94:1266–75.
17. Turati F, Tramacere I, La Vecchia C, Negri E. A meta-analysis of body mass index and esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO.* 2013;24:609–17.
18. Lagergren J, Bergström R, Lindgren A, Nyrén O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med.* 1999;340:825–31.
19. Lassen A, Hallas J, de Muckadell OBS. Esophagitis: incidence and risk of esophageal adenocarcinoma--a population-based cohort study. *Am. J. Gastroenterol.* 2006;101:1193–9.
20. Hvid-Jensen F, Pedersen L, Drewes AM, Sørensen HT, Funch-Jensen P. Incidence of Adenocarcinoma among Patients with Barrett's Esophagus. *N. Engl. J. Med.* 2011;365:1375–83.
21. Kroep S, Lansdorp-Vogelaar I, Rubenstein JH, de Koning HJ, Meester R, Inadomi JM, et al. An Accurate Cancer Incidence in Barrett's Esophagus: A Best Estimate Using Published Data and Modeling. *Gastroenterology.* 2015;149:577–585.e4.
22. Caldas C, Carneiro F, Lynch HT, Yokota J, Wiesner GL, Powell SM, et al. Familial gastric cancer:

- overview and guidelines for management. *J. Med. Genet.* 1999;36:873–80.
23. Worthley DL, Phillips KD, Wayte N, Schrader KA, Healey S, Kaurah P, et al. Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS): a new autosomal dominant syndrome. *Gut.* 2012;61:774–9.
  24. Oliveira C, Pinheiro H, Figueiredo J, Seruca R, Carneiro F. E-cadherin alterations in hereditary disorders with emphasis on hereditary diffuse gastric cancer. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2013;116:337–59.
  25. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature.* 1998;392:402–5.
  26. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science.* 1985;230:1132–9.
  27. Kim MA, Lee HS, Lee HE, Jeon YK, Yang HK, Kim WH. EGFR in gastric carcinomas: prognostic significance of protein overexpression and high gene copy number. *Histopathology.* 2008;52:738–46.
  28. Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2004;59:21–6.
  29. Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Mol. Syst. Biol.* 2005;1:2005.0010.
  30. Bang Y-J, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *The Lancet.* 376:687–97.
  31. Hu B, El Hajj N, Sittler S, Lammert N, Barnes R, Meloni-Ehrig A. Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *J. Gastrointest. Oncol.* 2012;3:251–61.
  32. Lauren P. THE TWO HISTOLOGICAL MAIN TYPES OF GASTRIC CARCINOMA: DIFFUSE AND SO-CALLED INTESTINAL-TYPE CARCINOMA. AN ATTEMPT AT A HISTO-CLINICAL CLASSIFICATION. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1965;64:31–49.
  33. Polkowski W, van Sandick JW, Offerhaus GJ, ten Kate FJ, Mulder J, Obertop H, et al. Prognostic value of Laurén classification and c-erbB-2 oncogene overexpression in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Ann. Surg. Oncol.* 1999;6:290–7.
  34. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. WHO classification of tumours of the digestive system. 4th ed. Bosman FT, editor. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2010.
  35. Hartgrink HH, Jansen EPM, van Grieken NCT, van de Velde CJH. Gastric cancer. *Lancet.* 2009;374:477–90.
  36. Witzig R, Schönberger B, Fink U, Busch R, Gundel H, Sendler A, et al. Delays in diagnosis and therapy of gastric cancer and esophageal adenocarcinoma. *Endoscopy.* 2006;38:1122–6.
  37. Lordick F, Grenacher L, Röcken C, Ebert M, Moehler M, Schumacher G. [Diagnosis and treatment of gastric cancer]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 1946. 2010;135:1671–1682; quiz 1683–1686.
  38. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, International Union against Cancer, editors. TNM classification of malignant tumours. 7th ed. Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2010.
  39. Orbitura M, Galizia G, Sforza V, Gambardella V, Fabozzi A, Laterza MM, et al. Treatment of gastric cancer. *World J. Gastroenterol. WJG.* 2014;20:1635–49.
  40. Peixoto RD, Cheung WY, Lim HJ. Perioperative chemotherapy for gastroesophageal cancer in British Columbia: a multicentre experience. *Curr. Oncol. Tor. Ont.* 2014;21:77–83.
  41. Waddell T, Verheij M, Allum W, Cunningham D, Cervantes A, Arnold D. Gastric cancer: ESMO-ESSO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2013;24:vi57–vi63.

42. Lordick F, Allum W, Carneiro F, Mitry E, Tabernero J, Tan P, et al. Unmet needs and challenges in gastric cancer: The way forward. *Cancer Treat. Rev.* 2014;40:692–700.
43. Sakuramoto S, Sasako M, Yamaguchi T, Kinoshita T, Fujii M, Nashimoto A, et al. Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine. *N. Engl. J. Med.* 2007;357:1810–20.
44. Smalley SR, Benedetti JK, Haller DG, Hundahl SA, Estes NC, Ajani JA, et al. Updated analysis of SWOG-directed intergroup study 0116: a phase III trial of adjuvant radiochemotherapy versus observation after curative gastric cancer resection. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2012;30:2327–33.
45. Jiang L, Yang K, Guan Q, Chen Y, Zhao P, Tian J. Survival benefit of neoadjuvant chemotherapy for resectable cancer of the gastric and gastroesophageal junction: a meta-analysis. *J. Clin. Gastroenterol.* 2015;49:387–94.
46. Lowy AM, Mansfield PF, Leach SD, Pazdur R, Dumas P, Ajani JA. Response to neoadjuvant chemotherapy best predicts survival after curative resection of gastric cancer. *Ann. Surg.* 1999;229:303–8.
47. Tan IB, Ivanova T, Lim KH, Ong CW, Deng N, Lee J, et al. Intrinsic subtypes of gastric cancer, based on gene expression pattern, predict survival and respond differently to chemotherapy. *Gastroenterology.* 2011;141:476–485, 485.e1–11.
48. Zum Büschenfelde CM, Herrmann K, Schuster T, Geinitz H, Langer R, Becker K, et al. (18)F-FDG PET-guided salvage neoadjuvant radiochemotherapy of adenocarcinoma of the esophagogastric junction: the MUNICON II trial. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 2011;52:1189–96.
49. Damhofer H, Ebbing EA, Steins A, Welling L, Tol JA, Krishnadath KK, et al. Establishment of patient-derived xenograft models and cell lines for malignancies of the upper gastrointestinal tract. *J. Transl. Med.* 2015;13:115.
50. Merz F, Gaunitz F, Dehghani F, Renner C, Meixensberger J, Gutenberg A, et al. Organotypic slice cultures of human glioblastoma reveal different susceptibilities to treatments. *Neuro-Oncol.* 2013;15:670–81.
51. Gerlach MM, Merz F, Wichmann G, Kubick C, Wittekind C, Lordick F, et al. Slice cultures from head and neck squamous cell carcinoma: a novel test system for drug susceptibility and mechanisms of resistance. *Br. J. Cancer.* 2013;110:479–88.
52. Wagner AD, Grothe W, Haerting J, Kleber G, Grothey A, Fleig WE. Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on aggregate data. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2006;24:2903–9.
53. Cervantes A, Roda D, Tarazona N, Roselló S, Pérez-Fidalgo JA. Current questions for the treatment of advanced gastric cancer. *Cancer Treat. Rev.* 2013;39:60–7.
54. Wagner AD, Unverzagt S, Grothe W, Kleber G, Grothey A, Haerting J, et al. Chemotherapy for advanced gastric cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2010;CD004064.
55. Okines AFC, Norman AR, McCloud P, Kang Y-K, Cunningham D. Meta-analysis of the REAL-2 and ML17032 trials: evaluating capecitabine-based combination chemotherapy and infused 5-fluorouracil-based combination chemotherapy for the treatment of advanced oesophago-gastric cancer. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO.* 2009;20:1529–34.
56. Van Cutsem E, Moiseyenko VM, Tjulandin S, Majlis A, Constenla M, Boni C, et al. Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2006;24:4991–7.
57. Dank M, Zaluski J, Barone C, Valvere V, Yalcin S, Peschel C, et al. Randomized phase III study comparing irinotecan combined with 5-fluorouracil and folinic acid to cisplatin combined with 5-fluorouracil in chemotherapy naive patients with advanced adenocarcinoma of the stomach or esophagogastric junction. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO.* 2008;19:1450–7.
58. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 2003;9:653–60.
59. Nakajima M, Sawada H, Yamada Y, Watanabe A, Tatsumi M, Yamashita J, et al. The prognostic

significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. *Cancer*. 1999;85:1894–902.

60. Iveson T, Donehower RC, Davidenko I, Tjulandin S, Deptala A, Harrison M, et al. Rilotumumab in combination with epirubicin, cisplatin, and capecitabine as first-line treatment for gastric or oesophagogastric junction adenocarcinoma: an open-label, dose de-escalation phase 1b study and a double-blind, randomised phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2014;15:1007–18.

61. Salgia R, Patel P, Bothos J, Yu W, Eppler S, Hegde P, et al. Phase I dose-escalation study of onartuzumab as a single agent and in combination with bevacizumab in patients with advanced solid malignancies. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res*. 2014;20:1666–75.

62. Yu H-G, Ai Y-W, Yu L-L, Zhou X-D, Liu J, Li J-H, et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway plays an important role in chemoresistance of gastric cancer cells against etoposide and doxorubicin induced cell death. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer*. 2008;122:433–43.

63. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WEE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med*. 2015;

64. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N. Engl. J. Med*. 2015;

65. Romano E, Romero P. The therapeutic promise of disrupting the PD-1/PD-L1 immune checkpoint in cancer: unleashing the CD8 T cell mediated anti-tumor activity results in significant, unprecedented clinical efficacy in various solid tumors. *J. Immunother. Cancer*. 2015;3:15.

66. Smith M-G, Hold G-L, Tahara E, El-Omar E-M. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. *World J. Gastroenterol. WJG*. 2006;12:2979–90.

67. Kitadai Y. Cancer-Stromal Cell Interaction and Tumor Angiogenesis in Gastric Cancer. *Cancer Microenviron*. 2010;3:109–16.

68. Takahashi Y, Cleary KR, Mai M, Kitadai Y, Bucana CD, Ellis LM. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR) in intestinal-type gastric cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res*. 1996;2:1679–84.

69. Tanimoto H, Yoshida K, Yokozaki H, Yasui W, Nakayama H, Ito H, et al. Expression of basic fibroblast growth factor in human gastric carcinomas. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol*. 1991;61:263–7.

70. Kitadai Y, Haruma K, Sumii K, Yamamoto S, Ue T, Yokozaki H, et al. Expression of interleukin-8 correlates with vascularity in human gastric carcinomas. *Am. J. Pathol*. 1998;152:93–100.

71. Leibovich SJ, Wiseman DM. Macrophages, wound repair and angiogenesis. *Prog. Clin. Biol. Res*. 1988;266:131–45.

72. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005;121:335–48.

73. Worthley DL, Ruzskiewicz A, Davies R, Moore S, Nivison-Smith I, Bik To L, et al. Human gastrointestinal neoplasia-associated myofibroblasts can develop from bone marrow-derived cells following allogeneic stem cell transplantation. *Stem Cells Dayt. Ohio*. 2009;27:1463–8.

74. Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN, et al. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J. Natl. Cancer Inst*. 2004;96:1593–603.

75. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat. (Basel)*. 1995;154:8–20.

76. Yonemura Y, Endou Y, Kimura K, Fushida S, Bandou E, Taniguchi K, et al. Inverse expression of S100A4 and E-cadherin is associated with metastatic potential in gastric cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res*. 2000;6:4234–42.

77. Fukino K, Shen L, Matsumoto S, Morrison CD, Mutter GL, Eng C. Combined total genome loss of heterozygosity scan of breast cancer stroma and epithelium reveals multiplicity of stromal targets. *Cancer Res*. 2004;64:7231–6.

78. Streubel B, Chott A, Huber D, Exner M, Jäger U, Wagner O, et al. Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 2004;351:250–9.
79. Masters JR. Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000;1:233–6.
80. Van Staveren WCG, Solís DYW, Hébrant A, Detours V, Dumont JE, Maenhaut C. Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer.* 2009;1795:92–103.
81. Hughes P, Marshall D, Reid Y, Parkes H, Gelber C. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *BioTechniques.* 2007;43:575, 577–578, 581–582 passim.
82. Kamb A. What’s wrong with our cancer models? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005;4:161–5.
83. Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, Jimeno A, Leong S, Pitts TM, et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2012;9:338–50.
84. Zhu Y, Tian T, Li Z, Tang Z, Wang L, Wu J, et al. Establishment and characterization of patient-derived tumor xenograft using gastroscopic biopsies in gastric cancer. *Sci. Rep.* 2015;5:8542.
85. Kopetz S, Lemos R, Powis G. The promise of patient-derived xenografts: the best laid plans of mice and men. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2012;18:5160–2.
86. Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods.* 1991;37:173–82.

#### **4. Publikation**

Organotypic slice cultures of human gastric and esophagogastric junction cancer.

Koerfer J, Kallendrusch S, Merz F, Wittekind C, Kubick C, Kassahun WT, Schumacher G, Moebius C, Gaßler N, Schopow N, Geister D, Wiechmann V, Weimann A, Eckmann C, Aigner A, Bechmann I, Lordick F.

Cancer Med. 2016 Apr 12. doi: 10.1002/cam4.720. [Epub ahead of print]

## ORIGINAL RESEARCH

## Organotypic slice cultures of human gastric and esophagogastric junction cancer

Justus Koerfer<sup>1,2</sup>, Sonja Kallendrusch<sup>1</sup>, Felicitas Merz<sup>1</sup>, Christian Wittekind<sup>3</sup>, Christoph Kubick<sup>3</sup>, Woubet T. Kassahun<sup>4</sup>, Guido Schumacher<sup>5</sup>, Christian Moebius<sup>5</sup>, Nikolaus Gaßler<sup>6</sup>, Nikolas Schopow<sup>1</sup>, Daniela Geister<sup>7</sup>, Volker Wiechmann<sup>7</sup>, Arved Weimann<sup>8</sup>, Christian Eckmann<sup>9</sup>, Achim Aigner<sup>10</sup>, Ingo Bechmann<sup>1,a</sup> & Florian Lordick<sup>2,a</sup>

<sup>1</sup>Institute for Anatomy, University Medicine Leipzig, Liebigstraße 13, 04103 Leipzig, Germany

<sup>2</sup>University Cancer Center Leipzig (UCCL), University Medicine Leipzig, Liebigstraße 20, 04103 Leipzig, Germany

<sup>3</sup>Institute of Pathology, University Medicine Leipzig, Liebigstraße 24, 04103 Leipzig, Germany

<sup>4</sup>Department for Visceral, Transplantation Thoracic and Vascular Surgery, University Medicine Leipzig, Liebigstraße 20, 04103 Leipzig, Germany

<sup>5</sup>Department for General and Visceral Surgery, Klinikum Braunschweig, Salzdahlumer Straße 90, 38126 Braunschweig, Germany

<sup>6</sup>Institute of Pathology, Klinikum Braunschweig, Celler Straße 38, 38114 Braunschweig, Germany

<sup>7</sup>Institute of Pathology, Klinikum St. Georg, Delitzscher Str. 141, 04129 Leipzig, Germany

<sup>8</sup>Department for General and Visceral Surgery, Klinikum St. Georg, Delitzscher Str. 141, 04129 Leipzig, Germany

<sup>9</sup>Department for General, Visceral and Thoracic Surgery, Klinikum Peine, Virchowstraße 8, 31226 Peine, Germany

<sup>10</sup>Rudolf-Boehm-Institute for Pharmacology and Toxicology, Clinical Pharmacology, University Medicine Leipzig, Härtelstraße 16-18, 04107 Leipzig, Germany

### Keywords

Chemosensitivity, esophagogastric junction cancer, gastric cancer, organotypic slice cultures, personalized treatment

### Correspondence

Justus Koerfer, University Cancer Center Leipzig (UCCL), University Medicine Leipzig, Liebigstraße 20, 04103 Leipzig, Germany. Tel: +493419712560; Fax: +493419712569; E-mail: justus.koerfer@medizin.uni-leipzig.de

### Funding Information

This study has been supported in part by a grant from the German Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF).

Received: 4 December 2015; Revised: 21 February 2016; Accepted: 8 March 2016

doi: 10.1002/cam4.720

<sup>a</sup>Equal contribution.

Preliminary results were presented as a poster at the ASCO 2015 Gastrointestinal Cancers Symposium.

### Abstract

Gastric and esophagogastric junction cancers are heterogeneous and aggressive tumors with an unpredictable response to cytotoxic treatment. New methods allowing for the analysis of drug resistance are needed. Here, we describe a novel technique by which human tumor specimens can be cultured *ex vivo*, preserving parts of the natural cancer microenvironment. Using a tissue chopper, fresh surgical tissue samples were cut in 400  $\mu\text{m}$  slices and cultivated in 6-well plates for up to 6 days. The slices were processed for routine histopathology and immunohistochemistry. Cytokeratin stains (CK8, AE1/3) were applied for determining tumor cellularity, Ki-67 for proliferation, and cleaved caspase-3 staining for apoptosis. The slices were analyzed under naive conditions and following 2–4 days *in vitro* exposure to 5-FU and cisplatin. The slice culture technology allowed for a good preservation of tissue morphology and tumor cell integrity during the culture period. After chemotherapy exposure, a loss of tumor cellularity and an increase in apoptosis were observed. Drug sensitivity of the tumors could be assessed. Organotypic slice cultures of gastric and esophagogastric junction cancers were successfully established. Cytotoxic drug effects could be monitored. They may be used to examine mechanisms of drug resistance in human tissue and may provide a unique and powerful *ex vivo* platform for the prediction of treatment response.

### Introduction

Gastric cancer (GC) and adenocarcinomas of the esophagogastric junction (AEG) are aggressive and highly

heterogeneous tumors [1]. Due to their critical prognosis following curative resection (R0), adjuvant treatment is the standard of care in most parts of the world. Western world studies advise perioperative chemotherapy or

chemoradiation [2–5], whereas postoperative chemotherapy is the standard of care in East Asia [6–8]. The preferred chemotherapy regimens are based on fluoropyrimidines and platinum compounds which may be combined with epirubicin or docetaxel [1, 8].

GC and AEG have unpredictable responses to cytotoxic treatment and the majority of patients are nonresponders [9, 10]. Nonresponding patients receive toxic treatment with no benefit or even detrimental effects on outcomes [11–14]. The identification of nonresponders before starting perioperative therapy would be of utmost importance. New methods are needed to overcome the limitations of established models in predicting treatment response [15].

Recent studies from our laboratory demonstrated that human cancers can be brought into organotypic slice cultures [16, 17]. This novel method enables to study cytotoxic drug and ionizing radiation effects on individual human cancer probes. A major advantage of this model in contrast to cell culture and cell culture-derived xenograft experiments is the partial preservation of the human tumor microenvironment [16–19]. However, different tumor entities need to be established on its own, as they display distinct growth and culture characteristics, and the complexity of tumor tissue requires careful investigation. For the first time, we could culture tissue slices derived from human GC and AEG and demonstrate their potential for assessment of cytotoxic drug efficacy.

## Material and Methods

### Preparation and experimental set-up

Fresh surgically sampled human tissue of GC and AEG were obtained after pathological routine diagnostics. Patients were chemo-naïve or had undergone neoadjuvant chemotherapy. Tumor samples were transported in culture media and were further processed within 4 to 24 h postextraction. Under sterile conditions, surgical tumor specimens were dissected with an autoclaved razor blade in pieces of a height of 0.5 cm for further preparation. These pieces were cut in 400  $\mu\text{m}$  thick slices using a tissue chopper (McIlwain TC 752; Campden Instruments, Lafayette, IL) and were carefully separated under a stereo microscope with forceps and a scalpel. Then, tissue slices were placed on membrane inserts (Millipore Corporation, Billerica, MA) and were cultured in 6-well plates. Each well contained 1 ml culture medium under the membrane inserts supplying the tissue via diffusion. RPMI-1640 (Gibco, Life technologies, Paisly, UK) culture medium was supplemented with 10% fetal calf serum (Fetal Calf Serum [FCS]; Invitrogen, Darmstadt, Germany), 1%

L-glutamine (Gibco), 1% amphotericin B (Carl Roth, Karlsruhe, Germany), and 1% penicillin/streptomycin (Gibco). Slices were incubated in a humidified incubator at 37°C and 5%  $\text{CO}_2$  for 2, 4, and 6 days. The culture medium was changed every second day. Slices, which were fixed at the preparation day, were labeled as day 0. Each culture time point was compared with day 0 and is represented by an individual slice.

The study was approved by the ethics committee of the University of Leipzig Medical Faculty. All patients who donated tissue declared their informed consent in written form.

### Chemotherapy exposure

Slices were incubated with 5-FU (Medac, Wedel, Germany) and cisplatin (Neocorp, Weilheim, Germany) at different concentrations immediately after cultivation. Drugs were dissolved in 0.9% NaCl and diluted in the culture medium to final concentrations of 3, 10, and 100  $\mu\text{mol/L}$  for 5-FU and 3, 10, and 30  $\mu\text{mol/L}$  for cisplatin. Slices were exposed to cytotoxic treatment over 2–4 days. Drug containing culture medium was freshly prepared before application and changed every other day. Slices of the same tumor that were not exposed to cytotoxic drugs but cultured and fixed simultaneously served as controls.

### Staining

Tissue slices were fixed in 4% paraformaldehyde overnight, embedded in paraffin for standard histomorphology using hematoxylin–eosin (H&E) and periodic acid–Schiff (PAS). Cytokeratin stains (CK8 antibody; BioGenex, Fremont, CA: mouse, 1:100 and AE1/3 antibody (CK1-8, 10, 14-16, and 19) are labeled as CK in figures; BioGenex, mouse, 1:50) were used for determining tumor cellularity, Ki-67 (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg, Germany: rabbit, 1:400) for proliferation, and cleaved caspase-3 staining (Cell Signaling Technology, Danvers, MA: rabbit, 1:400) for apoptosis. CK-positive cells were defined as tumor cells if normal gastric mucosa could not be detected in the H&E stain. A double staining of CK/Ki-67 and CK/cleaved caspase-3 was performed to define the tumor cell viability. After citrate buffer treatment at 95°C for 10 min, sections were washed in 1.5% Triton/PBS, blocked with 5% normal goat serum for 30 min, and incubated overnight at 4°C with primary antibodies. After rinsing sections repeatedly with 1.5% Triton/PBS, primary antibodies were coupled with fluorescent-labeled secondary antibodies (goat-anti-mouse 568, goat-anti-rabbit 488, Alexa Fluor, Invitrogen, Eugene, OR) and nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (Sigma, St. Louis, MO).

## Analysis of slices

To determine the viability of tissue slices, stained slides were examined under an Olympus BX51 fluorescent microscope (Olympus Deutschland, Hamburg, Germany). Total cell number (Hoechst-positive nuclei) was counted by the ImageJ cell counter plugin (NIH, Bethesda, MD). CK, cleaved caspase-3, and Ki-67-positive cells were counted manually. These three parameters were put in relation to the total cell number and defined as the tumor cell fraction, the apoptosis, and proliferation indices. For determining total cell number and tumor cellularity, six pictures ( $n = 6$ ) in a  $200\times$  magnification per group were taken and counted. Three pictures ( $n = 3$ ) in a  $400\times$  magnification per group were counted for determining apoptosis and proliferation indices. Statistics were accomplished using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). One-way analysis of variance (ANOVA) was used and  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## Results

### Manufacturing and analysis of slice cultures

Tissue was obtained from 13 patients after resection (nine GCs and four AEGs). Eight cases were used for qualitative and quantitative analysis (see Table S1). In five samples, analysis of slice cultures was not possible due to sparse tumor in the tissue sample (two cases), insufficient interslice comparability (two cases), or fungal

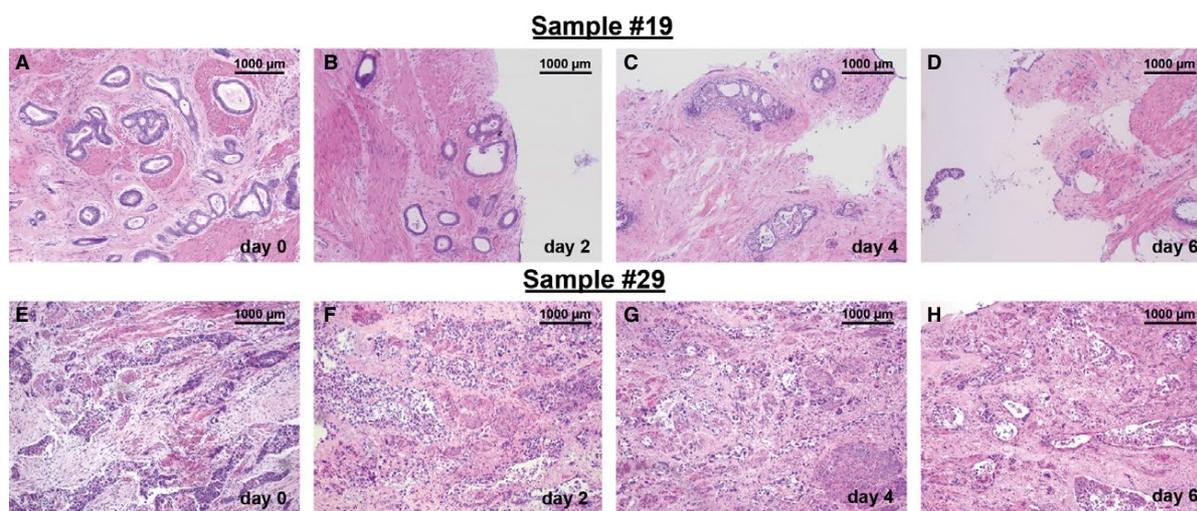
infection (one case). A topographical orientation of the surgical tissue sample was needed to trim the samples accurately before slicing. Furthermore, the precise collection of consecutive slices was important to allow for a good interslice comparison within consecutive series. Taking this into account, slice cultures revealed a good preservation of tissue morphology and cellular integrity up to 6 days. GCs of the intestinal and diffuse subtype generally maintained a stable tumor cellularity and stroma preservation (Figs. 1 and 2).

No major difference in cellularity between upper and lower layers could be distinguished in vertical H&E-stained sections (Fig. S1A, B), ruling out a vertical viability gradient caused by diffusion of nutrients from the bottom of the cultures. In line with this observation, induction of apoptosis by 5-FU treatment was also observed along the entire vertical diameter, proving the equal accessibility of cells within the slice for medium components as well as cytotoxic drugs (Fig. S1C and D).

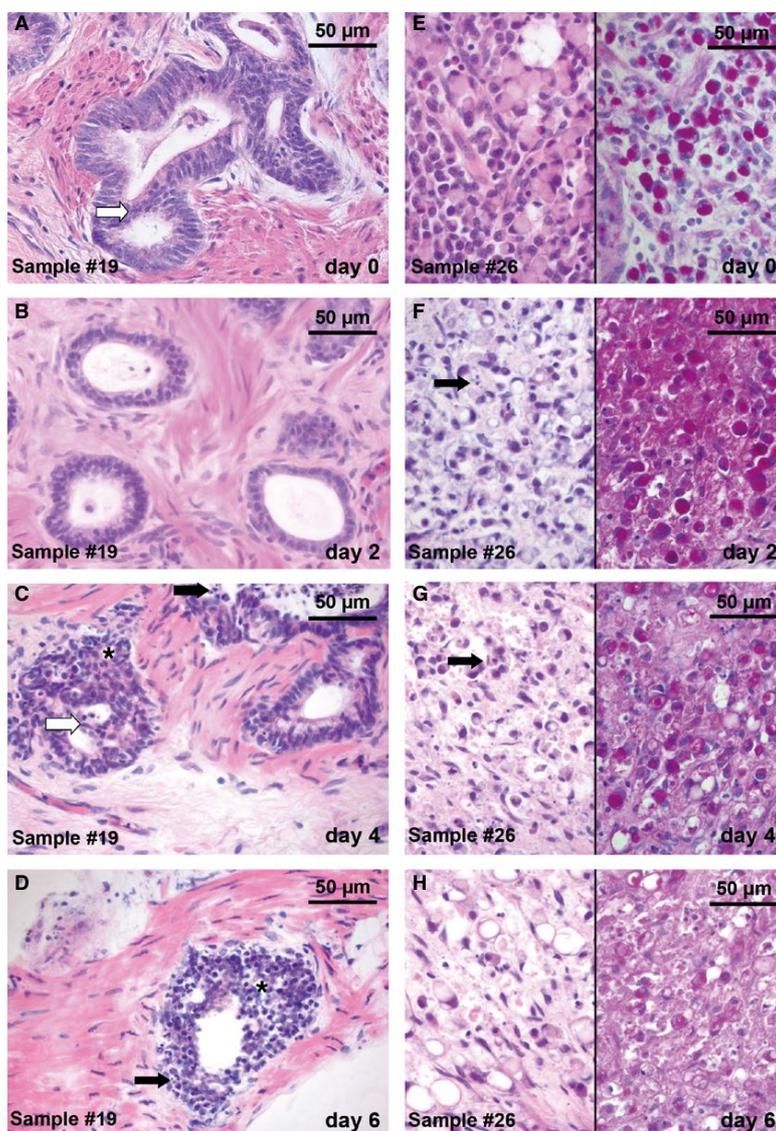
### Quantification of stability of slice cultures

Four patients had received neoadjuvant chemotherapy (Fig. 3A) and four patients were chemo-naïve at the time point of tissue sampling (Fig. 3B). A stable tumor cell fraction until day 6 was observed in five cases. Three cases revealed a distinct decrease in tumor cells between day 2 and day 4 (Fig. 3A and B).

Regarding the total cell count at each culture time point, the majority of cases remained stable until day 6 (data not shown). Neither neoadjuvant chemotherapy nor the



**Figure 1.** Overview of histopathology of cultured tissue slices derived from GC and AEG surgical specimen. Tissue slices derived from GC (A–D) and AEG (E–H) surgical specimens were cut in  $400\ \mu\text{m}$  thick slices and kept ex vivo over 2, 4, and 6 days. Slices were processed to paraffin sections ( $7\ \mu\text{m}$ ) and stained with H&E. Low magnification pictures show an overview of cultured tissue. Initial gland structures and tissue morphology can be observed also at day 2, 4, and 6 in vitro (A–D). Density of glands is reduced at day 6 (D). Original magnification:  $100\times$  in (A–H).



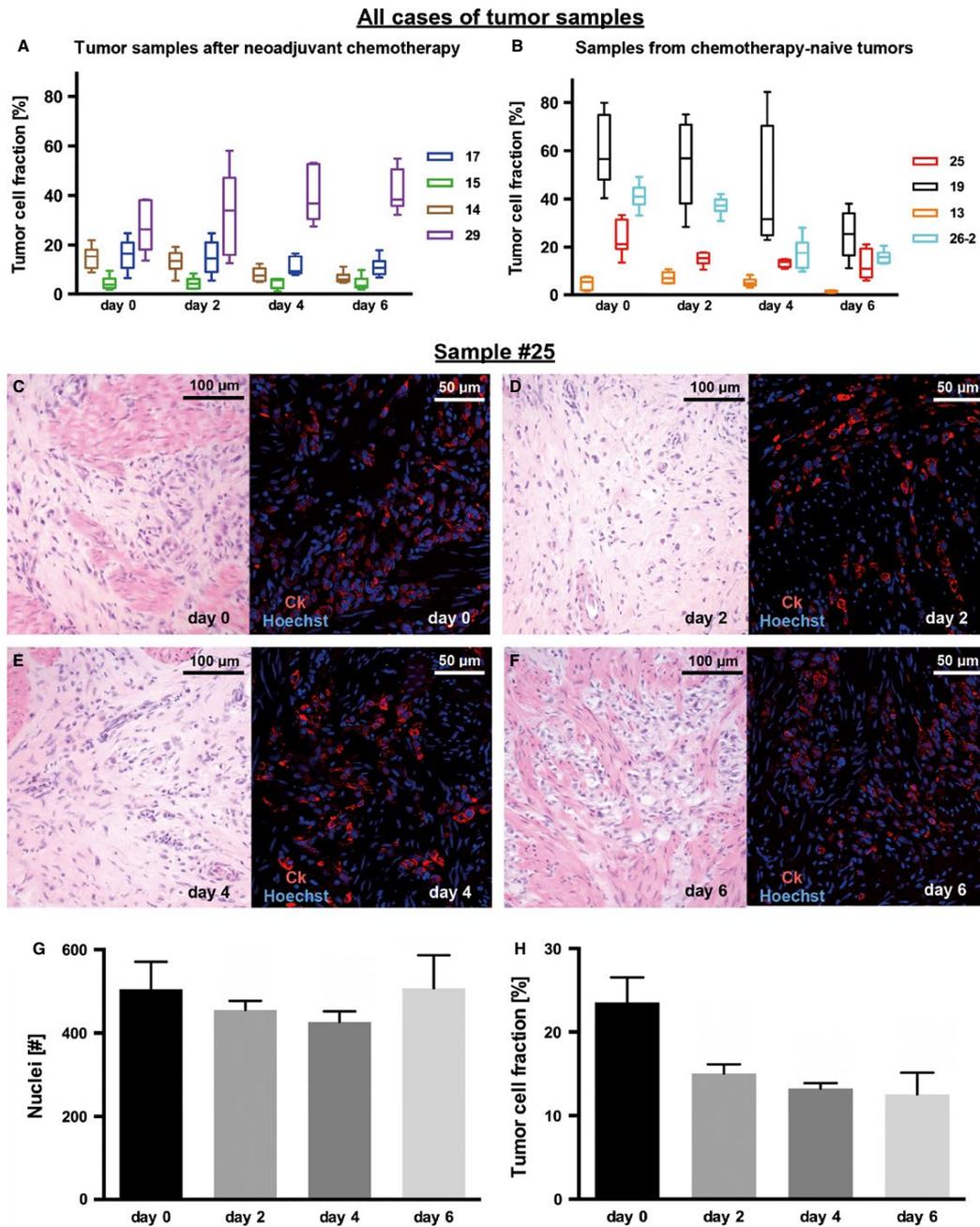
**Figure 2.** Histopathology of cultured tissue slices derived from GC surgical specimen. Tissue was cut in 400  $\mu\text{m}$  thick slices and kept ex vivo over 2, 4, and 6 days. Slices were processed to paraffin sections (7  $\mu\text{m}$ ) and stained with H&E (A–D and E–H, left column) and PAS (E–H, right column). Two different tumor samples derived from surgical specimens are shown: intestinal subtype (A–D) and diffuse subtype (E–H). Slice cultures revealed a good preservation of tissue morphology and tumor cell integrity compared with day 0. (A) Gland-forming structures, pleomorphic nuclei, and a shifted nuclear/cytoplasmic ratio characterize the intestinal subtype. (B–D) These features persisted during the culture period up to day 4 in vitro. Intraluminal bridges (A; white arrow) and a change of gland formation structures (C, D; \*) were observed. Apoptotic bodies (C, D, F, G; black arrow) were detectable during cultivation. (E–H) Mucin-containing signet-ring cells (pink stain in PAS) signify the diffuse subtype. Morphology of signet ring cells remained stable (G) until day 4 in vitro. Original magnification: 400 $\times$  in (A–H).

tumor cell fraction measured at day 0 had a major impact on the stability of the tissue slices during cultivation (Fig. 3A and B). Figure 3G–H illustrates tumor cell quantification in one sample (#25).

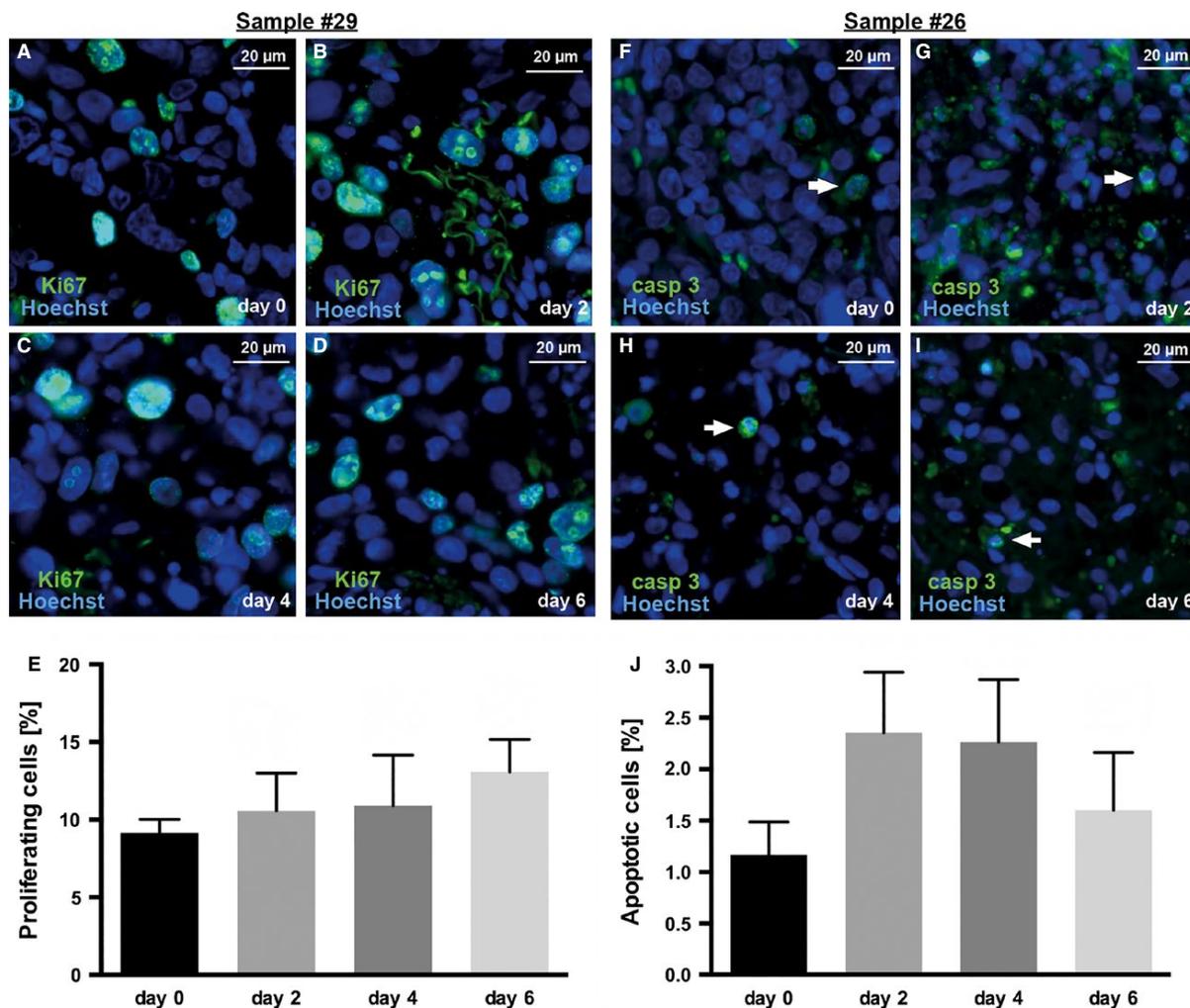
Figure 4 shows proliferation and apoptosis indices of two different tumor samples using anti-Ki-67 and anti-cleaved caspase-3 immunohistochemistry.

### Cytotoxic treatment in vitro

After cytotoxic treatment, H&E-stained sections displayed a higher number of fragmented nuclei compared with untreated controls (not shown). Figure 5 illustrates the cytotoxic drug effects in one particular case. A decrease in tumor cellularity (Fig. 5A and B) and an increase in



**Figure 3.** Quantification of total cell number and tumor cellularity. Panels (A–B) show tumor cellularity of all analyzed cases, while panels (C–H) display observations in one selected case (sample #25). (A) Four patients had received neoadjuvant chemotherapy prior to the sampling of tumor for slice cultivation and (B) four patients had not received any neoadjuvant treatment. In five cases (13, 15, 17, 25, 29), a stable tumor cell fraction until day 6 was observed. Three cases (14, 19, 26) revealed a distinct decrease in tumor cellularity between day 2 and day 4. (C–F) Slice cultures of sample #25 revealed a good preservation of tissue morphology and tumor cell integrity over 2, 4, and 6 days compared with day 0. Stromal cells were dominant in this tumor and the diffuse tumor pattern was difficult to distinguish in H&E stains. Quantification was therefore carried out on the basis of immunohistochemistry (right side). Tumor cells were detected with cytokeratin (CK) antibodies (red) which was combined with nuclear counterstaining (Hoechst 33342, blue). (G) Total cell number remained stable at all culture time points compared with day 0. (H) The tumor cell fraction decreased significantly in this particular case within the first 2 days of cultivation, but remained stable for the further culture period. Fluorescent microscopy, original magnification: 200 $\times$  in C–F.  $\pm$ SEM,  $n = 6$ .



**Figure 4.** Proliferation (A–E) and apoptosis (F–J) indices in slice cultures of one human AEG (A–E) and one GC (F–J) specimen over a 6-day culture period without cytotoxic drug exposure. (A–D) Proliferating cells were visualized using Ki-67 staining (green) and were combined with nuclear counterstaining (Hoechst 33342; blue). (E) The proliferation indices did not show a decrease during the culture period proving a stable cell viability of cultured slices. (F–I) Basal apoptosis (white arrows) was observed at day 0 and every culture time point. (J) No significant increase in apoptotic cells was detected during the culture period. Fluorescent microscopy, original magnification: 400 $\times$  in A–I,  $\pm$ SEM,  $n = 3$ .

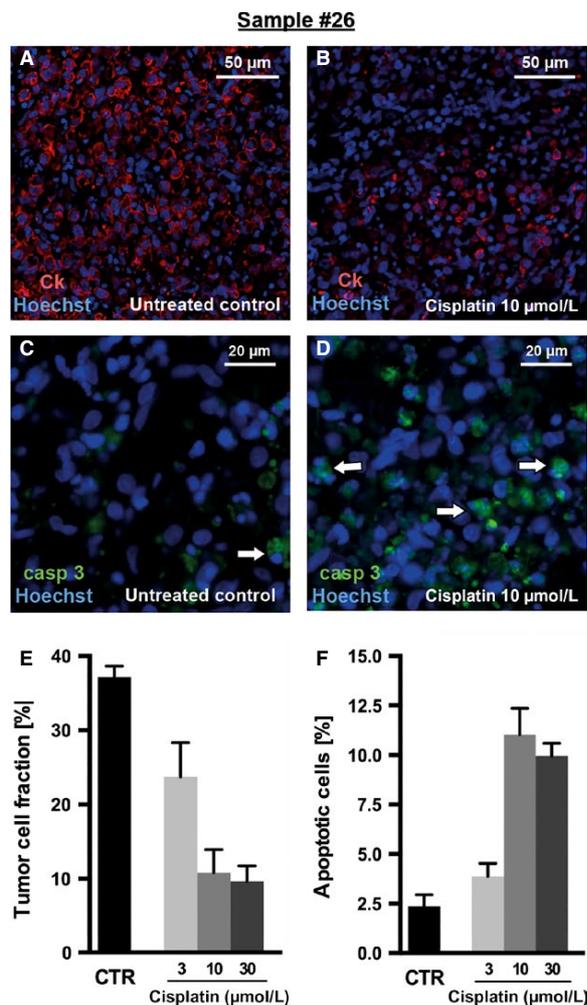
apoptotic processes (Fig. 5C and D) were observed upon treatment with cisplatin. This effect could be quantified (Fig. 5E and F). However, rather inhomogeneous results of apoptosis indices and higher standard errors were observed in some other cases. Therefore, we decided to use cytokeratin staining reflecting tumor cellularity for further analysis because the results obtained for this parameter were most consistent.

Figure 6 shows one case with a tumor cell fraction above 10% at day 0. The untreated control revealed a dense and compact tumor cellularity. This remained unchanged upon treatment with cisplatin 10  $\mu$ mol/L, while

treatment with 5-FU 10  $\mu$ mol/L led to a massive decrease in tumor cellularity (Fig. 6A and C).

Three patient samples revealed a low tumor cellularity (4–8% of total cells) at day 0 (stroma predominant tumors). For these cases, we observed that the analysis of chemotherapy effects in vitro is more difficult and leads to greater standard errors (data not shown).

Regarding the other five patient samples (with an initial tumor cellularity above 10%), more reliable values on the >50% reduction in tumor cellularity after cisplatin or 5-FU exposure were observed. Notably, dose-dependent decreases of cellularities were measured, indicating the



**Figure 5.** Effects of cytotoxic drug exposure in GC slice cultures. Slices from sample #26 were incubated with cisplatin and 5-FU over 2 days and were then fixed and processed to paraffin sections (7 μm). (A–B) Tumor cells were visualized using cytokeratin (CK) staining (red); (C–D) apoptotic cells were visualized using caspase-3 staining (green). Both were combined with nuclear counterstaining (Hoechst 33342; blue) for quantitative analysis. (A) Untreated controls showed a dense and compact tumor cellularity, whereas (B) treated slices revealed a massive loss of tumor cells. (C) Compared to a minimal number of apoptotic cells (white arrows) in the untreated control, (D) treatment led to increased apoptosis. The loss of tumor cells after chemotherapy and the increase in apoptotic cells are illustrated in the bar graphs (E, F). Fluorescent microscopy, original magnification: 200× in A–B and 400× in C–D, ±SEM, n = 6 (CK), n = 3 (caspase-3).

potential of this system for the assessment of individual drug sensitivities (Fig. S2).

Four samples were exposed to chemotherapy over 4 days to assess if a prolonged exposure to cytotoxic drugs leads to more loss of tumor cellularity or increased apoptosis. But systematic differences between both incubation periods

were not observed (data not shown) indicating that the shorter incubation time is sufficient for assessing chemosensitivity.

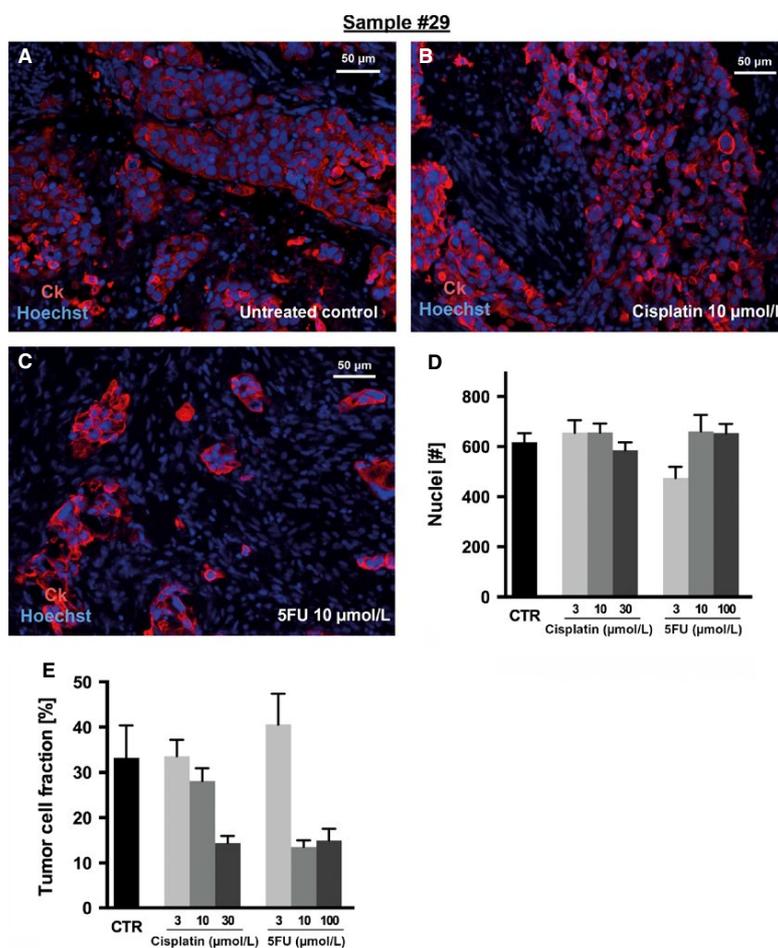
## Discussion

To the best of our knowledge, this is the first description of the successful establishment of ex vivo organotypic slice cultures of human gastric and esophagogastric junction cancers. Importantly, we can also show that cytotoxic drug effects like changes in tumor cellularity, proliferation, and apoptosis can be assessed in this model making this new technique an interesting platform for the assessment of individual drug response.

Inter- and intra-tumoral heterogeneity which are hallmarks of GC and AEG underscore the need for the development of more precise and personalized treatment [20]. The moderate response rates to standard chemotherapy and the critical prognosis even after curative resection demonstrate the need for more efficacious treatment strategies. This could be reinforced by new translational research models which provide better treatment responses prediction for perioperative treatment [21]. As a prerequisite, new laboratory-based ex vivo cancer models should accurately reflect the molecular composition and heterogeneity of the tumor, including the stroma, being essential for the evolution of treatment resistance. In addition, the system should allow for the rapid assessment of cytotoxic drug effects in order to be ready for use in clinical practice.

Current ex vivo cancer models mainly rely on human primary cell lines, cell line-derived or patient-derived tumor xenografts. In contrast to our slice culture model, primary cell lines are artificial due to the selection of fast-growing tumor cells during cultivation and the absence of any stroma. As a consequence, tumor–stroma interactions as well as heterogeneity are underrepresented [22, 23]. In tumor xenograft models, a tumor microenvironment develops, but within murine stroma and in immunocompromised animals. This complicates the translation of findings to the situation in vivo. In addition, establishment of patient-derived xenografts is time consuming and expensive and may thus not be an ideal tool for use in routine clinical practice. As previously shown in our laboratory, slice cultures of human glioblastoma and epithelial head and neck cancers could be successfully established. We experienced that each tumor entity needs careful and distinct investigation regarding the preparation process and culture conditions [16–18].

In our study, we found that slices of GC and AEG specimens can be cultured ex vivo over 6 days. We observed drug-induced tissue alterations and reduction in tumor cellularity after exposure to varying doses of cisplatin or



**Figure 6.** Tumor cellularity after cytotoxic drug exposure of AEG slice cultures. Slices from sample #29 were incubated with cisplatin and 5-FU over 2 days and were then fixed and processed to paraffin sections (7 μm). (A–C) Tumor cells were visualized using cytokeratin (CK) staining (red) and were combined with nuclear counterstaining (Hoechst 33,342; blue) for quantitative analysis. (A) Untreated controls revealed a dense and compact tumor cellularity which was not altered by exposure to (B) cisplatin 10 μmol/L, whereas (C) 5-FU 10 μmol/L led to a massive loss of tumor cells. (D) The total number of nuclei was not reduced, neither by cisplatin nor by 5-FU. (E) Tumor cellularity decreased upon treatment with higher concentrations of cisplatin (30 μmol/L), while 3 or 10 μmol/L cisplatin showed no effect on tumor cellularity. (E) A reduction in tumor cellularity after 5-FU treatment was observed at a concentration of 10 μmol/L or higher but not at the lower concentration. Fluorescent microscopy, original magnification: 200× in A–C, ±SEM, *n* = 6.

5-FU. Relevant cellular processes, that is, tumor and stromal proliferation as well as apoptosis, were observed. In our view, the advantage of this new system is the preservation of the natural epithelial–stromal architecture and the original tumor tissue morphology. The cultivation period provides sufficient time for investigating response to cytotoxic treatment.

A future challenge will be the establishment of slices derived from endoscopic biopsies which are needed to provide a platform for testing drug response prior to treating a patient in the neoadjuvant setting. Moreover, correlation of *ex vivo* findings with clinical response and outcome must be examined. Besides, specific molecular

characteristics for response or resistance to chemotherapy should be unraveled in the next steps.

In conclusion, slice cultures derived from human gastric and esophagogastric adenocarcinoma have been successfully established and may become an attractive tool for drug response prediction as well as an interesting research model for investigating tumor heterogeneity and molecular features of drug resistance.

## Acknowledgments

The authors thank Angela Ehrlich and Constance Hobusch for technical assistance. This study has been supported

in part by a grant from the German Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF).

## Conflict of Interest

Florian Lordick received research support from GlaxoSmithKline (GSK), Fresenius Biotech, and Merck-Serono (via his institution). He received travel support to scientific meetings from Amgen, Merck-Serono, Roche, and Taiho. He acted as an advisor or speaker (without accepting personal payments) for Amgen, Boston Biomedical, Lilly, Roche, and Taiho. All other authors have no conflicts to disclose.

## References

- Lordick, F., S. Lorenzen, Y. Yamada, and D. Ilson. 2014. Optimal chemotherapy for advanced gastric cancer: is there a global consensus? *Gastric Cancer Off. J. Int. Gastric Cancer Assoc. Jpn. Gastric Cancer Assoc.* 17:213–225.
- Cunningham, D., W. H. Allum, S. P. Stenning, J. N. Thompson, C. J. H. Van de Velde, M. Nicolson, et al. 2006. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N. Engl. J. Med.* 355:11–20.
- Ychou, M., V. Boige, J.-P. Pignon, T. Conroy, O. Bouché, G. Lebreton, et al. 2011. Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCO multicenter phase III trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29:1715–1721.
- Van Hagen, P., M. C. C. M. Hulshof, J. J. B. van Lanschot, E. W. Steyerberg, M. I. van Berge Henegouwen, B. P. L. Wijnhoven, et al. 2012. Preoperative chemoradiotherapy for esophageal or junctional cancer. *N. Engl. J. Med.* 366:2074–2084.
- Smalley, S. R., J. K. Benedetti, D. G. Haller, S. A. Hundahl, N. C. Estes, J. A. Ajani, et al. 2012. Updated analysis of SWOG-directed intergroup study 0116: a phase III trial of adjuvant radiochemotherapy versus observation after curative gastric cancer resection. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30:2327–2333.
- Sasako, M., S. Sakuramoto, H. Katai, T. Kinoshita, H. Furukawa, T. Yamaguchi, et al. 2011. Five-year outcomes of a randomized phase III trial comparing adjuvant chemotherapy with S-1 versus surgery alone in stage II or III gastric cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29:4387–4393.
- Bang, Y.-J., Y.-W. Kim, H.-K. Yang, H. C. Chung, Y.-K. Park, K. H. Lee, et al. 2012. Adjuvant capecitabine and oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): a phase 3 open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 379:315–321.
- Moehler, M., C. T. H. Baltin, M. Ebert, W. Fischbach, I. Gockel, L. Grenacher, et al. 2015. International comparison of the German evidence-based S3-guidelines on the diagnosis and multimodal treatment of early and locally advanced gastric cancer, including adenocarcinoma of the lower esophagus. *Gastric Cancer.* 18:550–563.
- Schmidt, T., L. Sivic, S. Blank, K. Becker, W. Weichert, T. Bruckner, et al. 2014. Prognostic value of histopathological regression in 850 neoadjuvantly treated oesophagogastric adenocarcinomas. *Br. J. Cancer* 110:1712–1720.
- Blank, S., F. Lordick, F. Bader, M. Burian, M. Dobritz, L. Grenacher, et al. 2015. Post-therapeutic response evaluation by a combination of endoscopy and CT scan in esophagogastric adenocarcinoma after chemotherapy: better than its reputation. *Gastric Cancer* 18:314–325.
- Lowy, A. M., P. F. Mansfield, S. D. Leach, R. Pazdur, P. Dumas, and J. A. Ajani. 1999. Response to neoadjuvant chemotherapy best predicts survival after curative resection of gastric cancer. *Ann. Surg.* 229:303–308.
- Mansour, J. C., L. Tang, M. Shah, D. Bentrem, D. S. Klimstra, M. Gonen, et al. 2007. Does graded histologic response after neoadjuvant chemotherapy predict survival for completely resected gastric cancer? *Ann. Surg. Oncol.* 14:3412–3418.
- Kelsen, D. P., K. A. Winter, L. L. Gunderson, J. Mortimer, N. C. Estes, D. G. Haller, et al. 2007. Long-term results of RTOG trial 8911 (USA Intergroup 113): a random assignment trial comparison of chemotherapy followed by surgery compared with surgery alone for esophageal cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25:3719–3725.
- Lordick, F., K. Ott, B.-J. Krause, W. A. Weber, K. Becker, H. J. Stein, et al. 2007. PET to assess early metabolic response and to guide treatment of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction: the MUNICON phase II trial. *Lancet Oncol* 8:797–805.
- Sasako, M., M. Terashima, W. Ichikawa, A. Ochiai, K. Kitada, I. Kurahashi, et al. 2015. Impact of the expression of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase genes on survival in stage II/III gastric cancer. *Gastric Cancer.* 18:538–548.
- Merz, F., F. Gaunitz, F. Dehghani, C. Renner, J. Meixensberger, A. Gutenberg, et al. 2013. Organotypic slice cultures of human glioblastoma reveal different susceptibilities to treatments. *Neuro-Oncol.* 15:670–681.
- Gerlach, M. M., F. Merz, G. Wichmann, C. Kubick, C. Wittekind, F. Lordick, et al. 2013. Slice cultures from head and neck squamous cell carcinoma: a novel test

- system for drug susceptibility and mechanisms of resistance. *Br. J. Cancer* 110:479–488.
18. Vaira, V., G. Fedele, S. Pyne, E. Fasoli, G. Zadra, D. Bailey, et al. 2010. Preclinical model of organotypic culture for pharmacodynamic profiling of human tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:8352–8356.
  19. Holliday, D. L., M. A. Moss, S. Pollock, S. Lane, A. M. Shaaban, R. Millican-Slater, et al. 2013. The practicalities of using tissue slices as preclinical organotypic breast cancer models. *J. Clin. Pathol.* 66:253–255.
  20. Lordick, F., W. Allum, F. Carneiro, E. Mitry, J. Tabernero, P. Tan, et al. 2014. Unmet needs and challenges in gastric cancer: the way forward. *Cancer Treat. Rev.* 40:692–700.
  21. Miao, R.-L. 2014. Towards personalized perioperative treatment for advanced gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 20:11586.
  22. Hughes, P., D. Marshall, Y. Reid, H. Parkes, and C. Gelber. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? 2007. *Biotechniques.* 43:575, 577–578, 581–582 passim.
  23. Kamb, A. 2005. What's wrong with our cancer models? *Nat. Rev. Drug Discov.* 4:161–165.

## Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article:

**Figure S1.** Characteristics of slice cultures.

**Figure S2.** Tumor cellularity after cytotoxic drug exposure (all cases).

**Table S1.** Patient and treatment characteristics of all samples used for slice culture experiments.

## **5. Zusammenfassung**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Titel: Organotypische Slicekulturen aus humanen Adenokarzinomen des Magens und des gastroösophagealen Überganges

Eingereicht von: Karl Justus Körfer

Angefertigt am Universitären Krebszentrum Leipzig (UCCL) und am Institut für Anatomie der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Betreuer: Herr Prof. Dr. med. Florian Lordick, Herr Prof. Dr. med. Ingo Bechmann

Eingereicht im Mai 2016

Magenkarzinome und Karzinome des gastroösophagealen Überganges sind aggressive und heterogene Tumorentitäten mit einer schlechten Prognose. Trotz Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien und Verbesserung der chirurgischen Expertise liegt das 5-Jahres-Überleben in Europa für lokalisierte und in kurativer Intention behandelte Magenkarzinome bei nur ca. 40 %. Das unbefriedigende Ansprechen auf Chemotherapie und die schlechte Prognose auch nach kurativ intendierter Behandlung unterstreichen die Notwendigkeit der Entwicklung personalisierter und wirksamerer Therapiekonzepte. Diese könnten in neuen ex vivo Tumormodellen entwickelt werden. Eine naturgetreue Abbildung von primären humanen Tumoren mit sämtlichen darin enthaltenen Zellpopulationen und Stroma in einem ex vivo System scheint wichtig für das Verstehen von Tumobiologie, Heterogenität und Chemoresistenz sowie das Messen von Chemotherapiesensitivität.

In dieser Studie konnten wir organotypische Slicekulturen aus Magenkarzinomen und Karzinomen des gastroösophagealen Überganges erfolgreich etablieren und den Effekt von zytotoxischen Substanzen in diesem System untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass sich Schnittkulturen aus chirurgischen Gewebeproben bis zu 6 Tagen kultivieren lassen. Relevante zelluläre Prozesse wie Proliferation von Tumor- oder Stromazellen sowie apoptotische Prozesse konnten beobachtet werden. Ein Vorteil dieses System ist der Erhalt der natürlichen epithelial-stromalen Architektur und der Morphologie der Zellen des primären Tumors. Der Kultivierungszeitraum von bis zu 6 Tagen bietet genügend Zeit, um verschiedene Experimente in diesem Modell durchzuführen.

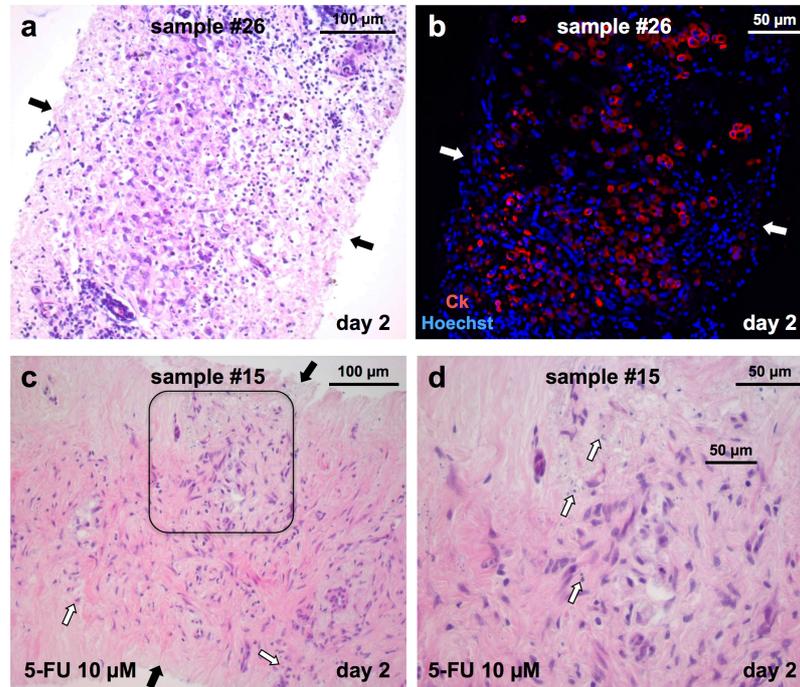
Zusätzlich wurden die Schnitte über zwei Tage mit 5-FU und Cisplatin behandelt und mit jeweiligen Negativ-Kontrollen verglichen. Chemotherapie-induzierte Gewebeeralterationen und eine Senkung der Tumorzellzahl in den Schnittkulturen konnte nach zytotoxischer

Behandlung *in vitro* in verschiedenen Dosierungen beobachtet werden. Unser Modell konnte unterschiedliche Effekte zwischen den verschiedenen Chemotherapeutika, Dosierungen und in verschiedenen Tumoren darstellen.

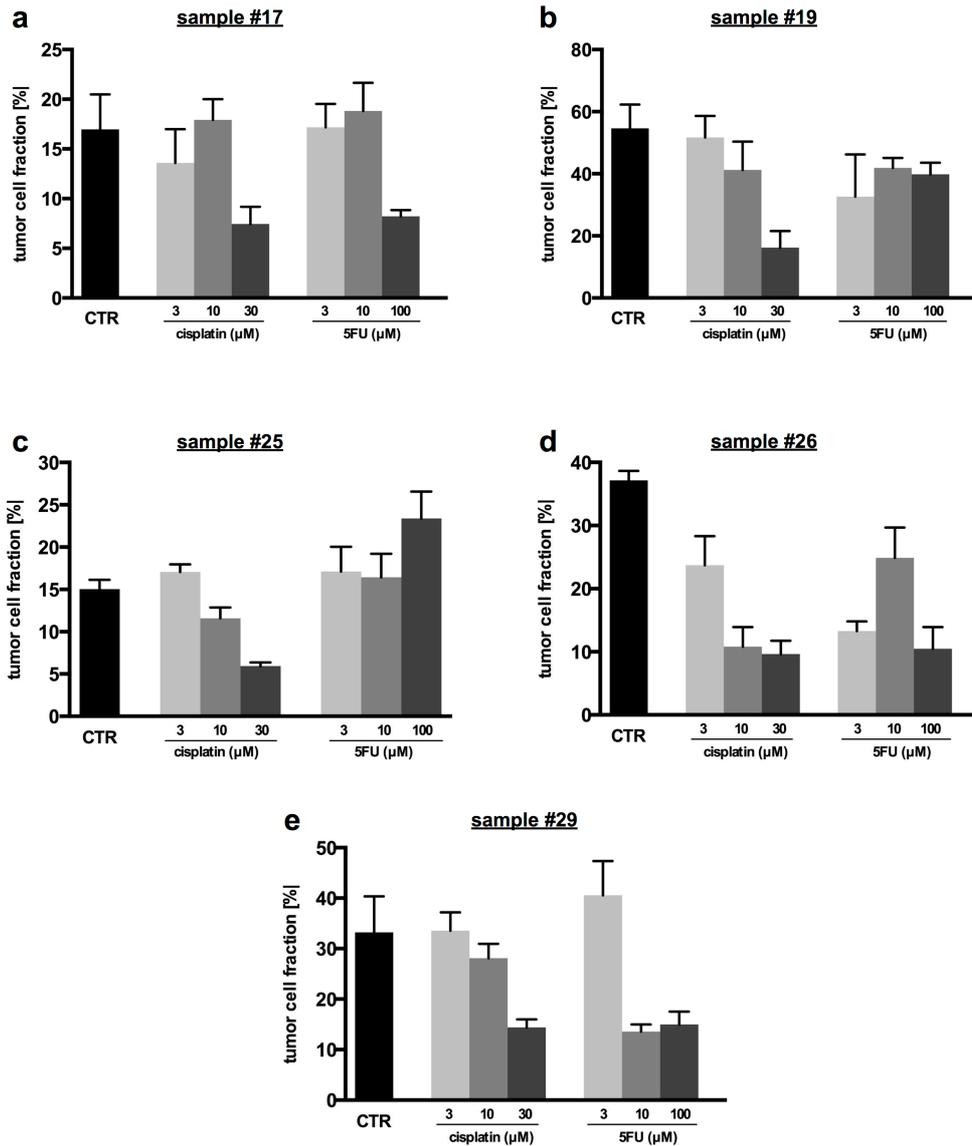
In Zukunft sollten Schnittkulturen aus Biopsien weiter entwickelt werden, um möglicherweise eine Vorhersage bezüglich eines Ansprechens auf bestimmte Chemotherapeutika vor Therapiebeginn treffen zu können. Erste Pilotexperimente mit Biopsien aus Magenkarzinomen wurden durchgeführt. Prinzipiell war es möglich, Schnittkulturen aus Biopsien zu erstellen, und es konnte ein guter Erhalt der Zellmorphologie (zwischen 2 und 4 Tagen) mittels qualitativer Auswertung von H&E Schnitten gezeigt werden. Jedoch müssen hier auf Grund von methodischen Herausforderungen in Zukunft weitere Experimente erfolgen, um ein valides Tumormodell aus humanen Biopsien entwickeln zu können. Zudem ist es von enormer Relevanz, eine schnelle und objektivierbare Methode zur Auswertung der Tumorzellzahl, Apoptose- und Proliferationsrate zu entwickeln, um ein klinisch reifes Testsystem zu etablieren. Zur Zeit werden die verschiedenen Zellen mittels immunhistochemischer Färbungen dargestellt und dann semi-automatisiert ausgezählt. Dieses Verfahren ist zeitaufwendig und setzt einen hocherfahrenen Mitarbeiter als Untersucher voraus. Hinzu kommt, dass noch eindeutige Schwellenwerte definiert werden müssen, welche Senkung der Tumorzellzahl oder anderer Prozesse eine Response definieren bzw. eine Resistenz gegenüber einem Therapeutikum voraussagen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Schnittkulturen von Magenkarzinomen und AEG ein humanes präklinisches Tumormodell darstellen, in dem die Mikroumgebung und die originale Morphologie des Tumors weitestgehend erhalten bleibt. Die wichtige Bedeutung der Mikroumgebung für Tumorwachstum, Angiogenese und Invasion wurde in vielen Studien beschrieben. Die Entwicklung neuer Therapieoptionen und personalisierter Therapiekonzepte sowie die Untersuchung der Tumormikroumgebung könnten in Schnittkulturen durchgeführt werden. Zusätzlich können in diesem Modell neue Therapie-Targets gefunden und analysiert werden. Die Aktivierung onkogener Signalwege sowie genetische Alterationen und ihre Bedeutung vor und nach zytotoxischer Therapie lassen sich voraussichtlich mittels Tumorschnittkulturen *in vitro* untersuchen.

## 6. Anlagen



**Supplement Fig. 1. Characteristics of slice cultures.** (a) No vertical gradient of cell viability in slice cultures was observed upon H&E staining after 2 days. Nuclei were evenly distributed over the complete vertical slice diameter. (b) This was also seen in immunohistochemistry stains, in which cytokeratin (Ck) labeled tumor cells were equally distributed within the entire vertical culture (arrows). (c,d) Apoptosis (apoptotic bodies, white arrows with a black border) could be observed over the entire vertical diameter after exposure of slice cultures towards cytotoxic agents (here: 5-FU 10  $\mu$ M). Surfaces are marked with a white (b) or black (a, c, d) arrow. Fluorescent microscopy (b), original magnification: 200x in a-c, 400x in d.



Supplement Fig. 2 Tumor cellularity after cytotoxic drug exposure (all cases). (a-e) Five cases, which showed a tumor cell fraction at day 0 of greater than 10% are illustrated.

sample number	origin	neoadjuvant chemotherapy	time until cultivation	culture period	displayed	histology and grading
13	GC	no	6h	1d, 2d, 4d, 6d	Analysis (Fig. 3b)	adenocarcinoma, diffuse type, G3
14	GC	yes	4h	2d, 4d, 6d	Analysis (Fig. 3a)	adenocarcinoma, intestinal type, G3
15	GC	yes	8h	2d, 4d, 6d	Analysis (Fig. 3a)	adenocarcinoma, diffuse type, G3
17	AEG	yes	2h	2d, 4d, 6d	Analysis (Fig. 3a)	adenocarcinoma, diffuse type, G3
19	GC	no	5h	2d, 4d, 6d	Analysis (Fig. 1 a-d, Fig. 2 a-d; Fig. 3b)	adenocarcinoma, intestinal type, G2
25	GC	no	6h	2d, 4d, 6d	Analysis (Fig. 3 c-f, b)	adenocarcinoma, diffuse type, G3
26	GC	no	4h	2d, 4d, 6d	Analysis (Fig. 2 e-h; Fig. 3b; Fig. 4 f-j; Fig. 5 a-j)	adenocarcinoma, diffuse type, G3
29	AEG	yes	6h	2d, 4d, 6d	Analysis (Fig. 1 e-g, Fig. 3a, Fig. 4 a-e, Fig. 6)	adenocarcinoma, diffuse type, G3

**Supplement Table 1:** Patient and treatment characteristics of all samples used for slice culture experiments.

## 7. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift

## **8. Lebenslauf**

## **9. Danksagungen**

Einen besonderen Dank möchte ich an Herrn Prof. Lordick und Herrn Prof. Bechmann richten, sie haben mir durch ihre Unterstützung und durch das Vertrauen in meine Person, die Promotion ermöglicht.

Des Weiteren möchte ich hervorheben, dass die Arbeit nur durch eine gute Zusammenarbeit mit den folgenden Institutionen entstehen konnte. Dazu zählen die Klinik für Viszeral-, Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie (PD Dr. Kassahun) und das Institut für Pathologie (Prof. Wittekind, Dr. Kubick) der Uni Leipzig, die Klinik für Allgemein-, Viszeral und Onkologische Chirurgie (Prof. Weimann) und das Institut für Pathologie (Dr. Wiechmann) des Klinikum St. Georg sowie die Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie (Prof. Schumachacher, PD Dr. Möbius) und das Institut für Pathologie (Prof. Gaßler) des Klinikum Braunschweig und die Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Minimal-Invasive Chirurgie des Klinikums Peine (Prof. Eckmann).

Bei Herrn Prof. Aigner außerdem bedanke ich mich für die Beratung in pharmakologischen Fragen. Mein besonderer Dank gilt Sonja Kallendrusch, die im Labor stets Zeit für mich hatte und mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Für die technische Unterstützung im Labor möchte ich mich bei Angela Ehrlich bedanken.

Zudem möchte ich meinen Eltern danken, dass sie mir das Studium ermöglicht und mich dabei durch Anregungen und Diskussionen unterstützt haben. Auch danke ich meiner Freundin Annika, die mich ausnahmslos unterstützt hat und mir mit ihrer Geduld geholfen hat, die Arbeit zu vollenden.