

Aus der Medizinischen Klinik I  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. Hendrik Lehnert

---

**Aus dem Knochenmark stammende Endothelzellen tragen zur  
Vaskulogenese und Angiogenese in murinen WEHI- und JC- Tumoren bei**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von  
Gabriele Susanne Heinze  
aus Lübeck

Lübeck 2009

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan O. Peters

2. Berichterstatter/ Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Horst Pagel

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2009

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 24.11.2009

Gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1-16</b>
1.1 Definition: Die hämatopoetische Stammzelle	2-11
1.1.1 Allgemeines	2
1.1.2 Das hämatopoetische Stammzellsystem	3
1.1.2.1 Hämangioblast: Entwicklung von Hämatopoese und Angiogenese	
1.1.2.2 Regulation der Differenzierung am Beispiel der Hämatopoese	
1.1.2.3 Oberflächenmarker, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle im hämatopoetischen System	
1.1.3 Das Knochenmark als Ursprungsort von nicht hämatopoetischen Stammzellen	8
1.1.4 Die endotheliale Stammzelle	9
1.1.4.1 Die Regulation der endothelialen Stammzelle	
1.1.4.2 Pro- und antiangiogenetische Faktoren	
1.2 Angiogenese und Tumorangio-genese	11-15
1.2.1 Allgemeines	11
1.2.2 Physiologische Funktionen des Endothels	12
1.2.3 Tumorangio-genese	13
1.3 Die Rolle von zirkulierenden Stammzellen in der Tumorangio-genese	15-16
<b>2 Fragestellung</b>	<b>17-18</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>19-37</b>
3.1 Material	19-23
3.1.1 Technische Geräte	19
3.1.2 Labormaterial	19
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien	20
3.1.4 Zellkulturmedien, Lösungen und Puffer	20
3.1.5 Enzyme und Primer	21
3.1.6 Kits	22
3.1.7 Antikörper und Hybridisierungssonden	22
3.1.8 Zelllinien	22
3.1.9 Mausstämme	23
3.2 Methoden	23-37
3.2.1 Tumoren	23
3.2.1.1 Zellkultur	
3.2.1.2 Anfertigung von Zytospinpräparaten	
3.2.1.3 Geschlechtsbestimmung mittels FISH	
3.2.1.4 Durchflußzytometrie	
3.2.2 Tierexperimente	25
3.2.3 Tumorimplantation	26
3.2.4 Transplantationsmodell	27
3.2.4.1 Radiatio	

### III

3.2.4.2 Prinzip der Knochenmarktransplantation	
3.2.4.3 Tumorimplantation	
3.2.4.4 Entnahme der Tumoren und Entnahme von Knochenmark für die Messung im Light Cyclor	
3.2.4.5 DNA-Gewinnung und Konzentrationsbestimmung	
3.2.5 Relativ-quantitative Polymerase-Chain-Reaction im Light Cyclor	30
3.2.6 Anfertigung von Cryoschnitten	32
3.2.7 Färbungen	33
3.2.7.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	
3.2.7.2 Immunhistochemie: Zweck, Technik, Gewebs- und Zellspezifität	
3.2.7.3 FISH (Fluoreszenz In Situ Hybridisierung)	
3.2.7.4 Kombination von Immunhistochemie und FISH	
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>38-51</b>
4.1 Überprüfung der Tumorzelllinien auf ihre Eignung für die Versuchsaufbauten	38-42
4.1.1 Geschlechtsbestimmung der Tumorzelllinien mittels Fluoreszenz in Situ Hybridisierung	38
4.1.2 Poliploidienachweis der Zellart VLM mittels Durchflußzytometrie	41
4.2 Nachweis eines männlichen Knochenmark-Chimerismus in weiblichen Tieren und Nachweis eines weiblichen Knochenmark-Chimerismus in männlichen Tieren	42-44
4.3 Implantation weiblicher Tumoren in männliche Balb/c-Mäuse	44-45
4.4 Nachweis männlicher, CD31-positiver Zellen in weiblichen Tumoren nach Knochenmarktransplantation	46-50
4.5 Nachweis von männlichen T- und B-Lymphozyten in weiblichen Tumoren nach Knochenmarktransplantation	50-51
<b>5 Diskussion</b>	<b>52-58</b>
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>59</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>60-74</b>
<b>8 Anhänge</b>	<b>75-80</b>
8.1 Abkürzungsverzeichnis	75-76
8.2 Abbildungsverzeichnis	76-77
8.3 Tabellenverzeichnis	77
8.4 Tierantrag	78-80
<b>9 Danksagung</b>	<b>81</b>
<b>10 Lebenslauf</b>	<b>82-83</b>

## 1 Einleitung

Das Wachstum und die Ausbreitung bösartiger Tumoren hängen wesentlich von ihrer Anbindung an das Blutsystem des Wirtsorganismus ab. Tumorzellen sind in der Lage, Signale in die Blutbahn auszusenden, welche Endothelzellen stimulieren und chemisch „anlocken“, was schließlich zur Ausbildung von Kapillaren im Tumor führt. Es sind proangiogenetische Faktoren wie zum Beispiel VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), welche hierbei eine wesentliche Rolle spielen. Die neu gebildeten Blutgefäße versorgen die entarteten Zellen mit Sauerstoff und notwendigen Nährstoffen und ermöglichen dadurch deren Proliferation, deren Invasionsfähigkeit ins umliegende Gewebe, die Ausbreitung in entferntere Körperregionen und die Bildung neuer Zellkolonien.

Verglichen mit der embryonalen Vaskulogenese läuft die Tumorangiogenese chaotisch ab, dies ist auf den hohen Energiebedarf während des exponentiellen Tumorwachstums zurückzuführen. Die Zellen, welche zu Tumorgefäßwänden beitragen, variieren innerhalb verschiedener Tumortypen und innerhalb verschiedener Areale desselben Tumors. In den meisten Tumortypen findet man Blutgefäße, welche von morphologisch und funktionell normalen, nicht malignen Zellen ausgekleidet sind. Diese Gefäße findet man in unmittelbarer Nachbarschaft zum normalen Gefäßsystem im gesunden Gewebe. Die Vorstellung ist, daß die Tumorangiogenese vornehmlich durch fortlaufende mitotische Vermehrung von ortständigen Endothelzellen am Rande des Tumors gewährleistet wird, welche in das maligne Gewebe hinein aussprossen. Es entsteht so ein baumartig angeordnetes Kapillarnetz. Maligne Zellen können aber in diese Gefäßauskleidung eingestreut sein und direkten Kontakt zum Blutstrom haben. In den Tumorarealen, welche weiter entfernt vom angrenzenden normalen Gewebe liegen und somit keinen Anschluß an das Gefäßsystem durch Aussprossen von Endothelzellen finden, kommt es zu einer Bildung von Pseudogefäßen, dies sind Kanäle, welche von Tumorzellen gebildet werden und nicht die morphologischen Strukturen eines Blutgefäßes aufweisen.

Ebenso findet man Endothelzellen im Tumorgefäßsystem, welche genetisch und funktionell nicht entartet sind. Die Herkunft dieser genetisch normalen Endothelzellen ist noch unklar. Endotheliale Progenitorzellen sind adhärent zum Endothel, wenn sie mit proangiogenetischen Faktoren stimuliert werden. Diese Vorgänge spielen vor allem in der physiologischen Gefäßregeneration und –reparatur eine Rolle. Endotheliale Vorläuferzellen findet man ebenfalls in Tumoren. Ob ihre Herkunft im Knochenmark liegt, und ob sie von hämatopoetischen Stammzellen abstammen, welche in

endotheliale Vorläuferzellen transdifferenzieren, wird kontrovers diskutiert. Es ist also unklar, wo die Stammzellreserve der endothelialen Vorläuferzellen vornehmlich ruht.

Eine genetische Manipulation der endothelialen Progenitorzellen, so daß sie eine antiangiogenetische Wirkung auf das Tumorgefäßsystem haben, wäre ein potentes Mittel zur Therapie von malignen Erkrankungen. Bisher steht die Suche nach antiangiogenetischen Faktoren oder Hemmung proangiogenetischer Faktoren im Brennpunkt wissenschaftlicher Bemühungen. Selbsterneuerungs-, Migrations- und Differenzierungsprozesse des endothelialen Vorläuferzellsystems und die von ihnen abhängigen physiologischen Reparatur- und Regenerationsvorgänge sind auch im erwachsenen Organismus komplex reguliert. Diese Arbeit soll einen Beitrag leisten zur Klärung der grundsätzlichen Frage der Beteiligung aus dem Knochenmark stammender endothelialer Progenitorzellen zur Auskleidung von Tumorgefäßen mit einer Endothelzellschicht.

## **1.1 Definition: Die hämatopoetische Stammzelle**

### **1.1.1 Allgemeines**

Im Folgenden wird zunächst auf Stammzellen und Angiogenese im Allgemeinen eingegangen:

Stammzellen (SZ) werden durch zwei elementare Eigenschaften definiert: Zum einen durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, zum anderen durch ihre Fähigkeit, Tochterzellen unterschiedlichster Differenzierung hervorzubringen. In Abhängigkeit von ihrer Funktionsfähigkeit und ihrem Entwicklungsstadium wird auch zwischen toti-, multi- und pluripotenten SZ unterschieden. Diese Begriffe werden leicht verwechselt, daher folgt hier die Definition für die Verwendung der Begriffe in dieser Arbeit:

Totipotenz bedeutet für SZ die Fähigkeit, Zellen aller drei Keimblätter, also jeglicher Differenzierung, hervorbringen zu können. Diese Fähigkeit besitzen letztendlich nur die befruchtete Eizelle (omnipotent) und embryonale Stammzellen.

Unter den Sammelbegriff multipotente SZ fallen alle SZ, die schon einem Keimblatt zugeordnet sind, hier jedoch noch verschiedenste Differenzierungswege einschlagen können und ein ganzes Leben lang den benötigten Nachschub an Zellen bilden. Dies sind z.B. die multipotenten hämatopoetischen SZ, die multipotenten mesenchymalen SZ und die multipotenten neuronalen SZ.

Von Pluripotenz spricht man bei SZ, wenn die Anzahl an einschlagbaren Differenzierungswegen weiter eingeschränkt ist, und die Fähigkeit zur Selbsterneuerung eingeschränkt oder kaum mehr vorhanden ist. Diese letzte Stufe auf dem Weg zur Differenzierung der hämatopoetischen SZ lässt sich in in-vitro-Kolonieassays recht gut als Colony-Forming-Units (CFU-Erythroid, CFU-Granulocyte-

Macrophage und CFU-Macrophage) darstellen. Diese Begriffe wurden in einer Zeit geprägt, in der experimentelle Untersuchungen an Zellkulturen und erste Transplantationsversuche von Knochenmark (KM) in Mäusen Einblicke in die SZ-Biologie erlaubten [1 ; 2; 3]. Stammzellen wurden initial vorwiegend anhand ihrer Fähigkeit definiert und unterschieden, nach 14-tägiger Kultivierung in Methylzellulose klonale Zellhaufen auszubilden, die ein oder mehrere frühe Differenzierungsmerkmale zeigten.

Im Verlauf der letzten vier Jahrzehnte machten technische Neuerungen, wie die Möglichkeit der durchflußzytometrischen Immunphänotypisierung unter Verwendung spezifischer monoklonaler Antikörper gegen Differenzierungsantigene und die Entwicklung biologischer Stammzellassays in Tiermodellen die Umschreibung der Stammzellen vielfältiger, aber nicht zwingend genauer. Nach wie vor bleiben die unterschiedlichen Stammzellpopulationen schlecht definiert, denn sowohl morphologische als auch funktionelle Eigenschaften erlauben bislang allenfalls eine annähernde Umschreibung, und die in wissenschaftlichen Traktaten untersuchten Populationen sind häufig nicht untereinander vergleichbar. Lediglich die befruchteten Eizellen und frühe embryonale SZ sind homogen abgrenzbar. Besonders für die adulten endothelialen und hämatopoetischen SZ gilt, daß sie sich morphologisch und immunphänotypisch nicht einheitlich darstellen, und sie häufig nur funktionell definierbar sind. In dieser Arbeit gilt für alle Zellen, die sich unterhalb der Ebene der Pluripotenz bewegen, der Begriff Vorläuferzelle oder auch Progenitorzelle. Zellen dieser Ebene tragen erstmalig spezifische Oberflächenmoleküle, die eine immunphänotypische Unterscheidung erlauben und werden von weniger puristisch denkenden Forschergruppen häufig noch als SZ beschrieben (z.B. die CD 133 positive, zirkulierende mesenchymale SZ).

### **1.1.2 Das hämatopoetische Stammzellsystem**

Unter den bislang beschriebenen Zellsystemen, die einer Selbsterneuerung und komplexen Differenzierungsmechanismen unterliegen, ist das der Hämatopoese am längsten bekannt und zeigt eindrucksvoll das enorme Potential und die Wichtigkeit der normalen SZ-Regulation auf. Die adulte Hämatopoetische Stammzelle (HSZ) bringt den erforderlichen Nachschub an Blutzellen hervor und zwar ein ganzes Leben lang. Der menschliche Körper enthält etwa 24 Billionen ( $24 \times 10^{12}$ ) rote Blutkörperchen, das ist fast ein Viertel der Gesamtzellzahl des menschlichen Körpers. Der tägliche Zellverlust an roten Blutkörperchen beträgt etwa  $2 \times 10^{11}$  Zellen, der Nachschubbedarf an restlichen Blutzellen wird insgesamt auf  $3 \times 10^{11}$  Zellen eingeschätzt [131]. Die HSZ müssen also täglich einen Nachschub von 500 000 Millionen ( $5 \times 10^{11}$ ) Zellen hervorbringen. Diese massive Zellproduktion geht vor sich, ohne daß die SZ ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung einbüßen.

Anhand komplexer muriner Transplantationsexperimente konnte gezeigt werden, daß die hämatopoetischen Vorläuferzellen mobil sind und zwischen verschiedenen Körperkompartimenten migrieren. In der humanen Transplantationsmedizin ist die Sammlung mobilisierter Vorläuferzellen nach Wachstumsfaktoranreiz (G-CSF) etabliert. Die Blutbildung spielt sich im Wesentlichen im Knochenmark ab. Auch hier machen die eigentlichen SZ nur etwa 0,05% der Zellen insgesamt aus. Und man schätzt, daß jede SZ nur etwa 50 Mal während des gesamten Lebens eine Zellteilung durchmacht. In Zusammenschau mit den oben genannten Zahlen zeigt dies das gewaltige proliferative Potential der Stammzellen, bzw. der jeweiligen Vorläuferzellen [131].

#### 1.1.2.1 Hämangioblast: Entwicklung von Hämatopoese und Angiogenese

Man nimmt an, daß die hämatopoetischen Stammzellen und die das Endothel generierenden Zellen einen gemeinsamen Ursprung im sogenannten „Hämangioblasten“ haben [4]. Während der Embryogenese entwickeln sich beide Zelltypen im Dottersack und primitive Erythrozyten differenzieren in unmittelbarer Nähe von endothelialen Vorläuferzellen. Die Hämangioblastentheorie sieht sich unter anderem durch Untersuchungen mit Mäusen, die einen VEGFR-2-Knockout-Gendefekt haben, bestätigt, denn hier findet man weder angioblastische noch hämatopoetische Zellen [5]. Des Weiteren exprimieren endotheliale und hämatopoetische Vorläuferzellen gleiche Gene, z.B. SCL/Tal-1, flk-1/KDR, tie-1, tie-2, c-kit, CD34 und unterliegen somit höchstwahrscheinlich ähnlichen Regulationssystemen [6; 7; 8; 9; 10; 130]. Zu weiteren Ähnlichkeiten beider Zellsysteme gehört, daß zirkulierende Vorläuferzellen die Produktionsorte für Selbsterneuerung und Differenzierung auffüllen. Dafür sprechen u.a. die Daten einer Arbeitsgruppe, die immundefiziente (SCID) Mäuse subletal bestrahlt und anschließend mit HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) transplantiert hat und dann später nach intra-oculärer Gabe von VEGF eine Laserphotokoagulation der retinalen Gefäße vorgenommen hat. Sechs Wochen nach Transplantation und zwei Wochen nach Photokoagulation wurden die Tiere getötet und die Retina entnommen. Es wurden Blutgefäße mit humanen Endothelzellen, die also dem transplantierten SZ-Pool entstammten, in den äußeren Schichten der Retina und in den Glaskörper einwachsend vorgefunden, vergleichbar zum Wachstumsmuster einer humanen diabetischen Retinopathie [11]. Auch in adulten Organismen spielt die Regeneration von EZ lebenslang eine entscheidende physiologische Rolle. Es kommt im ganzen Organismus häufig zu Endothelschädigungen, die schnell behoben werden müssen. Genauer beschrieben ist das Gefäßwachstum bei Reparaturvorgängen nach größeren Gewebsschädigungen wie dem Herzinfarkt, wo es zur Ausbildung eines Kollateralkreislaufes und zu intraläsionalen Reparaturfunktionen kommen kann.

Anhand dieses Systems wurde der dynamische Charakter der endothelialen SZ beschrieben. Es hat sich gezeigt, daß auch in adulten Organismen das Knochenmark ein Organ ist, in dem sich diese SZ normalerweise aufhalten. Die Frage, ob auch adulte angio- und hämatopoetische Vorläuferzellen eine gemeinsame Ursprungszelle im erwachsenen Organismus haben, bleibt umstritten. Immerhin sprachen einige experimentelle Ansätze dafür, andere dagegen. Vor einigen Jahren vermutete man ungemein dynamische und pluripotente SZ im KM. Da jedoch morphologische Stigmata eher definierte Progenitorkonstellationen vermittelten, kam die Theorie der transdifferenzierenden Vorläuferzelle auf. Diese besagt, daß Vorläuferzellen, die sich genetisch schon in eine Differenzierungsrichtung festgelegt haben, sich durch entsprechend starke Reize noch in eine andere Zellreihe differenzieren lassen. Inzwischen nimmt man an, daß das KM doch eher unterschiedliche VZ der verschiedenen Zellreihen beherbergt. Es zeigt sich jedoch, daß auch die nicht hämatopoetischen SZ keine spezifischen morphologischen Merkmale tragen, sie also nicht leicht untereinander unterscheidbar sind. Die häufig zitierten morphologischen Erkennungsmerkmale endothelialer und mesenchymaler Vorläuferzellen wie CD 31 oder CD 133 sind aus Sicht des Stammzellbiologen schon Merkmale relativer Ausgereiftheit.

#### 1.1.2.2 Regulation der Differenzierung am Beispiel der Hämatopoese

Die Signale, die zum Eintritt der hämatopoetischen Stammzellen in die Differenzierung führen, sind noch weitestgehend unklar. Sicher ist jedoch, daß es zu einer asymmetrischen Zellteilung kommt: Eine Zelle geht hierbei wieder in die G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus über und behält die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, während die Tochterzelle mehrere Generationen an hoch proliferativen Vorläuferzellen auf dem Weg zur Differenzierung hervorbringt. Es existieren mehrere Hypothesen darüber, wie es zu einer Entscheidung über die zu differenzierende Zellart kommt. In den frühen 60igern ging man davon aus, daß die Entscheidung über die einzuschlagenden Differenzierungswege ein rein stochastischer Prozeß ist. Die Chance auf Selbsterneuerung beträgt laut Hypothese 60%, während zu 40% die Chance auf Differenzierung besteht. Die Entwicklung der Hypothese stützte sich auf in-vitro-Beobachtungen und wurde „HER-Hypothese“ genannt (hematopoiesis engendered randomly) [3; 12]. Ende der 60iger Jahre tauchten durch in-vivo-Experimente erste Zweifel an der rein stochastischen Hypothese auf: In einem murinen Transplantationsmodell repopulierten SZ als sogenannte „spleen-colony forming units“ in der Milz; hier konnte beobachtet werden, daß hämatopoetische Stammzellkolonien in der Milzkapsel hauptsächlich Blutzellen der weißen Reihe hervorbrachten, während solche, die in der Milzpulpa entstanden, hauptsächlich Zellen der roten Reihe produzierten [13]. 1982 wurde erstmals entdeckt,

daß verschiedene Wachstumsfaktoren auch zu einer unterschiedlichen Differenzierung der hämatopoetischen Stammzelle beitragen [14]. Im Laufe der Jahre wurde demzufolge eine weitere Hypothese geformt, die sogenannte „HIM-Hypothese“ (haematopoietic inductive microenvironment) [15].

Stammzellen entwickeln sich in einem für sie günstigen Milieu im Knochenmark, welches als „Mikroenvironment“ oder „Stammzell-Nische“ bezeichnet wird, in welchem die Stammzellregeneration und die Differenzierung durch das Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Hormonen und Knochenmarkstroma optimal geregelt ist. Das Knochenmarkstroma besteht aus zellulären Elementen wie Fibroblasten, retikulären Zellen, Fettzellen, Makrophagen und Endothelzellen, welches in seiner Gesamtheit als „extrazelluläre Matrix“ subsummiert wird. Die Aussage der HIM-Hypothese ist, daß all die oben genannten Faktoren durch ihr Zusammenspiel den Zeitpunkt des Eintritts in die Differenzierung, sowie den Differenzierungsweg der SZ bestimmen. Neuere Untersuchungen zeigen, daß wahrscheinlich eine Mischung aus stochastischen und deterministischen Elementen der natürlichen SZ-Steuerung am nächsten kommt [16; 17; 18]. Die HSZ wird durch ein komplexes Gefüge molekularer Ereignisse gesteuert, wobei die letzten Details der Regulation auf Ebene der Signaltransduktion, Transkription oder genetischen Regulation (Suppressorgene, Zykline etc.) noch erforscht werden [123].

#### 1.1.2.3 Oberflächenmarker, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle im hämatopoetischen System

Es folgt eine kurze Darstellung der Charakterisierung der hämatopoetischen SZ, die viele Gemeinsamkeiten mit dem System der frühen angiopoetischen Vorläuferzelle hat.

Eine Möglichkeit der Charakterisierung von Zellen erfolgt über die Immunphänotypisierung ihrer Oberflächenmuster. Es ist bislang jedoch noch nicht möglich, eine hämatopoetische SZ, die noch keine differenziellen Eigenschaften aufweist, hiermit zweifelsfrei zu markieren. Eine der Möglichkeiten, die murine HSZ morphologisch zu umschreiben, erfolgt durch den Nachweis einer Expression von stem cell antigen (SCA-1<sup>+</sup>) bei gleichzeitig geringer Expression von Thy-1 (Thy-1<sup>low</sup>) und dem völligen Fehlen eines hämatopoetischen linienspezifischen Markers (lin<sup>-</sup>) [19; 20].

Zellpopulationen mit dieser morphologischen Eigenschaft erfüllen viele der Stammzellfunktionen, aber nicht alle. Diese Zelle kann grob mit der CD34<sup>+</sup> HLADR<sup>-</sup>lin<sup>-</sup> Zelle beim Menschen verglichen werden. Diese Zellpopulation ist biologisch allerdings schon eine relativ weit fortgeschrittene Stammzelle; es konnte gezeigt werden, daß die CD34 positiven Zellen aus einer CD34 negativen Population mit größerem SZ Potential hervorgehen [21; 22]. Das CD34 Molekül findet sich beim Menschen auch auf frühen differenzierten HSZ und auf Endothelzellen.

Schreiten die humanen Zellen in ihrer Differenzierung fort, verlieren sie die CD34-Oberflächeneigenschaft, so daß es sich hier immerhin um einen probaten Marker von Zellen mit Vorläufereigenschaften handelt.

Sowohl beim Tier (z. B.: Mäuse) als auch beim Menschen sitzen SZ nicht nur im KM, sondern verfügen auch über die Fähigkeit, im Körper zu zirkulieren. Diese Eigenschaft erst macht etwa die klinische Transplantation von SZ möglich, ohne daß eine Knochenmark-Entnahme nötig ist. Inzwischen sind auch die Signalkaskaden, die zum sog. „Homing“, also dem Einnisten der zirkulierenden Zelle ins KM führen, recht gut beschrieben.

Für Adhäsion, Migration und Zirkulation spielen Adhäsionsmechanismen zwischen HSZ und KM-Stromazelle eine zentrale Rolle. So exprimieren humane, zirkulierende CD34 positive hämatopoetische Stammzellen beispielsweise stark L-Selektin, wie vormals von Leukozyten während einer Entzündungsreaktion bekannt [23]. Wichtig für sowohl das Homing, als auch die Mobilisierung von SZ aus dem KM, scheint das  $\beta$ 1-Integrin „Very-Late-Antigen 4“ (VLA-4, CD29/CD49d) zu sein. Zirkulierende CD34<sup>+</sup> Zellen exprimieren weniger VLA-4 als knochenmarkständige. In in-vivo Studien wurde gezeigt, daß die Anzahl an zirkulierenden Vorläuferzellen durch eine Behandlung mit Anti-VLA-4-Antikörpern signifikant erhöht ist [24], was darauf schließen lässt, daß das Verbleiben von SZ in der Knochenmarksnische an das Vorhandensein von VLA-4 geknüpft ist. Des Weiteren sind Moleküle aus der Superimmunglobulin-Familie an der Adhäsion und Migration durch das Endothel beteiligt. Hierzu zählen vor allem „Intercellular Adhesion Molecule-1 und -2“ (ICAM-1, ICAM-2). Die Adhäsion an und Migration durch das Endothel kann durch Antikörper gegen den ICAM-Rezeptor gehemmt werden [25; 26]. Ein weiteres Molekül, das hier eine Rolle spielt, ist „Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1“ (PECAM-1, CD31), sowie CD18 und CD44. Während Antikörper gegen CD44 die Adhäsion im KM verhindern und zur Mobilisierung von Vorläuferzellen führen, verhindern Antikörper gegen CD31 und CD18 die Migration von Vorläuferzellen durch das Endothel [27; 28]. Eine Rolle in der SZ Migration, also dem Einwandern von SZ ins KM aus anderen Organen wie der Leber in der Embryonalphase, spielt das Chemokin „Stromal Cell Derived Factor-1“ (SDF-1). Möglicherweise wandern SZ sowohl beim Tier als auch beim Menschen entlang eines vom KM ausgehenden Gradienten in ihre Nische im KM ein. Inzwischen fließen neue Forschungsergebnisse in die Verbesserung der Mobilisation von Stammzellen und des Homings von Stammzellen nach autologer Stammzelltransplantation in die Therapie ein [129].

Stammzell-Selbsterneuerung, -Differenzierung und Homingmechanismen werden durch komplexe Systeme reguliert und eine Vielzahl der Oberflächenmarker, Adhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren (GATA-2, PU.1), die dabei involviert sind, sind

bekannt [29], aber die Mehrzahl der biologischen und molekularen Funktionen sind noch nicht bis ins letzte Detail erforscht.

### **1.1.3 Das Knochenmark als Ursprungsort von nicht hämatopoetischen Stammzellen**

Nachdem das KM herkömmlich als relativ exklusiver Ursprungsort für die Hämatopoese und allenfalls die Osteoblastogenese bezeichnet wurde, zeigte sich in neuerer Zeit, daß SZ aus dem KM nicht nur zur Blutzellenbildung befähigt sind, sondern nach Transplantation auch in Zellen mit epithelialen Eigenschaften ausdifferenzieren können. Nach Transplantation von männlichen, murinen hämatopoetischen Stammzellen in weibliche Mäuse konnten männliche Zellen mit epithelialen Eigenschaften im Empfängertier nachgewiesen werden, z.B. in Bronchien und Alveolen [30]. In einer Arbeit des hämatologischen Labors der Universität zu Lübeck wurde gezeigt, daß sich nach Transplantation von männlichem murinen Knochenmarks in weibliche Empfängertiere eine große Anzahl von männlichen Zellen im Muskelgewebe (intra- und extravasal) wiederfinden. In In-vitro-Versuchen wurde ein gering ausgeprägtes Potential von Muskelzellen nachgewiesen, hämatopoetische Kolonie-formende Zellen hervorzubringen. Umgekehrt zeigten aus dem Muskel gewonnene, männliche Zellen nach Transplantation in weibliche Empfänger ein geringes Potential, in das Knochenmark einzuwandern und dort die Hämatopoese zu rekonstituieren [31; 51]. SZ bieten ein gewaltiges Potential an Forschungsmöglichkeiten und neuen Therapiezielen, wie beispielsweise tissue engineering oder Gentherapie. Bei Untersuchungen an mesenchymalen Stammzellen konnte in-vitro die Fähigkeit zur Differenzierung in Zellen aller drei Keimblätter gezeigt werden, in in-vivo Experimenten an Mäusen trugen mesenchymale Stammzellen nach Transplantation sowohl zur Hämatopoese, als auch zur Epithelialisierung in Leber, Lunge und Darm bei [103]. Die Vermutung, daß Stammzellen der hämatopoetischen Linie in der Lage sind, in Zellen mit epithelialen Eigenschaften zu transdifferenzieren und umgekehrt, wird durch diese Untersuchungen unterstrichen, als auch die Eigenschaft zwischen Knochenmark und anderen Körpergeweben zu transmigrieren.

### 1.1.4 Die endotheliale Stammzelle

Auch in diesem lang beforschten System sind die Signale, die zum Eintritt der SZ in die Differenzierung führen noch weitgehend unklar. Letztlich ist sogar unklar, ob dieses System ebenfalls einem so großen Differenzierungsdruck wie die Hämatopoese ausgesetzt ist, oder ob es mit weniger oder keiner Selbsterneuerung auskommt. Immerhin sind einige der proangiogenetischen Schlüssel-Faktoren bekannt, beispielsweise das VEGF. Dieser Faktor bewirkt primär oder sekundär die Mobilisierung der endothelialen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark [32].

#### 1.1.4.1 Die Regulation der endothelialen Stammzelle

Auch hier handelt es sich wieder um ein komplexes Zusammenspiel mannigfaltiger Komponenten. Einige Einzelkomponenten sind in der Literatur bereits beschrieben: Gut umschrieben sind die für die Angiogenese relevanten Integrine, deren Expressionsmuster neben den Adhäsionsfunktionen auch andere synergistische Effekte vermitteln und in verschiedenen Entwicklungsphasen von unterschiedlicher Bedeutung zu sein scheinen. Während der Embryonalphase wechselt ständig die Zusammensetzung der exprimierten Integrine. Sie sind vor allem für den Informationsfluss zwischen EZ und extrazellulärer Matrix (EZM), sowie für den Zell-Zell-Kontakt wichtig. Um ein Aussprossen und Längenwachstum zu erreichen, müssen die Zellen untereinander in Kontakt treten. Hier dienen Oberflächenrezeptoren wie Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (PECAM-1/CD31) und Vascular Endothelial Cadherin (VE-Cadherin) als Vermittler. VE-Cadherin wird fast nur auf EZ exprimiert und vermittelt die Zell-Zell-Adhäsion über einen Calcium-abhängigen Mechanismus. Reift ein Gefäß, werden zunehmend festere Zell-Zell-Verbindungen wie gap junctions oder tight junctions eingegangen, Anzahl und Form hängen wiederum von der Art des Gefäßbettes ab. Für die Migration von Endothelzellen an den Ort der Angiogenese sind ganze Komplexe aus Integrinen, Metalloproteinasen und Plasminogenaktivatoren nötig, die in einem komplexen Zusammenspiel die EZ durch das Gewebe wandern lassen. Wandert eine EZ in ein Gewebe ein, so finden wiederholt Zyklen statt, in denen es zu Integrin-Extrazelluläre-Matrix-Bindungen, sowie Ansammlung und Auseinanderweichen cytoskeletaler Elemente kommt. So wird der EZ ein Weg durch das Gewebe an den Ort der Angiogenese gebahnt. Wahrscheinlich spielt auch Plasminogen eine bedeutsame Rolle für die Migration der EZ, dadurch, daß es Metalloproteinasen der Extrazellulären-Matrix aktiviert und gleichzeitig zur Freisetzung von Peptiden führt, welche pro- und antiangiogenetisch wirksam sind. EZ sind auch nicht alle gleich aufgebaut,

was ihre Oberflächenmarker-Expression anbelangt. Vielmehr hängt es vom jeweiligen Gewebetyp ab, in dem sich die EZ befindet. Beispielsweise wird auf EZ von Mäusen in Milzvenulen und postkapillären Gefäßen Lu-ECAM-1 (Lung-specific Endothelial Cell Adhesion Molecule) exprimiert, während auf EZ der Venulen von Peyerschen Plaques und des Dünndarms Mad-CAM-1 (Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1) zu finden ist [33]. Der für die Gerinnung wichtige von-Willebrand-Faktor (vWF) wird unterschiedlich stark je nach Gefäßtyp exprimiert [34]. Es wird also deutlich, daß auch das endotheliale System in sich heterogen ist.

#### 1.1.4.2 Pro- und antiangiogenetische Faktoren

Inzwischen sind viele pro- und antiangiogenetisch wirksame Faktoren bekannt. Der wohl am besten erforschte ist der VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). In der physiologischen Angiogenese und in der Embryonalphase kommt diesem Zytokin entscheidende Bedeutung zu. Aus der Inaktivierung des VEGF-Gens resultiert früher embryonaler Tod. Es existieren drei Isoformen: VEGF, VEGF-B und VEGF-C. Die Endothelzellen binden den VEGF an Oberflächenrezeptoren. Es handelt sich um Tyrosinkinase wie VEGFR-1/flt-1 für VEGF, VEGFR-2/flk-1 für VEGF und VEGFR-3 für VEGF-C, wobei letzterer nur auf EZ zu finden ist, welche Venen oder Lymphgefäße auskleiden. Alle VEGF-Typen bewirken eine Autophosphorylation des Rezeptors und beeinflussen so Replikation und Migration von Endothelzellen. Wichtigster Stimulus für die Ausschüttung von VEGF ist Hypoxie, unter normoxischen Bedingungen wird die Ausschüttung gehemmt. Unreife Gefäße hängen von VEGF ab, da es auch eine antiapoptotische Wirkung hat, reife Gefäße hingegen benötigen nicht mehr diesen Antiapoptoseschutz. Besonders Tumorgefäße, welche sich in ständigem Umbau befinden, sind VEGF abhängig (siehe Abschnitt 1.2.2). Sogar Therapieansätze mit Anti-VEGF-Antikörpern zeigten Erfolge [35].

Zwei weitere wichtige Faktoren sind Angiopoietin-1 und -2. Ihre Rezeptoren sind tie-1 (Tyrosinkinase mit Immunglobulin- und Epidermalen Wachstumsfaktor-Homologie) und tie-2/tek (Tunica interna Endothelzell-Kinase). Mutationen im tie-2- oder Angiopoietin-1-Gen führen zu Abnormalitäten des Herzens und der Gefäße mit nur unzureichender Wandstärke [36]. Hieraus zieht man die Schlussfolgerung, daß Angiopoietin-1 Endothelzellen stimuliert, damit diese bestimmte Wachstumsfaktoren bilden, welche wiederum im umliegenden Mesenchym die Bildung und Anlagerung von Pericyten und glatten Muskelzellen an die Gefäßwand stimulieren. Tie-2 scheint nicht nur ein wichtiger Faktor während der physiologischen Angiogenese zu sein, sondern hat auch Einfluß auf das Fließgleichgewicht der hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark. Des Weiteren wird der Rezeptor nicht wie bisher angenommen nur in Tumorgefäßen überexprimiert,

sondern auch in Tumorstromazellen (Magencarcinom, Mammacarcinom, Gliom). Aus dieser Erkenntnis könnten sich neue Therapieansätze ergeben [128].

Auch die Angiogenese hängt stark von Einflüssen der lokalen Umgebung ab (Mikroenvironment, Extrazelluläre Matrix, siehe Abschnitt 1.1.1.2). Der regulative Effekt der Extrazellulären Matrix auf die Entwicklung von Endothelzellen wird besonders gut durch ein Experiment belegt [37]. Es wurde gezeigt, daß Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs), aus der Nabelschnur gewonnene Endothelzellen, welche meist für in-vitro-Versuche an Endothelzellen herangezogen werden, wenn sie auf Typ I Kollagen beschichteten, flachen Oberflächen unter Stimulation mit Transforming-Growth-Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) gezogen werden, als einzellige Schicht wachsen. Unter gleicher Stimulation mit TGF- $\beta$  in einem Kollagen Typ I-Gel formen sie hingegen kapillarenähnliche Gebilde. Die auf den Zelloberflächen exprimierten Integrine spielen dabei eine entscheidende Rolle. Je nach Entwicklungsstadium werden unterschiedliche Integrine in bestimmter Kombination und Konzentration exprimiert.

Aussprossung und Längenwachstum wird durch Zell- zu Zell- Kontakte zwischen den EZ und durch Zell-Matrix-Einflüsse reguliert. Die EZ müssen während des Aussprossens durch das Gewebe migrieren. Hierfür wird das Gewebe durch Metalloproteinasen und Plasminogenaktivator durchlässig gemacht. In Abhängigkeit ihrer anatomischen Lokalisation besitzen EZ unterschiedliche Eigenschaften. So produzieren beispielsweise EZ der Vena saphena weniger PGI<sub>2</sub> (Prostacyclin) als solche der Arteria mammaria, ein Umstand, der für die bessere Offenheitsrate arterieller Bypässe verantwortlich sein könnte. Kultiviert man hingegen Aorten-EZ auf Extrazellulärer- Matrix der Lunge, zeigen die gewonnenen EZ lungenspezifische Marker. Dies alles zeigt, daß der Phänotyp einer EZ ähnlich wie bei der Stammzellendifferenzierung stark von der Umgebung abhängt.

## **1.2 Angiogenese und Tumorangiogenese**

### **1.2.1 Allgemeines**

Man unterscheidet zwischen Angiogenese und Vaskulogenese. Bei der Angiogenese kommt es zu einer kontinuierlichen Expansion des Gefäßbaumes durch Aussprossen von Endothelzellen (EZ) aus einem präexisten Gefäß. Bei der Vaskulogenese differenzieren Progenitorzellen zu EZ, und es kommt zur de-novo-Synthese eines Gefäßes ohne Vorhandensein präexistenter Gefäße.

Im Zentrum beider Vorgänge steht die Endothelzelle.

Das Gefäßsystem ist heutzutage ein wichtiger Ansatzpunkt der Forschung, da es der Schlüssel für die Behandlung vieler Erkrankungen ist. 1628 wurde von William Harvey erstmals die Zirkulation von

Blut beschrieben. Um 1800 etablierte Reckinghausen, daß Gefäße von Zellen besetzt sind und nicht wie bisher angenommen nur Tunnel im menschlichen Körper sind. Erst 1891 wurde durch Heidenhahn das Endothel als eigenes sekretorisches System erkannt und 1959 von Gowan als Organ mit Sekretion, Synthese, Metabolismus und immunologischen Funktionen beschrieben. Dieses Organ besteht beim Erwachsenen aus ca.  $1-6 \times 10^{13}$  Zellen, wiegt ca. 1kg und würde ausgebreitet 1-7m<sup>2</sup> Fläche bedecken. Wie schon erwähnt handelt es sich nicht nur um bloße Tunnel, welche das Gewebe durchziehen, sondern ein Organ, welches wichtige Aufgaben in der Gewebsversorgung, Durchblutungsregulation, Gerinnung und Immunabwehr einnimmt, aber auch eine Rolle bei pathologischen Vorgängen spielt, so beispielsweise bei rheumatischen Erkrankungen, Diabetes und der Metastasierung von Neoplasien. Unter normalen Umständen bleibt die Anzahl an Gefäßen im Organismus konstant, doch verschiedenste Einflüsse können zur Aktivierung der Angiogenese führen.

### **1.2.2 Physiologische Funktionen des Endothels**

Das Endothel führt zunächst einmal eine Barrierefunktion aus, die es erlaubt, Substrate in alle Körperregionen zu transportieren. Je nach Gewebetyp ist diese Barriere durch unterschiedlichen Aufbau der Basalmembran den jeweiligen Funktionen des Gewebes angepasst z.B. in Lebervenulen, Alveolen, Glomerula. Neben der bloßen Transportfunktion erfüllt das Endothel also auch wichtige Aufgaben bei der Oxygenierung, der Aufnahme von Nährstoffen und im Elektrolytstoffwechsel, um nur einige Funktionen anzuführen.

Über Mediatorstoffe, die an Rezeptoren des Endothels wirksam werden, wird die Gefäßweite reguliert, Stickstoffoxid (NO) und Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) stellen Gefäße weit, während Endothelin und Platelet-Activating-Factor (PAF) eine Engstellung verursachen. Stickstoffoxid ist in der EZ in Speichern vorhanden. PAF und PGI<sub>2</sub> werden hingegen durch Signalkaskaden in der Akutsituation synthetisiert und ausgeschüttet, sie haben nur eine kurze Halbwertszeit.

Als Auskleidung der Gefäße muß das Endothel den Blutstrom aufrechterhalten. Dies bedeutet, daß EZ auch an der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Koagulation und Fibrinolyse aktiv beteiligt sind. EZ können die Synthese von Antithrombin III (AT-III) steigern, einem Gegenspieler des Thrombins. Über Thrombomodulin, welches an Thrombin bindet, wird die Aktivität von Protein C gesteigert, welches wiederum durch (unter anderem) in EZ gebildetem Protein S in seiner Wirkung verstärkt wird. Dadurch hat das Endothel eine antithrombotische Wirkung.

Hingegen können Endothelzellen die Gerinnung auch aktivieren durch die Ausschüttung von Tissue Factor (TF), dieser führt zu verstärkter Aktivität der Gerinnungsfaktoren IX und X, welche zur intrinsischen Gerinnungskaskade gehören.

Im Rahmen der Fibrinolyse haben verschiedene Gruppen Rezeptoren für t-PA (tissue Plasminogen Activator) auf mikrovaskulärer Ebene nachgewiesen [38], so daß das Endothel in diesen kleinsten Gefäßen ebenfalls eine Rolle bei der Fibrinolyse zu spielen scheint.

In der Interaktion mit Thrombozyten nimmt die subendotheliale Schicht eine besonders wichtige Rolle ein. Durch Kontakt von Thrombozyten mit dem Subendothel, was vor allem von Willebrandfaktor (vWF) und Kollagen enthält, kommt es zur Aktivierung von vWF und zur Thrombozytenaggregation und im weiteren Verlauf zur Ausbildung eines Fibringerinnsels über die Gerinnungskaskade.

Bei Entzündungsreaktionen sind es die Endothelzellen selbst, welche in direkten Kontakt mit Leukozyten treten und schließlich eine Migration ins Gewebe vermitteln. Der Adhäsionsprozeß wird vor allem über die Familie der Selektine vermittelt. Drei Selektin-Untertypen sind bekannt: 1) das L-Selektin, welches auf Leukozyten exprimiert wird, es bindet an andere Leukozyten, Lymphepithel und entzündlich aktiviertes Endothel; 2) das P-Selektin wird beispielsweise durch Stimulation mit Thrombin auf der Oberfläche von EZ und Thrombozyten exprimiert; 3) das E-Selektin, welches nur auf aktivierten Leukozyten und EZ vorhanden ist. Entscheidend für die Kontaktaufnahme dieser Moleküle ist das „Abtasten“ der EZ durch Leukozyten, das sogenannte „Rolling“, sowie die Leukozyten-Adhäsion und anschließende Migration ins Gewebe [128]. Interessanterweise spielt E-Selektin auch eine kritische Rolle beim Homing endothelialer Progenitorzellen nach Gewebsischämie [127]. In der zellvermittelten Immunität nehmen die EZ eine Rolle in der Antigen-Präsentation an T-Zellen durch MHC-Klasse I und II Moleküle [39] und der Rekrutierung von Entzündungszellen ein.

Es zeigt sich also, daß das Endothel unter physiologischen Bedingungen ein komplexes Organ im Körper ist.

### **1.2.3 Tumorangiogenese**

Die Endothel- und Angiogenese spielt eine entscheidende Rolle in vielen pathologischen Entwicklungen, wie zum Beispiel dem Wachstum von Neoplasien. Bei der Bildung von Tumoren spielt die Angiogenese eine entscheidende Rolle, da ab einer bestimmten Tumorgöße die Ernährung per diffusionem nicht mehr ausreicht [40]. Schon in den 70er-Jahren stellte Dr. Judah Folkman die Hypothese auf, daß die limitierende Größe für Tumorwachstum und Metastasierung die

Vaskularisation ist. Bis heute geht man davon aus, daß Tumoren zunächst eine avaskuläre Phase durchmachen, und die Versorgung mit Nährstoffen „per diffusionem“ passiert. Erst ab einem kritischen Tumolvolumen von 1-2 mm<sup>3</sup> kommt es dann zu einer Aktivierung der Tumorangio-genese, dem sogenannten „angiogenetischen switch“ und die Bildung von Tumorgefäßen beginnt. Ein wesentlicher Trigger hierfür ist Hypoxie. Über Hypoxie kommt es zu einer Aktivierung von VEGF (siehe Abschnitt 1.1.2.2), verbunden mit der Ausschüttung von TAF (Tumor angiogenesis factor) durch die Tumorzellen. VEGF ist nicht nur ein Promotor der Angiogenese, sondern wirkt auch stabilisierend und antiapoptotisch auf neu gebildete Gefäße, da es einen Einfluss auf die Formation von Pericyten und glatten Muskelzellen um das neu gebildete Gefäß zu haben scheint [68]. Dies führt zu einer gewissen Abhängigkeit gegenüber VEGF im Tumorgewebe, was eine höhere Nekroseneigung und Blutungsneigung in Tumoren zur Folge hat. Normalerweise sind die Endothelzellen in Gefäßen von Pericyten umgeben, die im direkten Zellkontakt zu Endothelzellen stehen und hemmend auf die Proliferation von Endothelzellen einwirken [41], somit also einen stabilisierenden Einfluß auf die Anzahl an Gefäßen haben. Tumorendothelzellen sind in der Lage, diesen hemmenden Einfluss zu umgehen, teilweise Fehlen die umgebenden Pericyten gänzlich. Auch eine Basalmembran wird an Tumorgefäßen oft nur unvollständig ausgebildet. Im Zusammenspiel von Angiopoietin-2 (siehe Abschnitt 1.1.2.2) und VEGF wurde an spontanen menschlichen Tumoren gezeigt, daß Tumorzellen in normalen, angrenzenden Gefäßen durch Ausschüttung von Angiopoietin-2 eine Apoptose von Endothelzellen bewirken können, was gleichzeitig zu einer Steigerung der Angiogenese auf Tumorseite führt, so daß das Gleichgewicht zwischen reifen und unreifen Gefäßen zur Seite der unreifen Tumorgefäße hin verschoben wird. Kommt es im Tumor zum angiogenetischen switch, so wird das Gleichgewicht von pro- und antiangiogenetischen Faktoren zu den Prohibitoren hin verschoben. Tumorzellen wirken direkt auf die Angiogenese durch Sekretion von angiogenetischen Faktoren, aber auch indirekt durch Stimulation der Ausschüttung von proangiogenetischen Faktoren, wie auch Hemmung der Sekretion von antiangiogenetischen Faktoren. Körpereigene Inhibitoren der Angiogenese sind beispielsweise Angiostatin, Thrombospondin 1 und 2 und Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). In Gliomen konnte zum Beispiel gezeigt werden, daß ein weiterer Faktor, genannt „Scatter Factor“ oder „Hepatocyte Growth Factor (SF/HGF), ähnlich wie VEGF wirkt, und daß seine Konzentration mit der Blutgefäßdichte im Gliom korreliert. Dieser Faktor beeinflusst direkt die Migration und Proliferation von Hirnendothelzellen, da diese den Scatter Factor- Rezeptor MET exprimieren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, daß durch einen spezifischen Scatter Factor Antagonisten „NK4“ das Tumorwachstum um bis zu 60% gehemmt werden kann, und die Blutgefäßdichte deutlich abnimmt [132]. Mit einem spezifischen Antikörper gegen den Scatter-Factor-Rezeptor „MET“ konnte im

Tiermodell sogar eine 95%-ige Hemmung des Tumorwachstums erreicht werden. Nach Einsetzen der angiogenen Kaskade kommt es zur Auflösung der extrazellulären Matrix und vaskulären Basalmembran unter anderem durch Metalloproteinasen und Angiopoietin-2 (Ang-2). Endothelzellen wandern dann durch die eröffnete Basalmembran entlang des durch die Tumorzellen aufgebauten proangiogenetischen Gradienten in das Tumorgewebe ein und bilden Gefäß-Sprossen. Gleichzeitig kommt es zu einer Proliferation von Endothelzellen. Normalerweise werden nur gealterte Endothelzellen ersetzt, ihre Anzahl bleibt im gesunden Organismus konstant. Tritt ein Tumor in die vaskuläre Phase ein, erfolgt ein exponentielles Wachstum. Auch parakrine Effekte der Endothelzelle auf den Tumor spielen eine Rolle.

Bis vor wenigen Jahren glaubte man, daß Tumorangiogenese nur durch den beschriebenen Vorgang des Aussprossens vor sich geht. Wir gehen davon aus, daß noch ein weiterer Effekt eine wesentliche Rolle spielt, nämlich das Einwandern von angiogenen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und somit eine Vaskulogenese.

### **1.3 Die Rolle von zirkulierenden Stammzellen in der Tumorangiogenese**

Zirkulierende Stammzellen aus dem Knochenmark tragen zur Angiogenese bzw. Vaskulogenese in Tumoren bei. Dabei könnte es sich um eine spezifische zirkulierende Endotheliale Vorläuferzelle (Circulating Endothelial Progenitor Cells/ CEPs) handeln, alternativ um eine gemeinsame hämatopoetische, angiopoetische Stammzelle.

Die CEPs werden inzwischen unabhängig von ihrem Ursprung wie folgt definiert: CEPs sind von Zirkulierenden Endothelzellen/ Circulating Endothelial Cells abzugrenzen, welche nur durch Verletzungen der Gefäßwand in die Blutzirkulation gelangen, ausgereift sind und nur ein geringes Proliferationspotential haben. CEPs hingegen kommen aus dem Knochenmark und sind hochproliferativ und noch nicht ausdifferenziert. In in-vitro-Versuchen zeigte sich, daß angiogene Faktoren bei CEPs die Ausbildung von endothelialen Kolonien bewirken, während zirkulierende Endothelzellen (Circulating Endothelial Cells) nur einschichtiges Wachstum zeigten [42]. Auf CEPs wurden folgende Marker gefunden: VEGFR-2, CD 133, CXCR4, CD146, c-Kit, CD31 [124]. Solche Zellen fand man in humanem Nabelschnurblut, adultem Knochenmark, fetalen Leberzellen und nach Zytokinmobilization im peripheren Blut. In neueren Studien wurde die Quantität von CEPs im peripheren Blut von Tumorpatienten unter Therapie gemessen. Es ergab sich ein Zusammenhang von Therapieansprechen und Abfall der CEPs im peripheren Blut bei Patienten mit Prostata-Carcinom [137]. In einer anderen Studie ergab sich ein Abfall an Endothelialen Progenitorzellen im peripheren Blut nach operativer Entfernung des Tumors bei Patientinnen mit Mamma-Carcinom. Die

Arbeitsgruppe sieht darin bestätigt, daß der Tumor selbst die entsprechenden Zytokine ausschüttet und CEPs anlockt [136]. Wahrscheinlich werden sowohl HSZ als auch CEPs durch Chemotaxis der Tumorzellen „angelockt“ und tragen dann zur Angiogenese, bzw. Vaskulogenese bei.

Wie dargelegt, gibt es also viele Ebenen auf denen die Angiogenese im Organismus beeinflusst wird. Das Fließgleichgewicht zwischen pro- und antiangiogenetischen Faktoren ist im Tumor zur proangiogenetischen Seite hin verschoben. In dieser Arbeit soll das Augenmerk auf die Rolle von aus dem Knochenmark stammenden Vorläuferzellen bei der Tumorangio-genese gerichtet sein.

## 2 Fragestellung

Die Angiogenese in Tumoren ist ein Forschungsgebiet von hohem Interesse, da man sich aus dem Verständnis ihrer Regulationswege Optionen in der Hämatologie/Onkologie erhofft. Des Weiteren ist immer noch unklar, inwieweit Stammzellen aus dem KM in diesen Prozeß involviert sind. Die Möglichkeit, daß SZ aus dem Knochenmark im Tumor zur Gefäßbildung beitragen, ist insofern von Bedeutung, da eine Manipulation dieser Zellen auf genetischer Ebene zu antiangiogenetischen Effekten ausgenutzt werden könnte.

Diese Dissertationsarbeit befasst sich mit den Fragen, ob endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark sowohl an der Tumorangiogenese beteiligt sind, ob Zellen aus dem KM am Tumorstroma-Aufbau beteiligt sind und ob transplantierte Zellen nach einer Knochenmarktransplantation zur Tumorangiogenese/-vaskulogenese beitragen.

Bisher wird davon ausgegangen, daß in Tumoren im Wesentlichen eine Angiogenese, also ein Aussprossen von benachbarten EZ in den Tumor hinein stattfindet. Wenn Vorläuferzellen aus dem KM in den Tumor einwandern und dort zu einer Gefäßneubildung beitragen würden, dann ist jedoch auch von einer Vaskulogenese auszugehen.

Folgende Fragen sind zu beantworten:

- 1- Findet in Tumoren eine Angiogenese oder eine Vaskulogenese statt?
- 2- Sind Vorläuferzellen aus dem KM als Endothelzellen in Tumorgefäßen zu finden?
- 3- Sind Vorläuferzellen aus dem KM darüber hinaus im Tumorstroma zu finden?
- 4- Spielen transplantierte Vorläuferzellen nach erfolgreicher Repopulation nach einer Knochenmarktransplantation eine Rolle bei der Tumorangiogenese?

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden folgende Experimente vorgenommen:

1- Zunächst wurden Tumoren mit weiblichen und männlichen Geschlechtsmerkmalen subkutan in den Nacken von Balb/c-Mäusen des gegenteiligen Geschlechts implantiert. Da die Tumorzellen später anhand ihres Geschlechtsmerkmals (X- bzw. Y-Chromosom) mit der FISH-Färbung identifiziert werden sollten, war es notwendig, daß Versuchstier und Tumorzellen gegenteilige Geschlechtsmerkmale aufwiesen. Bei den verwendeten Zelllinien mit weiblichen Geschlechtsmerkmalen handelt es sich um JC, ein Mamma-Adenocarcinom, NMU, ein Bronchialcarcinom und WEHI 164, ein Fibrosarkom; VLM sind Zellen eines Embryonalen Carcinoms, welche männliche Geschlechtsmerkmale exprimieren. Aus der jeweiligen Maus in den

Tumor eingewanderte Zellen wurden mittels FISH-Färbung der Geschlechtschromosomen nachgewiesen.

2- In einem zweiten experimentellen Versuchsaufbau wurden zunächst weibliche Balb/c-Mäuse myeloablativ bestrahlt und anschließend mit männlichem KM transplantiert, so daß ein kompletter hämatopoetischer Chimerismus entstand (männliche Hämatopoese in weiblichen Tieren). Nach drei Wochen wurden diesen Tieren weibliche Tumorzellen subcutan in den Nacken implantiert. Nach drei Wochen Tumorzellwachstum wurden die Mäuse getötet, und die Tumoren und das KM der Mäuse entnommen. Die Tumoren wurden mittels FISH-Färbung und Immunhistochemie auf das Vorliegen von männlichen CD31 positiven Endothelzellen in Tumorgefäßen untersucht. Das KM der Tiere wurde mit der Light Cycler Methode auf das Vorliegen eines Chimerismus (männliche KM-Zellen in weiblichen Tieren) überprüft.

3- Ein dritter experimenteller Versuchsaufbau diente dem Ausschluß der Möglichkeit, daß Stammzellen aus einem anderen Pool als dem KM in die Tumoren einwandern. Hierzu wurden männliche Balb/c-Mäuse myeloablativ bestrahlt und ihnen wurde weibliches KM transplantiert. Nach drei Wochen wurden weibliche Tumorzelllinien subkutan in den Nacken der Tiere implantiert. Jeweils drei Wochen nach Tumorimplantation wurden die Tiere getötet und das KM und die Tumoren entnommen. Die Tumoren wurden mittels FISH-Färbung und Immunhistochemie auf das Vorliegen von männlichen CD31 positiven Endothelzellen in Tumorgefäßen untersucht. Das KM wurde ebenfalls mittels PCR auf das Vorliegen eines hämatopoetischen Chimerismus (weibliche Hämatopoese in männlichen Tieren) überprüft.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Technische Geräte

Becton/Dickinson	Durchflußzytometer
Biometra	Gelkammer
Carl Zeiss	Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioskop
Eppendorf	Kühlzentrifuge, Photometer, Thermomixer
Gelaire	Bench
GTL	Wasserbad
Heraeus	Brutschrank, Trockenschrank
Hybaid	PCR-Gerät
Ihi/Metasystems	Kamera (Fluoreszenz)/Software
Julabo	Schüttelwasserbad
Knick	pH-Meter
Märzhäuser	Koordinatensystem und Software
MS2	Minishaker
Phase/cell cam color digital control	Kamera (Durchlicht)/Software
Roche	Light cyclers
Sanoclav	Autoklav
Shandon	Cryotom, Cytozentrifuge
Scaltec	Laborwaage
Störktronic	Heizplatte
TLD/LiF	Dosimeter

#### 3.1.2 Labormaterial

Gebrauchswaren wurden in der Regel von der Firma Omnilab, Hassa und Neolab, die die Produkte der meisten Firmen betreiben, bezogen.

Eppendorf	Pipetten und Spitzen 10µl, 100µl, 1000µl Reaktionsgefäße 0,5ml, 1,5ml, 2ml
Greiner, Sarstedt, Falcon	Plastikwaren, Pipetten 5ml, 10ml, 50ml
Marabu	Fixogum
Millipore	Einmalfilter
Nunc	Einfrierröhrchen, Zellkulturflaschen Nunclon

	surface 50ml, 200ml
Schütt, Menzel	Objektträger, Deckgläschen

### 3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Apotheke der Universität Schleswig-Holstein	Eosin-Lösung, Ethanol, Giemsa-Lösung, Hämatoxylin-Lösung nach P.Mayer, Isopropyl-Alkohol, May-Grünwald-Lösung, Salzsäure, Wasserstoffperoxid
Biorad	Resin
Böhringer-Mannheim	4',6-Diamidine-2'-phenylindoldihydrochlorid (DAPI)
Dako	DAB-Substrat-Chromogen Lösung, Imidazol-HCl-Puffer, Streptavidin HRP
Gibco	Fötale Kälberserum (FKS)
Merck	Aceton, Di-Natrium-Hydrogenphosphat, Eisessig, Kaliumchlorid, Kaliumhydrogenphosphat, Methanol, Natriumchlorid, Natrium-Di-Hydrogenphosphat, Natronlauge, Paraformaldehyd, Tri-Natrium-Citrat-Dihydrat
Select	Aqua Spüllösung Delta
Sigma	Rinderserumalbumin (BSA), Formamid, Propidiumiodid

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Biorad (München), Gibco/Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Hamburg), Sigma (Taufkirchen) und Roth (Karlsruhe) mit dem Reinheitsgrad „pro analysis“ bezogen.

### 3.1.4 Zellkulturmedien, Lösungen und Puffer

90%iges RPMI 1640 Kulturmedium, Gibco	2mM L-Glutamin, 10mM HEPES-Puffer, 1mM Natrium Pyruvat, 4,5g/l Glucose, 1,5g/l Natrium Bicarbonat und 10% Fetales Kälberserum (FKS)
90%iges D-MEM Kulturmedium, Gibco	2mM L-Glutamin, 10mM HEPES-Puffer,

	2-Mercaptoethanol, 10% FKS
20X SSC	3M NaCl, 0,3M Natriumcitrat (pH 7,0) auf 1l Aqua dest; für die FISH-Färbung wird eine 1:10 mit Aqua dest verdünnte Gebrauchslösung verwendet
10X PBS	78,9g NaCl; 21,4g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O; 2,2g KCl; 2,7g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> auf 1l Aqua dest (pH 7,3), für die Immunhistochemie wird eine mit Aqua dest 1:10 verdünnte Lösung verwendet
Proteinase-K-Reaktionspuffer	20mM Tris/HCl; 2mM Calciumchlorid (pH 8,0)
50X Propidiumiodid-Lösung	2mg/ml Propidiumiodid in 38mM NaCitrat-Lösung (pH 7,0) und 100mg/ml RNase-A-Lösung, für die Durchflußzytometrie wird eine 1:50 Verdünnung der Lösung und eine 1:400 Verdünnung der RNase-A-Lösung in 1X PBS (pH 7,4) verwendet
50% Formamid-Lösung	Deionisierung von 100ml Formamid mit 5g Resin für 1h; nach Abfiltern des Resins, Aufteilung in 2 Küvetten mit je 30ml Formamid, 6ml 20X SSC und 24ml Aqua dest; Einstellung mit 5M HCl auf pH 7,0.

### 3.1.5 Enzyme und Primer

RNase	Böhringer
Proteinase-K	Sigma
GAPDH forw: AGT ATG ATG ACA TCA AGA AGG T	Tib Molbiol
GAPDH rev: ATG GTA TTC AAG AGA GTA GGG	Tib Molbiol
Y6 forw : CTA AGC CAT GTA CCA CCT	Tib Molbiol
Y6 rev : CTC TCT TTA TCA ATT TTT TCT TG	Tib Molbiol

### 3.1.6 Kits

LC- Fast-Start-DNA-Master-Sybr-Green-I	Roche
Nucleospin® Blood	Macherey-Nagel
Qiagen Blood & Cell Culture DNA Kit	Qiagen

### 3.1.7 Antikörper und Hybridisierungssonden

CD31	BD Pharmingen
CD 45.2	BD Pharmingen
CD3 und Sekundärantikörper biotinylierter Mouse-Anti-Hamster-Cocktail	BD Pharmingen
CD19 und Sekundärantikörper biotinyliertes polyklonales Anti-Rat-Ig	BD Pharmingen
MOMA-2	Serotec
Hybridisierungs-Sonden X und Y	Vysis

### 3.1.8 Zelllinien

**JC:** Ein Mamma Adenocarcinom, gewonnen nach spontanem Wachstum in einer weiblichen Balb/c Ros-Maus.

**NMU:** Ein Bronchialcarcinom, gewonnen aus weiblichen Sprague-Dawley-Ratten nach Tumor-Induktion durch N-Nitroso-Methylurea-Injektion.

**WEHI 164:** Ist ein Fibrosarkom, gewonnen aus weiblichen Balb/c-Mäusen nach Tumor-Induktion durch Injektion von Methylcholanthren. Im Folgenden wird die Zelllinie kurz als „WEHI“ bezeichnet. Die oben genannten Zelllinien wurden bezogen von der American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA.

**VLM:** Hier handelt es sich um SV 40 transformierte Embryozellen aus männlichen Balb/c-Mäusen, die zum Wachstum eines embryonalen Carcinoms führen. Diese Zelllinie wurde bezogen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig.

### 3.1.9 Mausstämme

Es wurden Balb/c- Mäuse, 61- 65 Tage alt, verwendet; Tierantrag 12/1e/99

Gesamtanzahl: 30 weibliche Tiere, 12 männliche Tiere

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Tumoren

#### 3.2.1.1 Zellkultur

Sämtliche verwendete Zelllinien wachsen adhärent. Für die Zelllinien JC und WEHI wurde jeweils 90%iges RPMI 1640-Medium verwendet, während für die Zelllinien VLM und NMU 90%iges MEM-Medium verwendet wurde. Als Zusatz wurden jeweils 10% FKS und 1ml Penicillin zum Medium hinzugefügt. Die Zellkulturen wurden 2-3mal wöchentlich gesplittet, indem zunächst das alte Medium abgesaugt wurde und anschließend 10ml einer 1:10 verdünnten Trypsin-Lösung in Natriumchlorid für 10min auf die Zellen gegeben wurde. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 5ml Medium gestoppt, und die Zellen durch leichtes Beklopfen des Flaschenbodens gelöst. Nun wurden die Zellen in 15ml Medium aufgenommen und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde für 5min bei 1100rpm zentrifugiert, um ein Zellpellet zu erhalten. Zum Aufreinigen der Zellen wurde dieser Schritt weitere zwei Male unter Verwerfen des Überstandes wiederholt. Nach Bestimmung der Zellzahl in der Neugebauer-Zählkammer unter Vitalfärbung mit Trypanblau wurden die Zellen jeweils auf drei neue Zellkulturflaschen verteilt und weiter bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zur weiteren Verwendung wurde ein Teil der Zellen in Einfriermedium gegeben und in flüssigem Stickstoff konserviert.

Die Ernte der Tumorzellen zur Injektion in die Versuchstiere erfolgte zwischen Passage 6 und 10.

### 3.2.1.2 Anfertigung von Zytospinpräparaten

Hierzu wurde eine Zellsuspension mit ca.  $2 \times 10^4$  Zellen gelöst in 1X PBS auf Trichterfilter gegeben und anschließend in der Zyto-Zentrifuge auf Zyto-Objektträger zentrifugiert und luftgetrocknet.

### 3.2.1.3 Geschlechtsbestimmung mittels FISH

Um sicher zu stellen, daß die Tumorzelllinien das beschriebene Geschlechtsmerkmal aufweisen, wurden aus Zellsuspension von WEHI 164, VLM, JC und NMU Zytospinpräparate (siehe hierzu Abschnitt 3.2.1.2) angefertigt. Diese wurden nach der FISH-Methode wie unter 3.2.7.3 beschrieben gefärbt.

### 3.2.1.4 Durchflußzytometrie

Beim Färben der Cytospins der Zelllinie VLM fiel auf, daß ein Zellkern mehrere Y-Signale enthielt. Um eine vorhandene Ploidie nachzuweisen, wurden diese Zellen mittels Durchflußzytometrie oder auch FACS (Fluorescence Activated Cell Analyser) weiter charakterisiert. FACS ist eine Methode, bei der fluoreszenzmarkierte Zellen in einer Flüssigkeitssäule einen Laserstrahl passieren. Die Lichtstreuung und Fluoreszenzintensität in jedem einzelnen Tropfen, der den Laser passiert, werden gemessen. Es können sowohl Oberflächenantigene als auch intrazelluläre Marker mit dieser Methode dargestellt werden. Zur Analyse wird die in einem Probenröhrchen vorgegebene Zellsuspension über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Messküvette eingegeben. Beim Eintreten in die Messkammer werden die Zellen beschleunigt und hintereinander gereiht. Die Zellen werden nun mit einem Argon-Laser bestrahlt, welcher Licht mit einer Wellenlänge von 488nm emittiert. Der Fluoreszenzfarbstoff in oder auf den Zellen emittiert nun Licht in einem für diesen Farbstoff typischen Spektrum. Lichtstreuung und Fluoreszenzintensität können nun bezogen auf die Zellzahl analysiert werden. Da es in unserem Fall um die Darstellung der DNA-Menge pro Zelle ging, wurde ein Interkalator als Fluoreszenzfarbstoff verwendet (Propidiumiodid : 2,7-Diamino-9-Phenyl-10-(Diethylaminopropyl)-Phenanthridiniumiodid), welcher sich sequenzunspezifisch zwischen die Basen der DNA schiebt und nicht kovalente Bindungen eingeht. Die Intensität der Fluoreszenz hängt vom DNA-Gehalt der Zelle und von der Zellzyklusphase, in der sie sich befindet, ab. Die Zellen in der Suspension werden nach der Messung prozentual in die verschiedenen Zellzyklusphasen (G1, S, G2/M) aufgeteilt, indem in einem Diagramm Fluoreszenzintensität (Abszisse) gegen die absolute Anzahl der Zellen mit der entsprechenden Fluoreszenzeigenschaft aufgetragen wird.

Als Vergleichswert für einen normo-ploiden Chromosomensatz wurde hier eine aus Mäuseblut gewonnene Zellsuspension verwendet. Die Intensität der Fluoreszenz in der VLM-Tumorzellsuspension konnte so mit der von normalem Mäuseblut verglichen werden. Darüber konnte man auf den Gesamt-DNA-Gehalt der Zellen schließen.

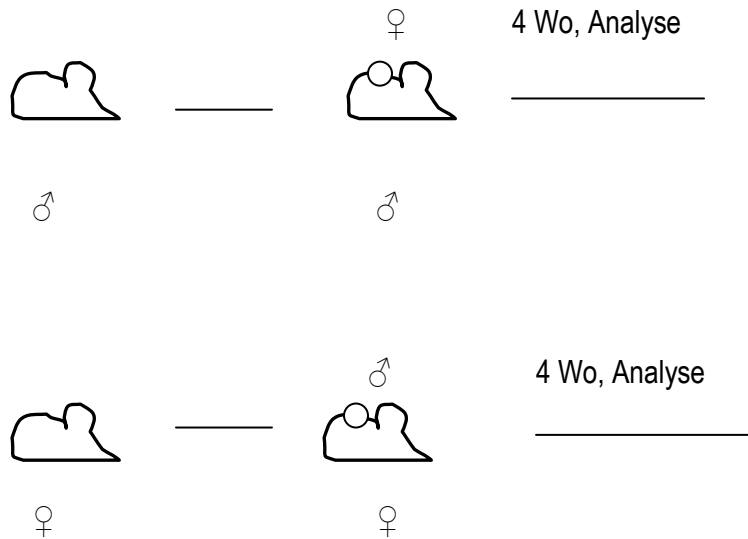
Zur Vorbereitung wurden die Zellen in 1X PBS gewaschen und anschließend in 0,5ml 1X PBS aufgenommen. Unter Vortexen tropfte man langsam 3ml EtOH 99,8%ig zu. Dies diente der Fixierung der Zellen. Die Zellen wurden mindestens 15min bei 4°C aufbewahrt (Die Zellen konnten nach diesem Schritt auch bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert werden). Anschließend wurde die Zellsuspension für 5min bei 4°C unter 1500rpm abzentrifugiert und erneut in 1X PBS gewaschen. Das erhaltene Zellpellet wurde in 0,5-1ml einer Propidiumiodid/RNase A-Lösung aufgenommen und für 30min bei 37°C ohne Lichteinfall inkubiert (genaue Angaben zur Konzentration der Lösung siehe Abschnitt 2.4). Anschließend wurde die Analyse am Durchflußzytometer durchgeführt.

### **3.2.2 Tierexperimente**

Die Experimente fanden nach Genehmigung zur Verwendung der entsprechenden Mausstämmen gemäß Tierantrag 12/1e/99 statt.

Der für die Transplantationsexperimente verwendete Mausstamm war die Balb/c-Maus. Bezogen wurden die Tiere im Alter von 6-8 Wochen von Charles River, Deutschland. Sie wurden artgerecht und pathogenfrei in der Tierhaltung der Universität zu Lübeck gepflegt. Zur Fütterung wurde konventionelles Futter verwendet.

### 3.2.3 Tumorimplantation



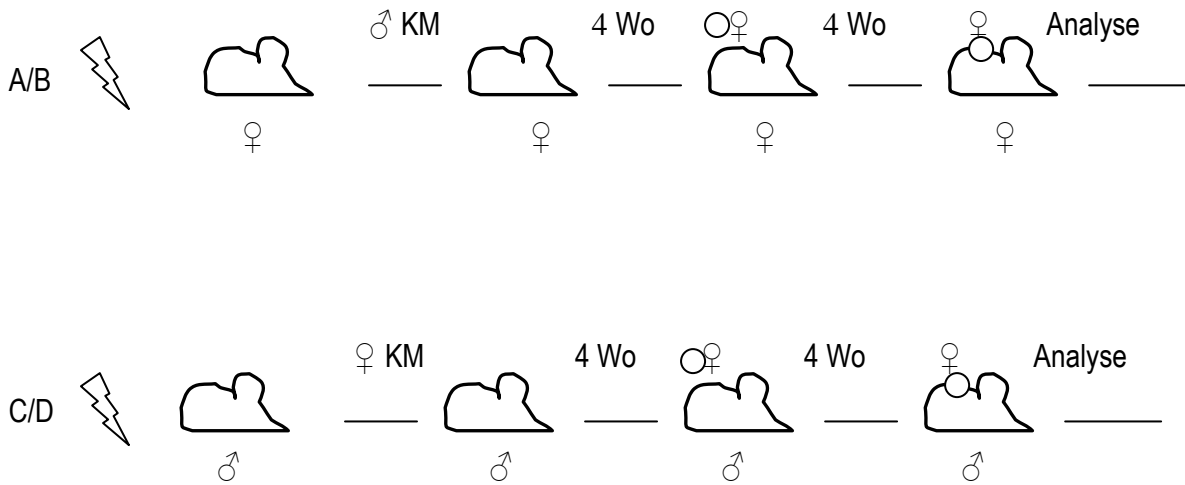
**Abbildung 1: Schematische Darstellung des ersten Versuchsaufbaus: Es wurden Tumoren mit gegenteiligem Geschlecht in den Nacken von Mäusen injiziert. Nach vierwöchigem Wachstum (4 Wo) erfolgte die Analyse.**

In einem ersten Versuch wurden die weiblichen Tumorzelllinien WEHI 164, JC und NMU in männliche Versuchstiere implantiert. Des Weiteren wurde die männliche Zelllinie VLM in weibliche Tiere implantiert. Hierzu wurden die Zellen in Passage 6-10 geerntet. Zunächst wurden die Zellen trypsinisiert, wie unter Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben und in 1X PBS aufgenommen. Nach dreimaligem Waschen und abzentrifugieren wurde in der Neugebauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt, und eine Zellzahl von  $4 \times 10^6$  Zellen pro Versuchstier eingestellt. Anschließend wurde die angegebene Zellzahl je in 1ml 1X PBS aufgenommen und den Versuchstieren subcutan in den Nacken injiziert. Nach 3-4 Wochen wurden die Tiere im Gastopf mit Kohlendioxid getötet und die Tumoren entnommen. Die Tumoren wurden zerkleinert, in Einfriermedium eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden sie bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

Durch die unter Abschnitt 3.2.1.4 beschriebene Polyploidie der Zelllinie VLM ergab sich, daß diese Zelllinie aus der Auswertung genommen werden musste. Unserer Hypothese zufolge erwarteten wir ein Vorhandensein von weiblichen Zellen in dem ansonsten männlichen Tumorgewebe. Da die VLM-Zelle mehr als einen Zellkern aufwies und somit zu mehr als einem X-Chromosom-Signal in den männlichen VLM-Zellkernen pro Zelle führte, konnten in den untersuchten Tumoren mittels FISH-Färbung weibliche Zellen nicht eindeutig von männlichen Zellen unterschieden werden.

Eine weitere Schwierigkeit ergab sich bei der Verwendung der Zelllinie NMU, da sie trotz mehrerer Versuche und auch unter Verdreifachung der injizierten Zellzahl nicht zu einem Tumorwachstum in den Versuchstieren führte. Daher wurde auch auf die Verwendung dieser Zelllinie im weiteren Verlauf verzichtet.

### 3.2.4 Transplantationsmodell



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Transplantationsmodells: Nach Bestrahlung erfolgte die Knochenmarktransplantation (KM), anschließend eine KM-Rekonstitutionsphase, „Engraftment“, über vier Wochen (4 Wo). Danach wurden Tumoren in den Nacken der Tiere injiziert, nach vier Wochen Wachstum wurden die Tumoren und das Knochenmark der Tiere analysiert.**

Im Transplantationsmodell wurden die weiblichen Tumorzelllinien WEHI 164 und JC verwendet. Es gliedert sich in die Bestrahlung der Tiere, anschließende Knochenmarktransplantation, Tumorumplantation und abschließende Entnahme von Tumoren und Knochenmark der Versuchstiere zur Analyse. Die Abschnitte werden im Folgenden einzeln beschrieben.

Verwendet wurden insgesamt 15 Tiere.

Als Gruppe A werden im Folgenden bezeichnet: Weibliche Balb/c-Mäuse nach Transplantation von männlichem Knochenmark und Implantation der weiblichen Tumorzelllinie WEHI.

Als Gruppe B werden im Folgenden bezeichnet: Weibliche Balb/c-Mäuse nach Transplantation von männlichem Knochenmark und Implantation der weiblichen Tumorzelllinie JC.

Als Gruppe C werden im Folgenden bezeichnet: Männliche Balb/c-Mäuse nach Transplantation von weiblichem Knochenmark und Implantation der weiblichen Tumorzelllinie WEHI.

Als Gruppe D werden im Folgenden bezeichnet: Männliche Balb/c-Mäuse nach Transplantation von weiblichem Knochenmark und Implantation der weiblichen Tumorzelllinie JC.

#### 3.2.4.1 Radiatio

Die Bestrahlung der Versuchstiere wurde mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Strahlentherapie der Universität zu Lübeck durchgeführt. Verwendet wurde ein Beschleuniger vom Typ Mevatron 74 (Siemens). Zunächst erfolgte die Bestrahlung der Versuchstiere (insgesamt 28 Weibchen, 4 Männchen) in einem  $1225\text{cm}^2$  Bestrahlungsfeld mit  $800\text{cGy}$  einer  $10\text{MV}$  Bremsstrahlung. Die Bestrahlung wurde im Abstand von drei Stunden wiederholt.

#### 3.2.4.2 Prinzip der Knochenmark-Transplantation

Als Knochenmark-Spender dienten männliche und weibliche Balb/c-Mäuse (insgesamt 7 Männchen und 1 Weibchen). Das Knochenmark einer Maus reichte für die Transplantation von 4 Tieren aus. Zur Gewinnung des Knochenmarks wurden die Tiere zunächst per Genickbruch getötet. Die Femor- und Tibiaknochen wurden freipräpariert und entnommen. Die Epiphysen der Knochen wurden abgetrennt. Die Kanüle einer mit eisgekühlter  $1\text{X PBS}$ -Lösung gefüllten Spritze wurde in die Markhöhle gesteckt und das Knochenmark in ein Falcon-Röhrchen gespült. Die Zellen wurden im Labor  $4\text{min}$  bei  $4^\circ\text{C}$  und mit  $1500\text{rpm}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Zellpellet wurde mit  $1\text{X PBS}$  resuspendiert, dieser Vorgang wurde wiederholt, bis sich eine von Zelltrümmern freie Einzelzellsuspension ergab. Durch Zählen in der Neugebauer Kammer wurde die Zellsuspension so aufgeteilt, daß sich ca.  $20 \times 10^6$  Zellen pro Tier ergaben. Frühestens zwei Stunden nach der zweiten Bestrahlung wurden die Zellen transplantiert, indem sie in die Schwanzvene der Tiere injiziert wurden.

#### 3.2.4.3 Tumorimplantation

Drei Wochen nach erfolgter Knochenmark-Transplantation wurde die Tumoringektion wie unter Abschnitt 3.2.3 beschrieben vorgenommen.

#### 3.2.4.4 Entnahme der Tumoren und Entnahme von Knochenmark für die Messung im Light Cycler

4 Wochen nach Injektion der Tumoren wurden die Mäuse im Gastopf getötet und die Tumoren sowie das Knochenmark der Versuchstiere entnommen. Die Entnahme und Aufbereitung des

Knochenmarks erfolgte wie unter Abschnitt 3.2.4.2 beschrieben. Die Entnahme der Tumoren erfolgte wie unter Abschnitt 3.2.3 beschrieben.

#### 3.2.4.5 DNA-Gewinnung und Konzentrationsbestimmung

Um beispielhaft zu zeigen, daß ein Engraftment, das heißt ein vollständiger Ersatz der Hämatopoese durch das transplantierte Knochenmark in den Versuchstieren stattgefunden hat, wurde von 6 Mäusen bei der Tumorentnahme gleichzeitig das Knochenmark entnommen (siehe Abschnitt 3.4.2), um daraus chromosomale DNA (cDNA) zu gewinnen. Es wurde das NucleoSpin® Blood-Kit der Firma Macherey-Nagel nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Zunächst wurden 200µl Zellsuspension mit  $5 \times 10^6$  Zellen unter Zugabe von 25µl Proteinase K und 200µl Puffer B3 lysiert. Die Proben wurden bei 70°C 10-15min inkubiert. Anschließend wurden 210µl EtOH 96-100%ig hinzugefügt. Für jede Probe wurde nun eine im Kit gelieferte Säule über einem 2ml Eppendorf-Gefäß platziert und die Proben wurden aufgetragen. Es wurde eine Minute bei 13 000rpm zentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit im Eppendorf-Gefäß wurde verworfen. Ein neues Gefäß wurde unter jeder Säule platziert und 500µl Puffer BW wurden aufgetragen und anschließend eine Minute bei 13 000rpm zentrifugiert. Das Eppendorf-Gefäß wurde abermals verworfen. Es erfolgte ein weiterer Waschritt mit 600µl Puffer B5, das weitere Vorgehen erfolgte analog zum zuvor beschriebenen Waschritt. Zum Trocknen der in der Säule enthaltenen Silikonmembran wurde nun nochmals zentrifugiert. Anschließend erfolgte das Herauslösen der aufgereinigten DNA aus der Silikonmembran, indem pro Reaktionsgefäß 100µl 70°C warmer Elutions-Puffer direkt auf die Silikonmembran aufgetragen wurden. Es wurde eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und dann jede Säule über einem frischen 1,5ml Eppendorf-Gefäß platziert und die gelöste DNA eine Minute lang bei 13 000rpm abzentrifugiert.

Durch Messung im Eppendorf-Photometer wurde die Konzentration der DNA bestimmt. Zur Nullwertbestimmung diente Wasser. Die direkte Messung der Nukleinsäuren erfolgte bei  $\lambda = 260\text{nm}$ , da hier das Absorptionsspektrum von doppel- und einzelsträngigen Nukleinsäuren liegt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte durch die Multiplikation der gemessenen Extinktion bei 260nm mit dem Verdünnungsfaktor. Als Ergebnis erhielt man die Konzentration der DNA in µg/ml.

$$C = E_{260} \times V = \text{DNA-Konzentration in } \mu\text{g/ml}$$

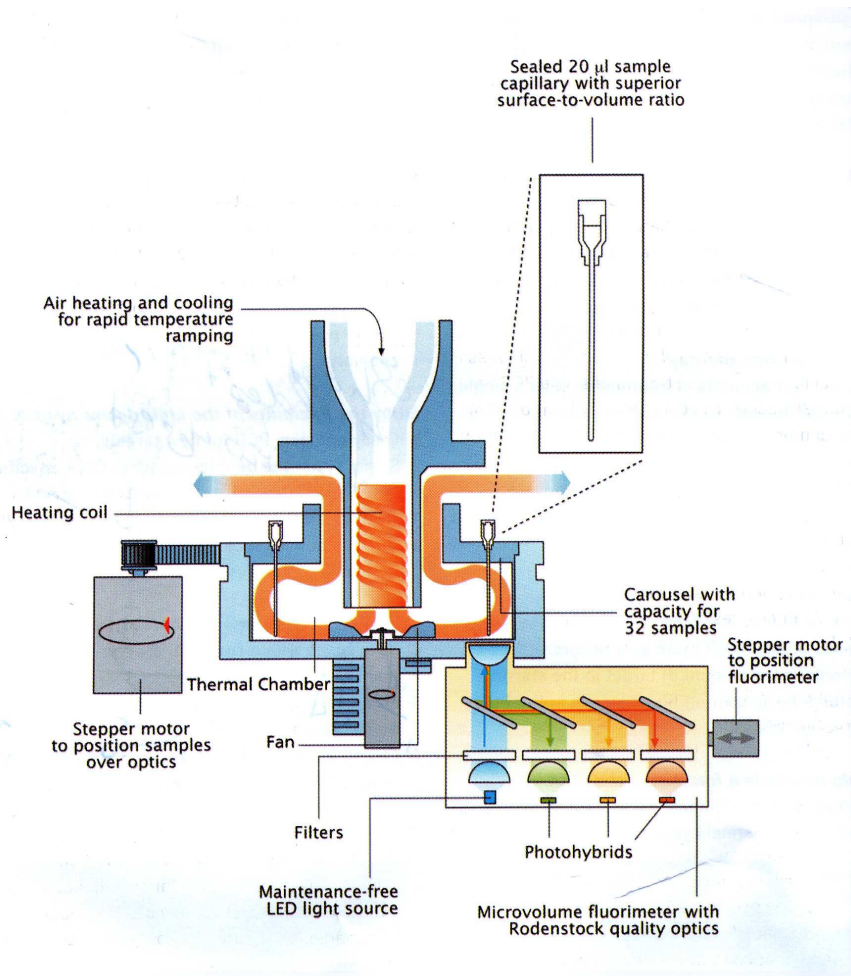
C = Konzentration der DNA

V = Verdünnungsfaktor

$E_{260}$  = gemessene Extinktion bei 260nm

Die DNA-Proben wurden mit ultra purem Wasser auf eine Konzentration von 20ng/µl eingestellt.

### 3.2.5 Relativ-quantitative Polymerase-Chain-Reaktion im Light Cycler

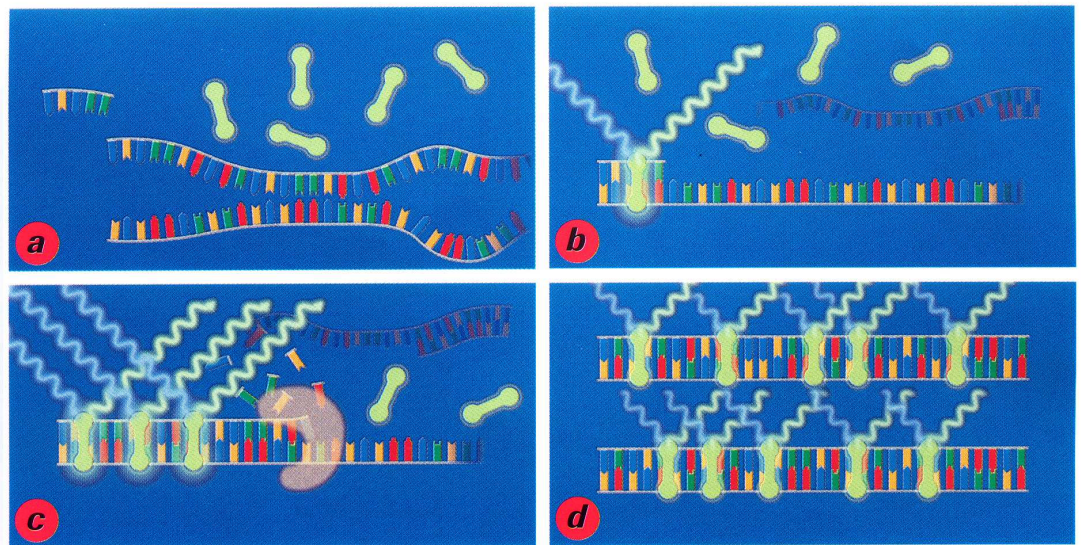


**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Light Cycler-PCR-Apparates (Erläuterung siehe Text), Quelle Betriebsanleitung des Light Cyclers, Firma Roche.**

Bei dieser Methode handelt es sich um eine relativ-quantitative PCR, die so genannte „real-time“ PCR. Das Prinzip der konventionellen PCR liegt zu Grunde. Die Proben werden zunächst durch Erhitzen denaturiert, um die DNA-Doppelstränge aufzuspalten. Nun erfolgt bei niedrigerer Temperatur die Anlagerung der Primer an die Zielsequenzen und die Synthese der angestrebten DNA-Sequenzen durch die Polymerase. Dieser Vorgang erfolgt 45 Mal und führt zu messbaren DNA-Produkten.

Das Gerät besteht im Wesentlichen aus dem die Proben enthaltenden Karussell, welches sich in einer thermischen Kammer befindet, und dem Fluorimeter. In das Probenkarussell können bis zu 32 Proben gleichzeitig eingesetzt werden. Das Volumen jeder Probe beträgt 20µl. Durch dieses geringe Volumen wird eine schnelle Erhitzung der Proben ermöglicht, und ein Zyklus dauert nur 15-20s. Jede Probe wird am Ende eines jeden Zyklus gemessen, indem das Karussell sich so dreht, daß

jede Probe exakt über dem Fluorimeter positioniert wird. Der sequenz-unabhängig bindende Farbstoff SYBR Green I, der sich an doppelsträngige DNA in den Proben anlagert, wird durch eine Lichtquelle mit der Wellenlänge von  $\lambda = 470\text{nm}$  angeregt und emittiert mit einer Wellenlänge von  $\lambda = 521\text{nm}$ . Die Intensität des emittierten Signals spiegelt die Synthese der DNA-Zielsequenzen pro Zyklus wieder und wird sofort in ein digitales Signal umgerechnet und graphisch in der zugehörigen Software dargestellt.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ablaufs der PCR: a) Denaturierung, b) Anlagerung/Annealing der Primer, c) Vermehrung der Zielsequenzen durch die Polymerase, d) quantitative Messung anhand der Emission; Quelle Betriebsanleitung des Light Cyclers, Firma Roche**

Um ein erfolgreiches Engraftment bei den zuvor bestrahlten und Knochenmark-transplantierten Tieren nachzuweisen, wurde wie folgt vorgegangen:

Um eine Standardreihe erstellen zu können, wurde zunächst das Knochenmark einer weiblichen und einer männlichen Balb/c-Maus entnommen (siehe Abschnitt 3.4.2). Aus dem gewonnenen Knochenmark wurden für eine Verdünnungsreihe folgende Ansätze hergestellt:

100% weibliche DNA

100% männliche DNA

1%, 5%, 10%, 50% männliche DNA in ultra purem Aqua dest gelöst.

Wie in der Arbeitsanleitung des LC- Fast-Start-DNA-Master-Sybr-Green-I-Kits angegeben, wurde pro Kapillare folgender Mix verwendet:

DNA	1µl (20ng/µl)
MgCl <sub>2</sub>	2,4µl (4mM)
Mix grün (enthält fast start enzym)	2µl
Primer F	2µl (10mM)
Primer R	2µl (10mM)
dH <sub>2</sub> O	10,6µl

Die Proben wurden 10min bei 95°C (Temperatur Transitionsrate 20°C/s) inkubiert, um das Fast-Start-Enzym zu aktivieren. Es folgte die Analyse im Light-Cycler mit insgesamt 45 Zyklen, die im Einzelnen folgende Schritte enthielten: Die Denaturierung für 10s bei 93°C (Temperatur Transitionsrate 20°C/s), das Primer-Annealing bei 55°C für 5s (Temperatur Transitionsrate 20°C/s) und die Polymerisation bei 72°C für 10s (Temperatur Transitionsrate 20°C/s). Anschließend wurde eine Schmelzkurve erstellt, dafür wurde zunächst auf eine Temperatur von 65°C (Temperatur Transitionsrate 20°C/s) für 15s gekühlt. Dann wurde in 0,1°C-Schritten bis zu einer maximalen Temperatur von 95°C erhitzt und die Daten für die Schmelzkurve erhoben. Im letzten Schritt wurden die Proben für 30s auf 40°C abgekühlt (Temperatur Transitionsrate 20°C/s).

Die beiden Primer wurden in getrennten Kapillaren eingesetzt.

GAP ist eine Zielsequenz, die auf jedem Chromosom vorhanden ist und somit nur den unterschiedlichen DNA-Gehalt der Proben anzeigt. Y6 ist ein Primer, der sich spezifisch an das Y-Chromosom anlagert und somit den Gehalt an männlicher DNA in den Proben widerspiegelt.

Nachdem die Standardreihe erstellt war, konnten die Proben der Versuchstiere im direkten Vergleich mit der Standardreihe gemessen werden (siehe Ergebnisse Abschnitt 4.2).

### 3.2.6 Anfertigung von Cryoschnitten

Nachdem das Cryotom und der Schneideblock ausreichend vorgekühlt wurden (-25°C), wurde überschüssiges Einfriermedium von der zu schneidenden Probe entfernt, und sie wurde in den Schneideblock eingespannt. Es wurden Schnitte von 6-12µm Dicke angefertigt. Für die angewendeten Färbemethoden eigneten sich 6µm Schnitte am besten, jedoch erwies sich vor allem die Zelllinie JC aufgrund der starken Vaskularisierung als schwer schneidbar. Darum musste hier teilweise eine Schnittdicke bis 14µm in Kauf genommen werden.

### 3.2.7 Färbungen

#### 3.2.7.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung diente als Übersichtsfärbung. Zunächst wurden die Hämatoxylin- und die Eosin-Lösung einmalig gefiltert, um auskristallisierte Partikel zu entfernen. Die Objektträger wurden für zehn Minuten in der Lösung gefärbt und anschließend für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Es folgte die Färbung mit Eosin für drei Minuten, so daß das Hämatoxylin mäßig überfärbt wurde. Die Objektträger wurden abschließend fünf Minuten in Aqua dest. gespült. Um das Färbeergebnis zu verbessern, konnte optional noch eine aufsteigende Ethanolreihe mit 70%, 96% und 100% Ethanol durchlaufen und danach mit Xylol gespült werden.

#### 3.2.7.2 Immunhistochemie: Zweck, Technik und Gewebs- und Zellspezifität

##### LSAB-Methode (Labelled-Streptavidin-Biotin-Methode)

Das Prinzip der Methode beruht auf einer enzymatisch gesteuerten Farbreaktion, die ein positives Ergebnis der Färbung anzeigt. Die an Streptavidin gekoppelte Meerettich-Peroxidase lagert sich an das Biotin, welches an den Primär- oder Sekundär-Antikörper gebunden ist, an. Als Reaktionssubstrat für die Meerettich-Peroxidase dient das zum Schluß aufgetragene DAB, welches unter einer braunen Farbreaktion verstoffwechselt wird.

Alle immunhistochemischen Färbungen wurden nach diesem Prinzip durchgeführt.

Zunächst wurden die Gefrierschnitte für 20 Minuten auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend erfolgte die Fixierung in 4°C kaltem 100%igem Aceton. Es folgte dreimaliges Waschen in 1X PBS. Für nicht biotinylierte Antikörper (CD3, MOMA-2, CD19) erfolgte nun zunächst ein Schritt, in welchem mit Serum der Tierart, aus dem der Sekundär-Antikörper gewonnen wurde, geblockt wurde. Dieser Schritt diente der Vermeidung von Fehlbindungen des Sekundär-Antikörpers gegen eventuell vorhandene Antigene im Schnitt. 200µl pro Schnitt des jeweiligen Serums wurden verwendet, für 30 Minuten inkubiert und anschließend durch Waschen mit 1X PBS entfernt. Anschließend konnte der Primär-Antikörper auf die Objektträger aufgetragen werden. Es wurden 150µl pro Objektträger verwendet. Nach 30 Minuten wurde der Antikörper durch dreimaliges Waschen in 1X PBS entfernt. Für alle nicht biotinylierten Antikörper erfolgte nun die Inkubation mit

dem Sekundär-Antikörper, 150µl pro Objektträger wurden verwendet. Nach 30 Minuten schloss sich ein weiterer Waschschrift an. Im nächsten Schritt erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase mit 3%igem Wasserstoffperoxid für 10 Minuten. Dieser Schritt diente der Vermeidung von falsch positiven Reaktionen, da das verwendete Substrat DAB auch von der endogen vorhandenen Peroxidase verstoffwechselt werden kann. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1X PBS wurde Streptavidin für 10 Minuten aufgetragen, verwendet wurden 200µl pro Objektträger. Wieder wurde im Anschluß mit 1X PBS gewaschen. Jetzt konnte das Substrat DAB aufgetragen werden. Es wurden 250µl pro Objektträger verwendet und 10 Minuten inkubiert. Bei nicht ausreichender Farbreaktion wurde der letzte Schritt wiederholt. Die Schnitte wurden dann mit Aqua dest. gespült und luftgetrocknet. Alle Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zellspezifität, Verdünnung und Lösungsmittel der verwendeten Antikörper:

CD 31: CD 31, auch PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule) genannt, ist ein 130kDa-Molekül. Der Antikörper, MEC 13.3, bindet an CD 31. PECAM-1 ist integraler Bestandteil von Zellmembranen und ist in die Zell-Zell-Adhäsion involviert. Es wird auf embryonalen und adulten Endothelzellen exprimiert, sowie schwach auf zirkulierenden Leukozyten und Thrombozyten. Biotin-konjugiertes Ratten-anti-Maus CD 31 (PECAM-1) ist ein monoklonaler Antikörper und wurde in einer 1:30-Verdünnung in 1XPBS verwendet.

CD 45.2: CD 45, Leukocyte Common Antigen, ist ein monoklonaler Antikörper, der mit Leukozyten der meisten Mausarten reagiert, das entsprechende Antigen wird auch auf der Oberfläche von Balb/c-Maus-Leukozyten präsentiert. Der Namenszusatz .2 ergab sich aus der Erkenntnis, daß der Antikörper nicht mit Leukozyten reagiert, die das CD 45.1 Alloantigen präsentieren. Dazu gehören die Mausstämme: eg, RIII, SJL/J, STS/A, DA. Dem CD 45 Antigen werden komplexe Interaktionen in der T- und B-Zell-Signaltransduktion zwischen Antigen und Rezeptor zugeschrieben. Der Antikörper ist Biotin-konjugiert und wurde in einer 1:30-Verdünnung in 1X PBS verwendet.

CD 3: 500A2 ist ein Antikörper, der mit der 25-kDa  $\epsilon$  Kette des T-Zell-Rezeptor assoziierten CD 3-Komplexes reagiert. Dieser wird auf Thymozyten und reifen T-Lymphozyten exprimiert. Gereinigter Hamster Anti-Mouse CD3 Molecular Complex Antibody wurde in einer 1:30-Verdünnung in 1X PBS verwendet, der Sekundär-Antikörper, biotinylierter Maus-Anti-Hamster-Cocktail, in einer 1: 20-Verdünnung in 1X PBS.

CD 19: Bei CD 19 handelt es sich um ein Differenzierungs-Antigen von B-Lymphozyten. Es ist ein transmembranöses 95 kDa Glycoprotein, mit welchem der 1D3 Antikörper reagiert. Das Protein wird während der Entwicklung der B-Lymphozyten von der Pro-B-Zelle bis zum reifen B-Lymphozyten exprimiert, wobei ausdifferenzierte Plasmazellen es nicht mehr exprimieren. CD 19 partizipiert an der Entwicklung, Aktivierung und Toleranzerhaltung von B-Lymphozyten, sowie an der Reifung von B-Memory-Zellen. Gereinigter Rat Anti-Mouse CD19 Monoclonal Antibody wurde in einer 1:10-Verdünnung in 1X PBS verwendet. Als Sekundär-Antikörper diente Biotin-conjugated Polyclonal Goat Anti-Rat Immunglobulin in einer 1:100-Verdünnung in 1X PBS.

MOMA-2: Dieser Antikörper reagiert mit einem intrazellulären Antigen in Maus-Makrophagen und Monozyten. Rat-Anti-Mouse-Macrophages/Monocytes-IgG wurde in einer 1:25-Verdünnung in 1X PBS verwendet.

Als Sekundär-Antikörper diente Biotin-conjugated Polyclonal Goat Anti-Rat Immunglobulin 1:100 in 1X PBS verdünnt.

Wasserstoffperoxid wurde in einer 3%igen Lösung in Aqua dest. angesetzt.

Streptavidin HRP wurde 1:300 mit 1X PBS verdünnt.

DAB Liquid Chromogen Substrate, jeweils 1 Tropfen wurde in 1ml Imidazol-HCl-Puffer pH 7,5 gelöst.

### 3.2.7.3 FISH (Fluoreszenz in Situ Hybridisierung)

Die FISH-Methode ist eine etablierte Methode des Hämatologisch-Onkologischen Labors der Universität zu Lübeck [104 Terres Bauermeister et al. 2004]. Es handelt sich hierbei um eine Färbung, die den Nachweis bestimmter DNA-Fragmente in Gewebeschnitten anhand von Sonden ermöglicht, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Die Sonden bilden hierbei mit ihren komplementären Zielsequenzen im Gewebe ein Basenpaar. Angefärbt werden Chromosomen von Zellen, die sich in der Interphase befinden. Der große Vorteil der Methode liegt darin, daß der Nachweis nicht nur in Zellsuspensionen oder im Blut oder in einzelnen Zellen gelingt, sondern daß im intakten Gewebeschnitt mit einer hohen Sensibilität und Spezifität der betreffende DNA-Abschnitt angefärbt wird. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden zwei verschiedene Sonden verwendet, die der Anfärbung des Maus- X- bzw. Y-Chromosoms dienen. Das X-Chromosom emittiert unter dem entsprechenden Filter des Fluoreszenzmikroskops ein rotes Signal, die Y-Chromosomsonde ein grünes, da beide Sonden entsprechend an Rhodamin bzw. Fluoreszin-

Isothiocyanat gekoppelt sind. Der Nachweis der entsprechenden Signale erfolgt mit einem speziellen Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Zeiss Axioskop), welches mit einer 50 Watt-Quecksilberlampe und entsprechenden Filtern ausgestattet ist, sowie mit einer Kamera mit Software für Fluoreszenzaufnahmen verbunden ist. Um die Färbung durchzuführen, wurden die Gefrierschnitte wie folgt behandelt: Zunächst wurden die Schnitte auf Raumtemperatur gebracht und anschließend 5min in einer 1:3 Eisessig-Methanol-Lösung fixiert. Danach wurden die Schnitte luftgetrocknet und je 3min in 70%, 80% und 100% Ethanol dehydriert. Die Dehydrierung war ein wichtiger Schritt für den Erfolg der späteren Hybridisierung mit den DNA-Sonden, da durch die Entfernung von Wassermolekülen aus dem Gewebe der entstehende Doppelstrang umso stabiler wird. Die Schnitte wurden erneut luftgetrocknet. Nun erfolgte die Behandlung mit RNase (10µl RNase in 1ml 2X SSC gelöst). Pro Schnitt wurden 100µl dieser Lösung aufgetragen und für eine Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Behandlung mit RNase diente der Vermeidung von Fehlbindungen zwischen Sonden und RNA. Nach einer Stunde erfolgte ein Waschschrift in 2X SSC. Es wurde nun eine Lösung aus 5µl Proteinase K und 995µl Proteinase K-Puffer vorbereitet (5µg/ml Proteinase K in 20mM Tris/HCl und 2mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8,0). 150µl dieser Lösung wurden pro Objektträger aufgetragen und für 45min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Dieser Schritt diente der Permeabilisierung des Gewebes und wurde von ursprünglich 15min auf 45min verlängert, da sich dadurch eine Optimierung der Hybridisierung erreichen ließ. Anschließend erfolgte ein Waschschrift in 2X SSC. Vor dem Auftragen der Sonden wurde nun nochmals in der aufsteigenden Ethanol-Reihe dehydriert, um durch die Vorbehandlung ins Gewebe gelangte Wassermoleküle zu entfernen. Es folgte erneutes Lufttrocknen. Pro Objektträger wurde jetzt eine Lösung aus 3µl Hybridisierungs-Sonde und 12µl Hybridisierungs-Puffer vorbereitet und auf die Schnitte aufgetragen. Es erfolgte zügiges Eindeckeln und Versiegeln der Deckgläschen (18X18mm) mit Fixogum. Dann wurden die Objektträger für genau drei Minuten auf eine Heizplatte mit 79°C gelegt, was der DNA-Denaturierung diente, also dem Aufbrechen der DNA-Doppelstränge, damit die für die Hybridisierung nötigen Einzelstränge vorlagen. Das Vorliegen von DNA-Einzelsträngen ist unabdingbare Voraussetzung für eine Anlagerung der Sonden an die Chromosomen. Es folgte eine Inkubation bei 42°C in der feuchten Kammer von 12-18 Stunden. Am nächsten Tag wurden nicht gebundene Sonden durch Waschen in 50%iger Formamid-Lösung (in 2XSSC, pH 7,0) und danach in 0,1X SSC bei 45°C im Wasserbad entfernt. Nach mehrstündigem Trocknen der Schnitte unter einem Pappkarton wurden 15µl DAPI (Diamidin-2-Phenylindol Dihydrochlorid) pro Objektträger aufgetragen und das Deckgläschen wurde mit Nagellack fixiert. DAPI diente als Gegenfärbung, es wurde in Mounting Medium Vectashield verwendet, welches ein Verblässen der Fluoreszenz verhindern soll. Es lagert sich an die G-Banden der Chromosomen an

und dient dem Zweck, nachzuweisen, daß sich die FISH-Signale im Zellkern befinden. Die DAPI-Färbung fluoresziert bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 365\text{nm}$ .

#### 3.2.7.4 Kombination CD31 und FISH

Die Kombination von Immunhistochemie und FISH zu erarbeiten, war wesentlicher Bestandteil dieser Dissertation. Zunächst schien eine Kombination nicht möglich zu sein, da durch die relativ aggressive Behandlung des Gewebes mit Proteinase K jede weitere Färbung unmöglich schien. Aus dieser Tatsache ergab sich, daß eine immunhistochemische Färbung wenn, vor der FISH-Färbung erfolgen musste. Die Austestung von CD31 erfolgte zunächst mit einem Rhodamin-gelabeltem Antikörper, was auch eine fluoreszierende Färbung zum Ergebnis gehabt hätte. Jedoch erwies sich diese Form der CD 31-Färbung als wenig spezifisch und daher unzureichend. Danach wurde zunächst die CD 31-Färbung anhand der LSAB-Methode wie unter Abschnitt 3.7.2 beschrieben ausgetestet und optimiert. Erste Versuche einer Kombination mit FISH mißglückten, da die für die LSAB-Methode verwendete Acetonfixierung für die nachfolgende Proteinase-Behandlung während der FISH-Färbung nicht ausreichte. Die Eisessig/Methanol-Fixierung führte aber wiederum in der LSAB-Methode zu negativen Ergebnissen. Daher wurden die Schnitte nun zunächst für die LSAB-Methode mit Aceton fixiert und vor der sich anschließenden FISH-Färbung nochmals in Eisessig/Methanol fixiert. Zur weiteren Vermeidung von Interferenzen zwischen den beiden Methoden wurde ein Waschschrift in 60°C warmer 1X PBS-Lösung für 10min zwischengeschaltet. Ein weiteres Problem ergab sich bei der Auswertung der verschiedenen Methoden, da eine Auswertung einmal im Durchlicht und einmal unter dem Fluoreszenzmikroskop nötig war. Diese Schwierigkeit wurde umgangen, indem zunächst die FISH-Färbung ausgewertet wurde und die jeweiligen Koordinaten der betrachteten Areale mit einem Koordinatensystem gespeichert wurden. Anschließend konnte der Objektträger im Durchlicht betrachtet werden und die eingespeicherten Koordinaten dienten dem Wiederauffinden der zuvor ausgewerteten Gesichtsfelder.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Überprüfung der Tumorzelllinien auf ihre Eignung für die Versuchsaufbauten

#### 4.1.1 Geschlechtsbestimmung der Tumorzelllinien mittels Fluoreszenz in Situ Hybridisierung

Zur Überprüfung, ob die verwendeten Zelllinien tatsächlich die von dem kommerziellen Vertreiber angegebenen Geschlechtsmerkmale exprimieren, wurden Zytospinpräparate aus Zellsuspension angefertigt und diese einer FISH-Färbung unterzogen.

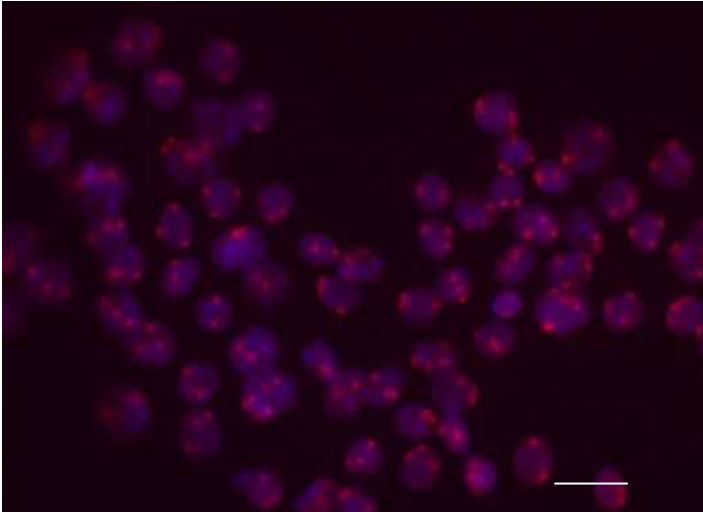
Alle drei Zelllinien wurden mit FISH-Technik auf das Vorhandensein und die Anzahl von X- bzw. Y-Chromosomen im Zellkern untersucht.

Die Zelllinie WEHI zeigte ein bis drei X-Chromosom-positive Signale pro Zelle (siehe Abbildung 5). Es zeigten sich keine Y-Chromosom-positiven Signale (nicht gezeigt). Die Zelllinie wurde daraufhin für die folgenden Versuchsanwendungen für tauglich erklärt. Der teilweise zu erwartende 1,5-fache Chromosomensatz (ein bis drei X-Chromosom-positive Signale pro Zelle) führte hierbei zu keiner Interferenz mit dem Versuchsaufbau, da, wie unter Punkt 3.2.3 und 3.2.4 beschrieben, die Y-Chromosom-positiven Zellen identifiziert werden mussten.

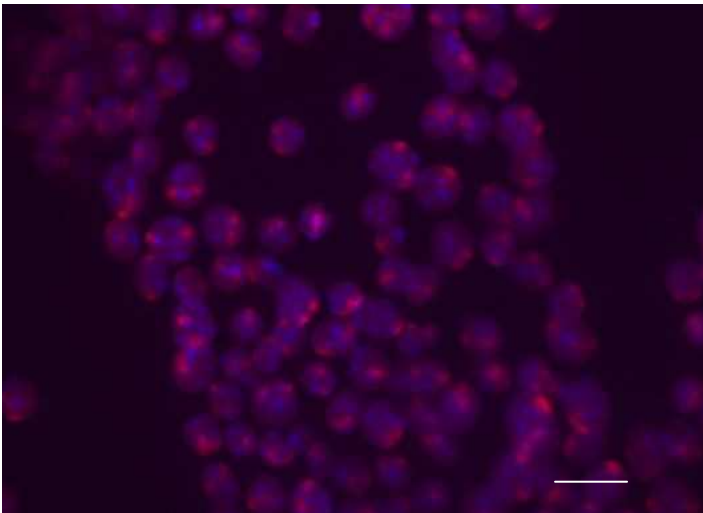
Die Zelllinie JC zeigte wie erwartet ein bis drei X-Chromosom-positive Signale pro Zelle (siehe Abbildung 6). Y-Chromosom-positive Signale wurden auch hier nicht nachgewiesen (nicht gezeigt). Die Zelllinie wurde daraufhin für die folgenden Versuchsaufbauten für tauglich erklärt. Der teilweise zu erwartende eineinhalbfache Chromosomensatz (ein bis drei X-Chromosom-positive Signale pro Zelle) führte hierbei zu keiner Interferenz mit dem Versuchsaufbau, da wie unter Punkt 3.2.3 und 3.2.4 beschrieben die Y-Chromosom-positiven Zellen identifiziert werden mussten.

Die Zelllinie VLM zeigte ein bis vier Y-Chromosom-positive Signale pro Zelle (siehe Abbildung 7). Es wurden dementsprechend ein bis vier X-Chromosom-positive Signale pro Zelle nachgewiesen (nicht gezeigt). Die Zelllinie wurde daraufhin genau auf ihren DNA-Gehalt mittels Durchflußzytometrie überprüft (siehe Abschnitt 4.1.2), um über ihre Tauglichkeit für die geplanten Experimente zu entscheiden.

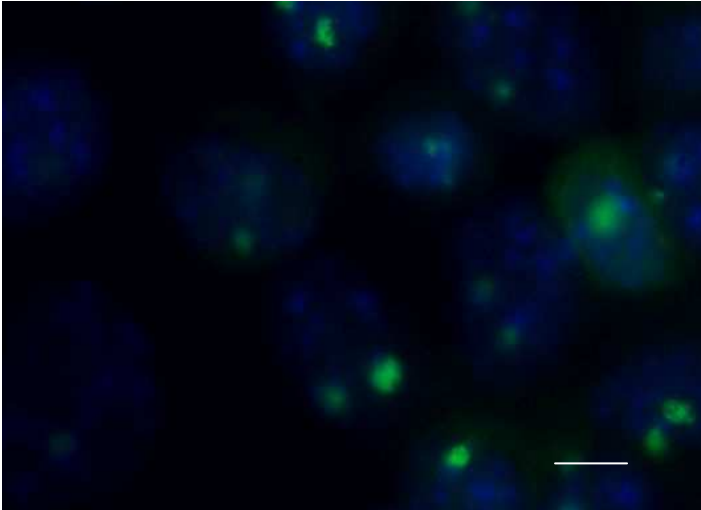
Die Tumorzellen WEHI und JC wurden für die weiterführenden Versuche verwendet. Die Zelllinie VLM wurde zunächst per Durchflußzytometrie auf ihren DNA-Gehalt untersucht.



**Abbildung 5:** Überprüfung der Zelllinie WEHI auf das vorliegende Geschlechtsmerkmal: gezeigt wird ein Cytospin nach FISH-Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Es zeigen sich ein bis drei X-Chromosom-positive Signale (rot fluoreszierende Punkte) pro Zellkern (blaue Fluoreszenz). WEHI-Zellen exprimieren wie erwartet weibliche Geschlechtschromosomen unter Ausbildung eines ein- bis eineinhalbfachen Chromosomensatzes. Da im Folgenden Y-Chromosom-positive Zellen nachgewiesen werden sollen, kommt es durch einen polyploiden Chromosomensatz nicht zu einer Verfälschung der Versuchsergebnisse. [Vergrößerung 100x]



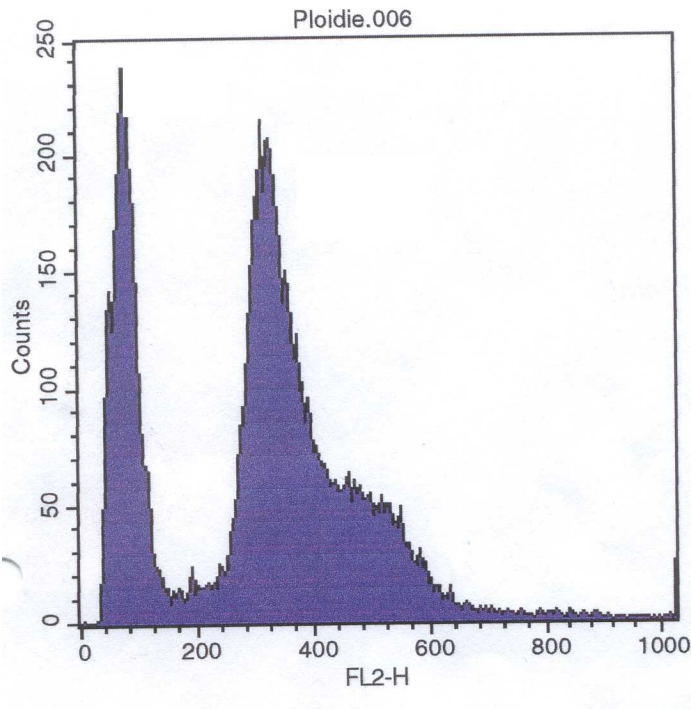
**Abbildung 6:** Überprüfung der Zelllinie JC auf das vorliegende Geschlechtsmerkmal: gezeigt wird ein Cytospin nach FISH-Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Es zeigen sich ein bis drei X-Chromosom-positive Signale (rot fluoreszierende Punkte) pro Zellkern (blaue Fluoreszenz). JC-Zellen exprimieren wie erwartet weibliche Geschlechtschromosomen unter Ausbildung eines ein- bis eineinhalbfachen Chromosomensatzes. Da im Folgenden Y-Chromosom-positive Zellen nachgewiesen werden sollen, kommt es durch einen polyploiden Chromosomensatz nicht zu einer Verfälschung der Versuchsergebnisse. [Vergrößerung 100x]



**Abbildung 7: Überprüfung der Zelllinie VLM auf das vorliegende Geschlechtsmerkmal: gezeigt wird ein Cytospin nach FISH-Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Es zeigen sich ein bis vier Y-Chromosom-positive Signale (grün fluoreszierende Punkte) pro Zellkern (blaue Fluoreszenz). VLM-Zellen exprimieren wie erwartet männliche Geschlechtschromosomen. Allerdings unter Ausbildung eines einfachen bis vierfachen Chromosomensatzes. Es werden nicht nur mehr als ein Y-Chromosom pro Zelle exprimiert, sondern auch mehr als ein X-Chromosom (Bild hier nicht gezeigt). Da im Folgenden X-Chromosom-positive Zellen nachgewiesen werden sollen, kommt es durch einen polyploiden Chromosomensatz zur Verfälschung der Ergebnisse durch VLM-Zellen, welche mehr als ein X-Chromosom-positives Signal exprimieren können. Zur weiteren Überprüfung des DNA-Gehalts wird eine Durchflußzytometrie durchgeführt. [Vergrößerung 100x]**

Es wurde zunächst noch eine weitere Zelllinie in den Versuch mit einbezogen. Die Zellen mit dem Namen NMU zeigten jedoch nach Injektion in die Versuchstiere auch nach Verdoppelung der Zellzahl kein Tumorstadium, so daß diese Zelllinie untauglich für die geplanten Versuche war.

#### 4.1.2 Poliploidienachweis der Zellart VLM mittels Durchflußzytometrie



**Abbildung 8:** Überprüfung des DNA-Gehaltes der Zelllinie VLM: Durchflußzytometrie der Tumorzelllinie VLM im Vergleich mit Mausblut (Balb/c), nach vorheriger Markierung der Zellen mit Propidiumiodid (Fluoreszenzfarbstoff), welches unspezifisch an die DNA der Zellen bindet, wird die absolute Anzahl der fluoreszierenden Zellen (Y-Achse) gegen die Fluoreszenzintensität (X-Achse) aufgetragen. Der erste Peak des Diagramms zeigt den normalen DNA-Gehalt im Mausblut an, während der zweite, breitere Peak einen eineinhalb bis vierfachen DNA-Gehalt der VLM-Zellen anzeigt. Da durch die Polyploidie bedingt mehr als ein X-Chromosom-positives FISH-Signal entstehen könnte, wurde die VLM-Zelllinie für die geplanten Transplantationsversuche nicht verwendet (siehe S.39, Abschnitt 4.1.1)

Um über die Verwendbarkeit der Zelllinie VLM für die weiteren Versuche zu entscheiden, erfolgte eine Durchflußzytometrie. Nach Markierung der Zellen mit Propidiumiodid, welches sich als Fluoreszenzfarbstoff unspezifisch an DNA bindet, wurde der Gesamt-DNA-Gehalt der VLM-Zellen mit dem von Mausblut (Balb/c) verglichen. Im oben abgebildeten Diagramm ist die absolute Anzahl an fluoreszierenden Zellen (Y-Achse) gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen (X-Achse). Es zeigt sich im ersten Peak ein normaler, einfacher DNA-Gehalt der Zellen aus Mausblut. Der zweite Peak stellt den DNA-Gehalt der Tumorzelllinie dar, er ist wesentlich breiter, da ein 1,5 bis 4facher DNA-Gehalt vorhanden ist, welcher ungleichmäßig verteilt ist. Da die Zuordnung einzelner Zellkörper zu Y-positiven FISH-Signalen durch die Polyploidie erschwert worden wäre und mit Hilfe dieser Zelllinie auch X-Chromosom-positiv Signale nachgewiesen werden sollten (Implantation der männlichen Tumorzelllinie VLM in weibliche Mäuse und Nachweis von weiblichen Zellen im Tumorgewebe), schied sie für die weiteren Versuche aus. Beim Nachweis von etwa zwei X-

Chromosom-positiven Signalen in einem Zellkern hätte es sich sowohl um eine Tumor- als auch um eine Wirtszelle handeln können.

## **4.2 Nachweis eines männlichen Knochenmark-Chimerismus in weiblichen Tieren und Nachweis eines weiblichen Knochenmark-Chimerismus in männlichen Tieren**

Im unter 3.2.4 beschriebenen Transplantationsmodell sollte ein „kompletter“ Knochenmarkchimerismus erreicht werden. Das bedeutet, daß die komplette Blutbildung der weiblichen Knochenmarkempfängertiere durch die transplantierte, männliche Spenderhämatopoese ersetzt wurde. Wir erwarteten ein 100%iges Engraftment, das heißt, eine vollkommen durch das Spendermark übernommene Hämatopoese im Knochenmark. Zum Nachweis des Vorliegens von Knochenmark mit männlichem Geschlechtsmerkmal in weiblichen Mäusen und Knochenmark mit weiblichem Geschlechtsmerkmal in männlichen Mäusen nach vorangegangener Transplantation haben wir die quantitative PCR (Polymerase Chain Reaction) im Light Cycler verwendet.

Es handelt sich hier um eine relative, quantitative PCR, das bedeutet, daß nicht der absolute Gehalt an DNA gemessen wurde, sondern daß der in den Proben enthaltene DNA-Gehalt ins Verhältnis gesetzt wurde zum DNA-Gehalt einer zuvor erstellten Standardverdünnungsreihe. Gemessen wurde die DNA eines Tieres der Gruppe A, jeweils zwei der Gruppe B und C und eins der Gruppe D. Der DNA-Gehalt dieser Proben wurde in Relation gesetzt zu männlicher DNA in 1%iger, 5%iger, 10%iger, 50%iger und 100%iger Konzentration, sowie zu weiblicher DNA in 100%iger Konzentration und Wasser als Negativprobe.

Zunächst wurde der DNA-Gehalt der Proben gemessen, indem ein Lauf mit dem Primer GAP durchgeführt wurde. Dies ist ein unspezifischer Primer. Um den DNA-Gehalt der eingesetzten Proben in Prozent zu errechnen, wurden die Ergebnisse jeweils ins Verhältnis gesetzt zum Mittelwert der Proben der Standardreihe „100% weibliche und 100% männliche DNA“. Es ergaben sich die in der Tabelle 1 aufgeführten Werte. Bei den Tieren B1, C1 und D ergab sich ein relativ geringer DNA-Gehalt, dies war auf intraindividuelle Unterschiede, sowie Verluste bei der Knochenmarkpräparation und DNA-Gewinnung zurückzuführen.

Weibliche Mäuse, die männliches Knochenmark erhielten (siehe Tabelle 3, Gruppe A , B1 und B2), zeigten durchweg einen männlichen Chimerismus mit männlichen Anteilen im Knochenmark zwischen 88 und 340% (n=15, Mittelwert 118%) [127]. Männliche Mäuse, die weibliches

Knochenmark erhielten (siehe Tabelle 3 Gruppe C1, C2 und D), zeigten 8 Wochen nach Transplantation erwartungsgemäß nur sehr geringe Anteile (2,7-6,5%) an männlichem Knochenmark (n=4, Mittelwert 5%). In Tabelle 1,2 und 3 wurden die Werte der Tiere der hier durchgeführten Experimente exemplarisch aufgeführt, die erwartungsgemäß hohe Anteile an männlichem Knochenmark in den weiblichen Tieren A, B1, B2 zeigten. Die Anteile des männlichen Knochenmarks in den männlichen Empfängertieren C1, C2 und D nach Transplantation von weiblichem Knochenmark waren erwartungsgemäß gering.

**Tabelle 1: Dargestellt sind exemplarisch die Werte einiger Tiere. Mit einem Primer (GAP), welcher unspezifisch an DNA bindet, wird der Gesamt-DNA-Gehalt der Proben relativ zu einer Standardverdünnungsreihe mit männlicher DNA in 1%,5%,10%,50%, 100%iger Konzentration und weiblicher DNA in 100%iger Konzentration gemessen.**

Gruppe, einzelne Mäuse	A	B1	B2	C1	C2	D
Tumor	WEHI	JC	JC	WEHI	WEHI	JC
Maus	weiblich	weiblich	weiblich	männlich	männlich	männlich
Knochenmark	männlich	männlich	männlich	weiblich	weiblich	weiblich
Anteil GAP im KM	71,89%	2,81%	16,70%	7,91%	33,39%	0,48%

Ein weiterer Light Cycler-Lauf mit denselben Proben wurde dann mit dem Primer y6 durchgeführt, welcher dazu diente, den Anteil an männlichem Knochenmark in den jeweiligen Proben zu bestimmen.

**Tabelle 2: Dargestellt sind exemplarisch die Werte einiger Tiere. Mit einem Primer (Y6), welcher spezifisch an das Y-Chromosom bindet, wird der männliche DNA-Gehalt der Proben relativ zu einer Standardverdünnungsreihe mit männlicher DNA in 1%,5%,10%,50%, 100%iger Konzentration und weiblicher DNA in 100%iger Konzentration gemessen.**

Gruppe, einzelne Mäuse	A	B1	B2	C1	C2	D
Tumor	WEHI	JC	JC	WEHI	WEHI	JC
Maus	weiblich	weiblich	weiblich	männlich	männlich	männlich
Knochenmark	männlich	männlich	männlich	weiblich	weiblich	weiblich
Anteil Y6 im KM	80,07%	10,12%	19,29%	0,49%	0,95%	0,03%

Vergleich man nun direkt den relativen Gesamt-DNA-Gehalt einer jeden Probe mit dem Gehalt an männlicher DNA, also beispielsweise den Gehalt an GAP in Maus A mit dem Anteil an y6 in Maus A, ergaben sich die in Tabelle 3 dargestellten Werte.

**Tabelle 3:** Dargestellt sind exemplarisch die Werte einiger Tiere. Der jeweilige Gesamt-DNA-Gehalt eines jeden Tieres wurde ins Verhältnis gesetzt zum Anteil an männlicher DNA. Die Tiere A, B1 und B2 zeigen erwartungsgemäß nach Transplantation männlichen Knochenmarks in weibliche Balb/c-Mäuse, einen hohen Anteil an männlicher DNA im Knochenmark, d.h. einen kompletten männlichen Chimerismus. Die Tiere C1, C2 und D zeigen erwartungsgemäß nach Transplantation weiblichen Knochenmarks in männliche Mäuse einen geringen Anteil männlichen Knochenmarks, es liegt also ein kompletter weiblicher Chimerismus im Knochenmark vor.

Gruppe, einzelne Mäuse	A	B1	B2	C1	C2	D
Tumor	WEHI	JC	JC	WEHI	WEHI	JC
Maus	weiblich	weiblich	weiblich	männlich	männlich	männlich
Knochenmark	männlich	männlich	männlich	weiblich	weiblich	weiblich
Relation y6 zu GAP	106,03%	343,28%	109,97%	5,93%	2,70%	6,54%

Wie erwartet, zeigte sich in Gruppe A und B ein hoher Anteil an y6, also männlicher DNA im Knochenmark, im Mittel 186% (106-343%), während in den Gruppen C und D im Mittel 5% (2,7-6,5%) männlicher DNA im Knochenmark nachweisbar waren. Dies zeigte, daß in den Versuchstieren jeweils ein vollständiges Engraftment nach Knochenmarktransplantation stattgefunden hat. In Gruppe C und D wurde das Engraftment des weiblichen Knochenmarks indirekt über den niedrigen Restgehalt an männlicher DNA im Knochenmark angezeigt.

### 4.3 Implantation weiblicher Tumoren in männliche Balb/c-Mäuse

Von insgesamt 6 männlichen Balb/c-Mäusen erhielten zwei Männchen den weiblichen Tumor WEHI subcutan in den Nacken implantiert, die Analyse der Tumoren erfolgte nach vier Wochen.

Zwei weiteren Männchen wurden Zellen des weiblichen Tumors JC subcutan in den Nacken injiziert und nach vier Wochen analysiert. Noch zwei weiteren Männchen wurde der weibliche Tumor NMU subcutan in den Nacken implantiert, da es bei letzterem zu keinem Tumorwachstum kam, war hier eine Auswertung nicht möglich.

Untersucht wurde, ob und wie viele männliche Zellen sich in dem Tumorgewebe befanden. Vier Tumoren wurden auf jeweils vier Objektträgern analysiert. Bei Untersuchung des weiblichen Tumors JC nach Implantation in männliche Tiere zeigten sich durchschnittlich 66+/-8% y-positive gefäßumrandende Zellen mit DAPI-positivem Kern. Die Ergebnisse wurden von einem zweiten Untersucher objektiviert (Erstuntersucher: Gabriele Heinze, Zweituntersucher: Dr. rer nat Stoeltig und PD Dr. med Peters). Im Tumor WEHI wurden 60+/-9% der gefäßumrandenden Zellen als Y-positiv quantifiziert. Die Areale zwischen den Gefäßen waren CD31negativ und die dort gefundenen Y-positiven Zellen wurden als Zellen der Immunantwort auf die Tumordinfiltration identifiziert (siehe Abschnitt 4.5).

Dieser Versuch zeigte den Anteil männlicher Zellen im weiblichen Tumor ohne Transplantation von Knochenmark.

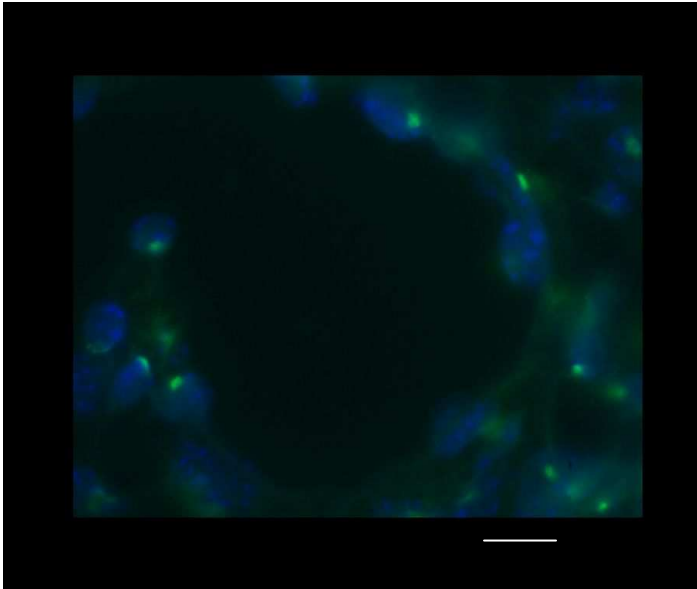


Abbildung 9: Dargestellt ist ein Tumorschnitt nach Implantation des weiblichen Tumors WEHI 164 in eine männliche Balb/c-Maus. Der Schnitt wird mit der FISH-Methode gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt. Zu sehen ist ein Tumorgefäß nach morphologischen Kriterien mit Auskleidung durch Zellen mit Y-positivem Signal (grüne Fluoreszenz) im Zellkern (blaue Fluoreszenz) [Vergrößerung 100x].

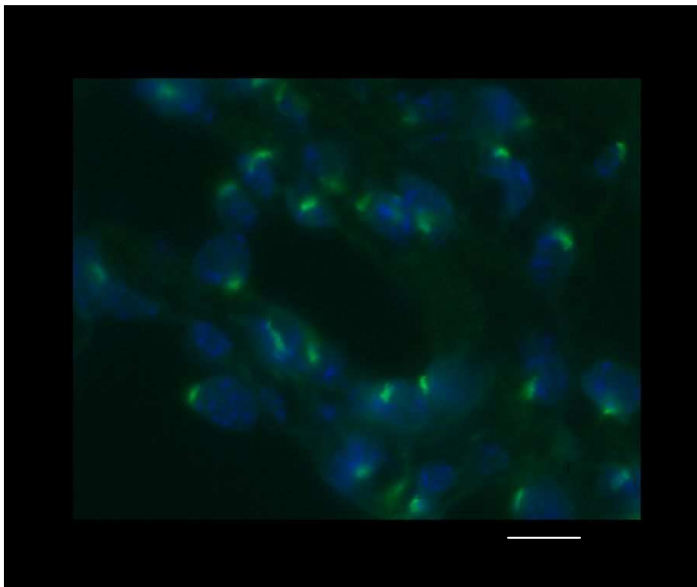


Abbildung 10: Dargestellt ist ein Tumorschnitt nach Implantation des weiblichen Tumors JC in eine männliche Balb/c-Maus. Der Schnitt wird mit der FISH-Methode gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt. Zu sehen ist ein Tumorgefäß nach morphologischen Kriterien mit Auskleidung durch Zellen mit Y-positivem Signal (grüne Fluoreszenz) im Zellkern (blaue Fluoreszenz) [Vergrößerung 100x].

#### 4.4 Nachweis männlicher, CD31-positiver Zellen in weiblichen Tumoren nach Knochenmarkstransplantation

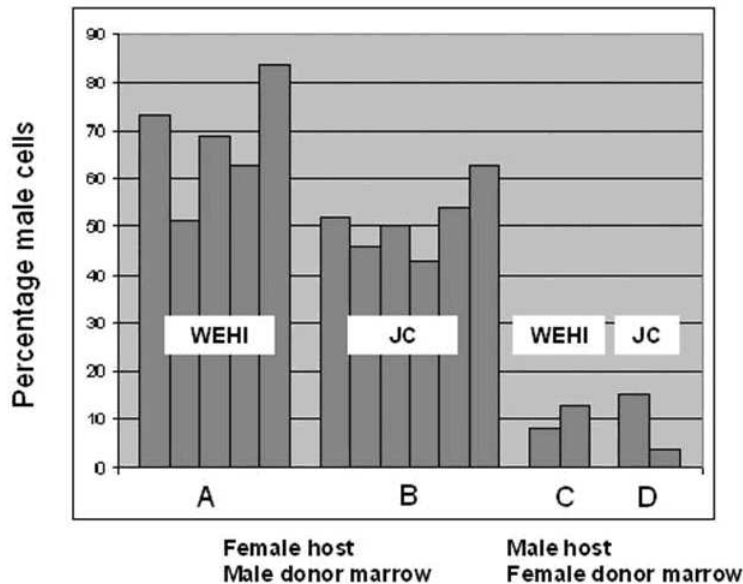


Abbildung 11: Dargestellt sind die pro individuellem Tier gezählten Y-Signal positiven Zellen in morphologisch identifizierten Gefäßwänden; A: weibliche Maus mit männlichem Knochenmark und weiblichem Tumor WEHI; B: weibliche Maus mit männlichem Knochenmark und weiblichem Tumor WEHI 164; C: männliche Maus mit weiblichem Knochenmark und weiblichem Tumor WEHI 164; D: männliche Maus mit weiblichem Knochenmark und weiblichem Tumor JC. Es zeigt sich ein deutlich geringerer Anteil an Y-positiven Zellen in den Gefäßwänden der Gruppen C und D. Daraus folgt, daß ein großer Anteil der Y-positiven Zellen in den Gefäßwänden aus dem Knochenmark stammt [Quelle s. Literaturverzeichnis 127].

Gezählt wurden zunächst die Y-positiven-FISH-Signale in morphologisch gefäßähnlichen Strukturen in den angefertigten Tumorgewebsschnitten. Hier ergab sich für die Gruppe A / weibliche Mäuse mit männlichem Knochenmark und WEHI-Tumoren ein Durchschnitt von  $67 \pm 13\%$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, 5 Tiere, 11 Schnitte) männlichen Zellen, Gruppe B / weibliche Mäuse mit männlichem Knochenmark und JC-Tumoren ein Durchschnitt von  $51 \pm 9\%$  (6 Tiere, 18 Schnitte). Die Kontrollgruppen Gr.C / männliche Mäuse mit weiblichem Knochenmark und WEHI-Tumoren zeigten durchschnittlich  $11 \pm 13\%$  (2 Tiere, 5 Schnitte) und Gruppe D / männliche Mäuse mit weiblichem Knochenmark und JC-Tumoren  $9 \pm 8\%$  (2 Tiere, 2 Schnitte) an männlichen Zellen in den Gefäßwänden. Da die Möglichkeit bestand, daß das Gewebe durch die Behandlung während der FISH-Färbung in seiner Morphologie stark verändert wurde, wurde die Darstellung männlicher

Zellen an morphologisch identifizierten Gefäßen in nachfolgend beschriebener Doppelfärbung bestätigt (siehe Abschnitt 3.2.7.4).

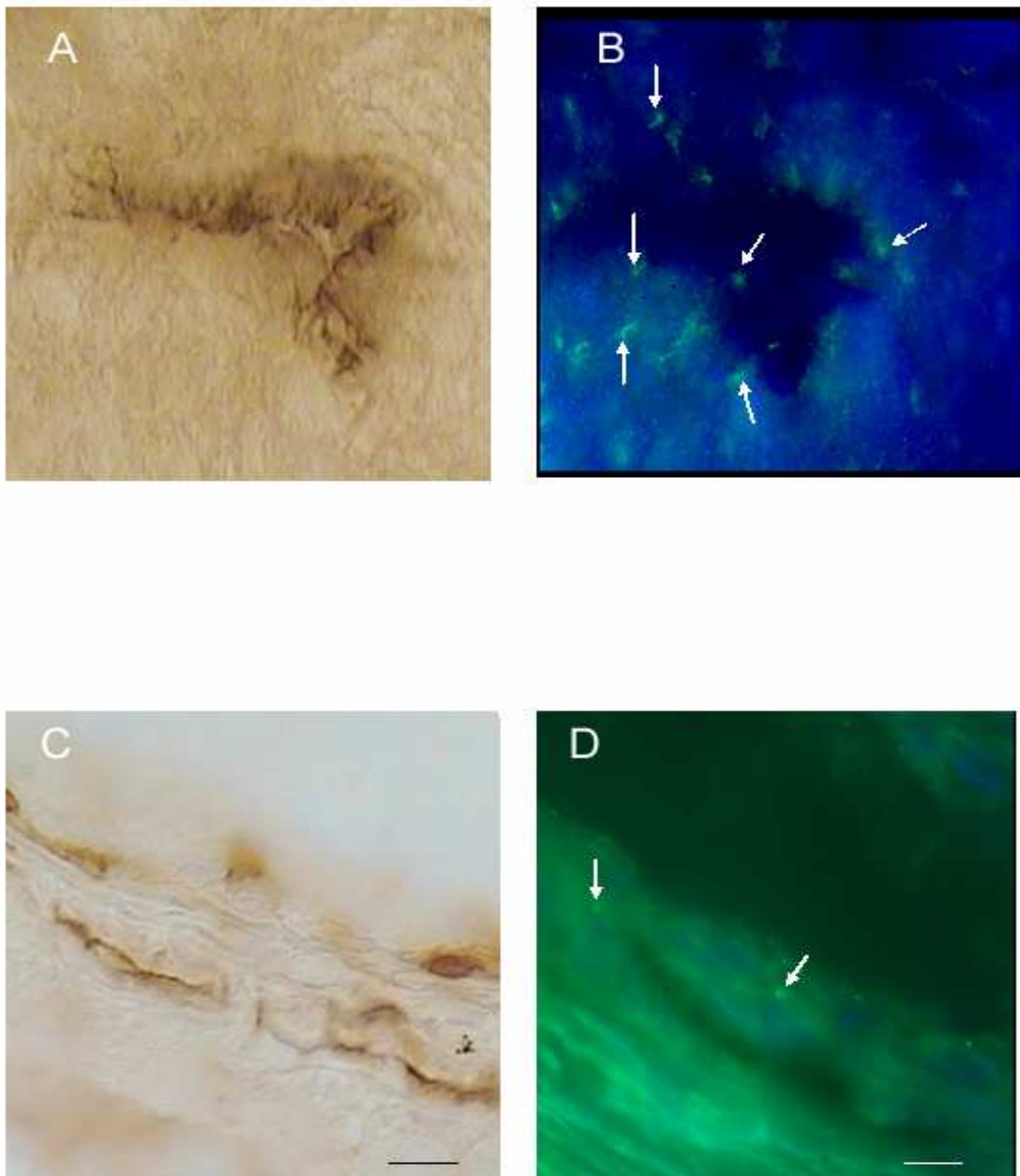
Nimmt man den Durchschnitt aus Gruppe A und B waren dies 60% männliche Zellen, für Gruppe C und D 8,5% männliche Zellen insgesamt. Der Unterschied im Gesamtanteil männlicher Zellen in den Gruppen A/B und C/D zeigte zunächst einmal nur, daß ein Großteil der Zellen im Tumorgewebe aus dem Knochenmark stammte. Eine Reihe anderer Körperzellen ist potentiell in der Lage, in einen Tumor einzuwandern. So ruft ein Tumor etwa Immunreaktionen hervor (siehe Abschnitt 4.5) und lockt Immunzellen chemotaktisch an, es ist davon auszugehen, daß ein Großteil der im Tumor befindlichen Zellen der lymphatischen und erythropoiden Reihe angehört.

Um zweifelsfrei Endothelzellen mit männlichem Geschlechtsmerkmal zu identifizieren, wurde im Anschluß die Kombinationsfärbemethode mit Immunzytologie und FISH für das CD31-Antigen und das Y-Chromosom etabliert und angewendet. Die Auswertung dieser Kombinationsfärbung CD31/ Y-FISH zeigte: In den WEHI-Tumoren (Gruppe-A) trugen 30,40% der perivaskulären Zellen sowohl ein männliches Geschlechtsmerkmal und waren CD31 positiv, für die JC-Tumore (Gruppe-B) ergab sich ein Anteil von 38,64% mit beiden Merkmalen. In der Gruppe C (WEHI-Tumore in männlichen Wirtstieren mit weiblichem Knochenmark) trugen 21,45% beide Merkmale, in Gruppe D (JC-Tumore in männlichen Wirtstieren mit weiblichem Knochenmark) waren 20,29% der perivaskulären Zellen sowohl CD31 als auch Y-Chromosom positiv. Dabei wurden auch jeweils 200 Zellen auf mindestens 5 Schnitten pro Tumor gezählt.

Diese Ergebnisse warfen somit einige Fragen auf bezüglich der in Abbildung 11 zusammengefassten Daten der Y-Chromosom-FISH-Einzelfärbung. Der hier niedrigere Anteil doppelmarkierter Endothelzellen im Vergleich zu den Y-Chromosom-positiven perivaskulären Zellen der Einzelfärbung der Gruppen A und B ließe sich zwanglos erklären durch die Tatsache, daß neben Endothelzellen andere Zelltypen perivaskulär gelagert sind. Der höhere Anteil doppelmarkierter Endothelzellen in den Gruppen C und D lag Methoden-bedingt an der Tatsache, daß eher große Tumorgefäße die Denaturierungsschritte der Färbungen schadlos überstanden haben und so eher zentrale Tumorgefäße ausgewertet wurden, die dem systemischen Gefäßanschluß nahe liegen. Zusammengefasst ergab sich für weibliche Mäuse mit weiblichen WEHI- und JC-Tumoren nach Transplantation männlichen Knochenmarks ein hoher Anteil an Y-positiven und CD31-positiven gefäßumrandenden Zellen. Daraus schlossen wir, daß etwa ein Drittel der Endothelzellen in den untersuchten Tumoren von Zellen gebildet wurde, die aus dem Knochenmark stammten. Das wiederum bedeutete, daß es im Tumor nicht ausschließlich zu einer Angiogenese durch Aussprossen von Endothelzellen aus dem umliegenden Gewebe kam, sondern daß eine

Vaskulogenese, also eine de-novo-Synthese von Gefäßen in den von uns verwendeten Tumortypen stattfand.

Die Einbeziehung der Gruppen C und D in das Experiment (männliche Mäuse mit weiblichem Knochenmark und weiblichen WEHI- und JC-Tumoren) zeigte, daß die Tumorangiogenese nicht einheitlich von einem Vorläuferzelltyp gespeist wurde, sondern sich ebenfalls aus Zellen rekrutierte, die nicht während einer Knochenmarktransplantation ausgetauscht werden, und die im Körper zirkulieren oder aus räumlicher Nähe zum Tumorgewebe aussprossen.



**Abbildung 12:** A und B: Nachweis männlicher Endothelzellen in weiblichen WEHI-Tumoren mittels immunzytologischer und FISH Doppelfärbung für CD31 und das Y-Chromosom. Die WEHI-Tumorgewebsschnitte zeigen CD31 positiv markierte Endothelzellen in einem Tumorgefäß (A). Mittels Y-Chromosomspezifischer FISH-Färbung kann ein Teil dieser Zellen als männlichen Ursprungs identifiziert werden, siehe Pfeile (B) [Vergrößerung 100x]. C und D: Nachweis männlicher Endothelzellen in weiblichen JC-Tumoren mittels immunzytologischer und FISH Doppelfärbung für CD31 und das Y-Chromosom. Die JC-Tumorgewebsschnitte zeigen CD31 positiv markierte Endothelzellen in einem Tumorgefäß (C). Mittels Y-Chromosomspezifischer FISH-Färbung kann ein Teil dieser Zellen als männlichen Ursprungs identifiziert werden, siehe Pfeile (D) [Vergrößerung 100x].

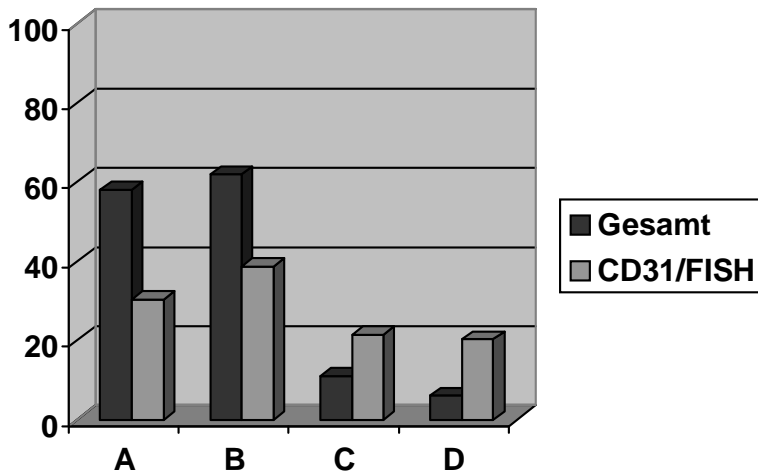


Abbildung 13: Gegenüberstellung der Daten der zwei Auswertungen gemäß Einzelfärbung mittels FISH für das Y-Chromosom (in der Legende als „Gesamt“ bezeichnet; gemeint sind männliche Zellen im Tumor im Gefäßperimeter, ausgewählt nach morphologischen Kriterien) sowie immunzytologischer und FISH Doppelfärbung für CD31 und das Y-Chromosom (in der Legende als „CD31/FISH“ bezeichnet). Gruppe A: weibliche Maus, männliches Knochenmark, weiblicher WEHI-Tumor; Gruppe B: weibliche Maus, männliches Knochenmark, weiblicher JC-Tumor; Gruppe C: männliche Maus, weibliches Knochenmark, weiblicher WEHI-Tumor; Gruppe D: männliche Maus, weibliches Knochenmark, weiblicher JC-Tumor. Es ergibt sich wie erwartet ein hoher Anteil an männlichen Endothelzellen in den Gruppen A und B. Der Anteil an männlichen Endothelzellen in den Gruppen C und D ist in der Doppelfärbung vergleichsweise überraschend hoch.

#### 4.5 Nachweis von männlichen T- und B-Lymphozyten in weiblichen Tumoren nach Knochenmarkstransplantation

Zum Nachweis, daß ins Tumorstroma auch viele Leukozyten aus dem Knochenmark einwandern, wurde von Tieren der Gruppe A und B jeweils eine Kombinationsfärbung CD3/FISH bzw. CD19/FISH angefertigt. CD3 ist ein Antikörper, welcher an den T-Zell assoziierten CD3-Komplex der T-Zelle bindet, während CD19 auf B-Lymphozyten in allen Reifestufen bis auf die Plasmazelle exprimiert wird. Die Infiltration des Tumors mit Lymphozyten war fokal höchst unterschiedlich ausgeprägt. So fanden sich Areale, in denen sich kaum positive immunzytologisch gefärbte Lymphozyten befanden (< 1%). Da gerade in diesen Arealen geringer Signalpositivität die Färbequalität nur unsicher zu beurteilen war, wurden im Wesentlichen die Areale ausgewertet, in denen sich eine maximale Lymphozyten-Infiltration nachweisen ließ. So fanden sich im Tumorstroma bis zu 28% CD3-positive

männliche Zellen und bis zu 54% CD19-positive männliche Zellen. Im Einzelnen fanden sich in den Gewebsschnitten der Gruppe A bis 31% CD3-positive männliche Zellen und bis 49% CD19-positive männliche Zellen, in den Gewebsschnitten der Gruppe B bis 24% CD3-positive männliche Zellen und bis 59% CD19-positive männliche Zellen. Es zeigten sich also in den unterschiedlichen Tumoren Unterschiede hinsichtlich der maximalen fokalen Infiltration durch Lymphozyten. Der Lymphozytennachweis im Rahmen unserer Fragestellung diente der Unterscheidung dieser Zellen von Endothelzellen, daher verbot sich eine funktionelle Interpretation dieser Befunde.

## 5 Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit konnte in einem Transplantationsmodell gezeigt werden, daß Endothelzellen in JC- und WEHI-Tumoren zum Teil von Vorläuferzellen abstammten, welche dem Knochenmarkspendertier zuzuordnen waren. Dies bedeutet, daß zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen aus dem Organismus selbst entscheidend zur Tumolvaskulogenese beitragen. Diese Erkenntnisse könnten dazu beitragen, daß therapeutische Ansätze entwickelt werden, die durch die gentherapeutische Manipulation von Knochenmarkzellen in-vitro direkt in der Gefäßwand agieren und in der Therapie maligner Erkrankungen Anwendung finden. Das im Rahmen dieser Dissertation gewählte Verfahren zur sicheren Identifizierung von Endothelzellen, die sich aus zirkulierenden Vorläuferzellen entwickelt haben, basiert auf einem immunhistochemisch-mikroskopischem Nachweis der CD31 positiven Endothelzellen in Tumorgefäßwänden und anschließender Bestimmung des Geschlechts derselben Zelle mittels eines Koordinatensystems auf das Vorliegen eines Y-Chromosoms mit FISH-Technik.

In einem ersten Versuchsaufbau konnte gezeigt werden, daß nach Implantation weiblicher Tumoren in männliche Mäuse je nach Tumortyp zwischen 60 und 70% der gefäßumrandenden Zellen ein männliches Signal in der FISH-Färbung aufwiesen. In diesem ersten Versuch wurden die Zellen nach morphologischen Kriterien ausgewählt. Eine Differenzierung, ob es sich um immunaktive Zellen, Perizyten oder tatsächliche Endothelzellen handelte, war hier nicht möglich. Aber es gab einen groben Anhalt über das Ausmaß der Interaktion zwischen Zellen des Wirtstieres und der Tumorzellen. Im nächsten Schritt wurde nun nach Transplantation männlichen Knochenmarks in weibliche Tiere und anschließender Implantation eines weiblichen Tumors die Anzahl an CD31 positiven und männlichen Zellen in Tumorgefäßen quantifiziert. Es ergab sich ein Anteil je nach Tumortyp in den Gruppen A und B zwischen 30 und 40% an männlichen, CD31 positiven Zellen in den Tumorgefäßen (siehe Ergebnisse Abschnitt 4.4). Das bedeutet, daß ein großer Anteil der zuvor nur grob abgeschätzten Menge männlicher Zellen im Tumor tatsächlich aus dem Knochenmark stammt, und es sich um Endothelzellen handelt. Hiermit konnte gezeigt werden, daß Zellen aus dem Knochenmark im gewählten Versuchsaufbau einen wesentlichen Beitrag zur Gefäßbildung in den verwendeten Tumortypen leisteten. Hieraus kann man also schliessen, daß in Tumoren nicht nur eine Angiogenese statt findet, sondern tatsächlich auch eine Vaskulogenese, denn die männlichen, aus dem Knochenmark stammenden endothelialen Vorläuferzellen müssen in das Tumoragebiet einwandern. Eine alternative Erklärung wäre, daß endotheliale Vorläuferzellen nach Transplantation bereits in die Gefäßwände des normalen, tumorumgebenden Gewebes eingewandert waren und sich dort im Rahmen einer normalen Zellerneuerung integriert hatten.

Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, daß dies in so kurzer Zeit in dem Maße stattgefunden haben kann. Diese Frage könnte man in weiterführenden Experimenten klären, indem man tumorferne Gewebe der Versuchstiere mit denselben Methoden untersucht.

Im zeitlichen Verlauf der im Rahmen der Dissertationsarbeit durchgeführten Experimente wurden im ersten Auswertungsverfahren perivaskuläre Zellen mit der FISH-Methode auf das Vorhandensein eines Y-Chromosoms untersucht. Hier zeigte sich in den Untersuchungsgruppen männlicher Wirtstiere nach einer Knochenmarktransplantation weiblichen Knochenmarks (Gruppen C und D, siehe Ergebnisse Abschnitt 4.4), daß in den weiblichen Tumoren perivaskulär einige wenige männliche Zellen zu finden waren, zusammengefasst 8,5% der perivaskulären Zellen ausmachend. Dies entsprach zunächst den Erwartungen. Obwohl sich diese direkte morphologische Zuordnung der perivaskulären männlichen Zellen für den Untersucher subjektiv recht überzeugend darstellte, mußten die Zellen in einer zweiten Auswertung immunzytologisch jedoch genau dem Endothel zugeordnet werden. Die Doppelfärbung mittels immunzytologischer Darstellung des Oberflächenantigens CD31 und der Darstellung des Y-Chromosoms mit FISH war technisch anspruchsvoll, denn die unterschiedliche Aufbereitung, insbesondere der Membran-denaturierende Schritt des FISH-Verfahrens, führte gelegentlich zu Artefakten. Die Etablierung einer zuverlässigen Doppelfärbung mittels Immunfluoreszenz von Zelloberflächenmarkern und Nukleinsäuren gelang zunächst nicht, da die Fluoreszenz des Oberflächenmarkers durch die FISH-Methode zerstört wurde, da im ersten Schritt eben ein Oberflächenmarker untersucht wurde und im zweiten ein Genabschnitt im Zellkern, für dessen Darstellung ein Proteindenaturierungsvorgang von Nöten war. Immerhin ist es uns durch die Entwicklung der Kombination von Immunhistochemie und FISH gelungen, das Oberflächenmolekül CD31 gleichzeitig mit dem Y-Chromosom darzustellen, unter zu Hilfe nahme eines Koordinatensystems. So konnten wir ausreichend große Gewebsanteile technisch sauber untersuchen und Antworten im Sinne der Fragestellung entwickeln. In der Auswertung mittels der Doppelfärbung zeigte sich in den Gruppen C und D ein Anteil von zusammengefasst 20% CD31-positiver männlicher Zellen. Dieser zunächst überraschende Unterschied der Resultate zwischen dem Einfach- und dem Doppelmarkierungsverfahren erklärte sich wesentlich durch den Unterschied in der Auswahl der Tumoreale in der Auswertung. Periphere und kleine Tumorgefäße ließen sich in der Doppelfärbung nicht leicht zuordnen, so daß diese Anteile in der Auswertung der Doppelmarkierung unterrepräsentiert sind. Verglichen mit Gruppe A und B waren also deutlich weniger Y-Chromosom positive Zellen in diesen Tumoren, aber ein hoher Anteil dieser war CD 31 positiv. Die Identifikation anderer nicht-maligner Zellelemente, die aus dem Organismus in den Tumor einwandern können wie Entzündungs- und Immunzellen, welche in die Tumorabwehr, die Bildung von Tumorstromazellen und Gefäßperizyten involviert sind, diente hier der Abgrenzbarkeit

zu den Endothelzellen (siehe Ergebnisse, Abschnitt 4.5). Die Perizyten etwa können morphologisch leicht den Endothelzellen zugeordnet werden, da sie in die Mikrogefäß-Basalmembran der Gefäße eingebettet sind, welche sich entlang dieser winzigen Gefäße erstreckt und die "Röhre" aus Endothelzellen umschlingt. Perizyten interagieren mit den Endothelzellen [118 ; 119]. Obwohl eine scharfe Unterscheidung die Darstellung falsch hoher Zahlen an männlichen Endothelzellen vermied, verblieb in den vorliegenden Experimenten eine minimale Fehlerquelle in Form CD31 negativer, lymphohämatopoetischer Zellen und Perizyten. Wichtig war in diesem Zusammenhang die Feststellung, daß dieses gewählte Versuchsmodell zur Beantwortung der Fragestellung geeignet war, da sich in den Knochenmarktransplantierten Tieren ein kompletter Knochenmarkchimärismus ausbildete. So lassen sich anhand des Modelles auch Fragestellungen bezüglich der Grundlagen des hämatopoetischen Aufbaus im Knochenmark untersuchen [55; 79].

Es kam (in den Gruppen A und B) zu einer nahezu vollständigen Substitution der ursprünglich weiblichen Hämatopoese durch das antransplantierte männliche Knochenmark (siehe Ergebnisse Abschnitt 4.2). Eine wesentliche Fehlerquelle durch verbliebene männliche Resthämatopoese (der Gruppen C und D) als Quelle der Tumorangio-genese wurde nahezu ausgeschlossen. Da das Knochenmark ein heterogenes Organ ist, daß neben hämatopoetischen auch andere Vorläuferzellen beherbergt (Endothel, Mesothel, Osteoblasten, Muskelstammzellen u.a.), liessen sich mit diesem Modell die Fragestellungen im Zusammenhang zirkulierender Vorläuferzellen und der Tumorangio-genese beantworten.

Ein hoher Anteil der Zellen, die sich in unmittelbarer Nähe der Tumorgefäße fanden, entstammten dem gesunden Organismus und bestanden nicht aus genetisch alterierten eigentlichen Tumorzellen. Wir fanden also in den Transplantationsexperimenten, daß 66+-8% der JC gefäßrandständigen Zellen Y-Chromosom positiv waren, bei WEHI 164-Tumoren 60+-9%. Dies warf die Frage nach der Zuordnung und dem Ursprung der restlichen Zellen im Gefäßperimeter auf. Es ist denkbar, daß ein Teil dieser vermeintlich Y-Chromosom negativen Zellen ihr Y-Chromosom während des Schneidens der Cryokonservate verloren haben und nur darum in der FISH-Analyse negativ waren. Alternativ könnten Tumorzellen in die Gefäßwände mit eingewoben sein und in direktem Kontakt mit dem Blutstrom stehen. Solche Mosaik-Blutgefäße sind bisher in verschiedensten Tumortypen beschrieben worden, zum Beispiel wurde bei Humanen Colon Carcinom Xenotransplantaten in immundefizienten Mäusen nachgewiesen, daß bis zu 25% der gefäßumgebenden Zellen von Tumorzellen gebildet wurden [120].

Einige der Y-Chromosom negativen Nuclei könnten auch von nicht-malignen, zirkulierenden Wirtszellen stammen, die die Myeloablation überlebt haben. Dabei könnte es sich somit um weibliche zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen handeln oder aber um Zellen der Immunabwehr.

Des weiteren könnte sich ein geringer Anteil der normalen weiblichen Wirtszellen von lokal am Metastasierungsort aussprossenden Endothelzellen ableiten. Unsere Untersuchungen zielten jedoch nicht auf eine Unterscheidung zwischen normalen, weiblichen Zellen des Wirtstieres und weiblichen Tumorzellen ab.

Die zelluläre Zusammensetzung von Gefäßwänden variiert zwischen verschiedenen Tumortypen. In einigen Tumoren weisen die Gefäßwände hauptsächlich genetisch normale Endothelzellen auf, welche von zirkulierenden Endothelialen Vorläuferzellen abstammen, wie für die Tumoren JC und WEHI 164 beschrieben. Andere murine und humane Tumorzelltypen zeigen unter Umständen andere Eigenschaften ihrer Gefäßwände. Beispielsweise beinhalten humane myc-amplifizierte Neuroblastomzellen endotheliale Mikrogefäße, welche von malignen Zellen geformt werden, in einer Größenordnung von 20-78% [113]. Des weiteren können Tumorendothelzellen stark genetisch verändert sein und abhängig von ihrer Lokalisation im Tumor und vom Tumorstadium unterschiedliche Charakteristika aufweisen, wie unter dem Elektronenmikroskop aufgezeigt wurde [121; 122]. Im Vergleich von Endothelzellen gesunden Gewebes mit solchen aus Tumorgewebe zeigen sich deutliche genetische Unterschiede, welche in antiangiogenetische Therapiekonzepte einbezogen werden müssen. Vielleicht ist dies auch ein Grund, warum bisher entwickelte therapeutische antiangiogenetische Substanzen wie zum Beispiel Anti-VEGF gerichtete Medikamente noch keinen einheitlichen Erfolg brachten. Immerhin zeigen die Therapieerfahrungen eine komplexe Interaktion zwischen Tumorzellen und Angiogenese auf. Es zeigt sich etwa, daß durch eine Blockade des VEGF-Rezeptors beispielsweise die Expression des Epidermal Growth Factor Rezeptor (EGFR) in Endothelzellen und Tumorzellen hochreguliert wird, und Tumorendothelzellen sich sensibler gegenüber Epidermal Growth Factor (EGF) erweisen. Welche Konsequenzen sich hieraus bezüglich einer Therapieresistenz ergeben, wird aktuell noch erforscht, es ist aber anzunehmen, daß die genetisch veränderten Endothelzellen auch anders auf Bestrahlung oder medikamentöse Therapie ansprechen [134; 135]. Ein anderer interessanter Aspekt ist die Bildung von sogenannten Pseudogefäßen, also aus Tumorzellen bestehende tunnelförmige Höhlen ohne die normale Struktur eines Gefäßes. Sie könnten vor allem in Arealen, welche räumlich weit vom normalen Gefäßsystem entfernt liegen eine große Rolle spielen. Immerhin wird die grundsätzliche Frage, ob endotheliale Vorläuferzellen überhaupt an der Tumolvaskulogenese beteiligt sind, in der Literatur kontrovers diskutiert. So folgerten Göthert et al. aufgrund ihrer Daten, daß aus dem Knochenmark stammende Zellen an der Angiogenese in Tumoren nicht beteiligt sind [44]. Diese Autoren verwendeten ein endothelzellspezifisches, induzierbares, transgenetisches Modell, in dem durch Tamoxifen induziert in den verwendeten Mäusen Betagalactosidase (LacZ)

oder „enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) gebildet wurde, so daß es als Oberflächenmarker nachweisbar war. Die Gruppe zeigte, daß nach der Transplantation von Knochenmark dieser Eigenschaft in normale Empfängertiere, sich in anschließend implantierten Tumoren keine Aktivität von LacZ oder EYFP nachweisen ließ. Ließ man hingegen in den genetisch veränderten Tieren Tumoren wachsen, konnte LacZ in den Endothelzellen des Tumors nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe folgerte aus den Ergebnissen, daß in dem Modell keine aus dem Knochenmark stammenden Zellen an der Tumorangiogenese beteiligt waren. Im Vergleich zu unseren Experimenten waren die Zeitpunkte von Tumorwachstum und Untersuchung etwas anders gewählt, und es wurden andere Tumortypen (Lewis lung carcinoma und B6RV2 Lymphomzellen) verwendet. Die Arbeitsgruppe um Purhonen et al. zweifelte die Möglichkeit der Entstehung von Tumorendothel aus zirkulierenden Vorläuferzellen an, da sie die Differenzierung zu reifen Endothelzellen aus Knochenmarkstammzellen im Erwachsenen generell als extrem seltenes Ereignis ansahen [133]. Immerhin zeigten auch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen im Gegensatz dazu, daß in den von ihnen jeweils gewählten Versuchsaufbauten eine Beteiligung von aus dem Knochenmark stammenden Endothelzellen an der Tumorigenese möglich war [43]. Leyden et al. verwendeten Mäuse, welche aufgrund eines angiogenetischen Defektes tumorresistent waren und nach Transplantation von wild-type Knochenmark konnte in diesen Mäusen ein Tumorwachstum mit Nachweis aus dem Knochenmark stammender Endothelzellen erreicht werden. Diese Ergebnisse zeigen, daß die im Rahmen dieser Dissertationsarbeit beschriebenen Befunde an den WEHI- und JC-Tumoren keine Ausnahme darstellen und stützen die von uns vertretene Hypothese, daß Zellen aus dem Knochenmark an der Tumorigenese beteiligt sind.

Wie in der Einleitung beschrieben, hängt das Einwandern von Stammzellen in ein Gebiet der Angiogenese von diversen Kaskaden und Zytokingradienten ab, welche teils als Einzelwirkstoffe, nicht aber in ihrem komplexen Zusammenspiel erfasst sind. Es ist also durchaus denkbar, daß die Menge der an der Vaskulogenese beteiligten Vorläuferzellen entscheidend vom Tumortyp abhängt, je nach dessen Fähigkeit, proangiogenetische Reize auszusenden. Es ist ebenfalls denkbar, daß lokale sauerstoff- und gefäßversorgungsabhängige Faktoren im Gewebe und in Neoplasien einen Einfluß auf den Anteil der aus dem Knochenmark stammenden Endothelzellen haben.

Die von uns erarbeiteten Daten zeigen an diesen Tumoren, daß unter Umständen unterschiedliche Ursprungszellen an der Tumorigenese beteiligt sind. Wir gehen davon aus, daß Vorläuferzellen aus dem Knochenmark an der Tumorigenese bzw. -vaskulogenese beteiligt sind. Die Frage, ob es sich dabei um endotheliale Vorläuferzellen im engeren Sinne handelt oder um andere Zelltypen, die den Phänotyp einer Tumorendothelzelle entwickeln, können wir anhand dieser Daten nicht klären.

Die präzise Natur der Hierarchie von Endothelialen Vorläuferzellen ist immer noch unbekannt. In der Embryogenese wird eine gemeinsame hämatopoetische Vorläufer-/Stammzelle mit der Kapazität zur Differenzierung in hämatopoetische und endotheliale Zelllinien beschrieben (siehe Abschnitt 1.1.2.1). Im erwachsenen Organismus mag die Progenitorzelle spezialisierter sein, in der Lage zur Selbsterneuerung und Differenzierung in endotheliale Zelltypen. Das Vorhandensein von hämangiopoetischen Progenitor- oder Stammzellen im Erwachsenen, welche die Möglichkeit besitzen, von einem Vorläuferzelltyp in einen anderen zu transdifferenzieren, wird kontrovers diskutiert. Das Knochenmark ist ein heterogenes Organ, welches Vorläuferzellen unterschiedlicher Zelltypen beherbergt. In der für jeden Zelltyp spezifischen Nische im Knochenmark werden Progenitorzellen einer Reihe von Stimuli exponiert, welche in ihrer Komplexität noch nicht erfasst sind. Die Transplantation von Knochenmark führt zur bleibenden und kompletten Wiederherstellung der Hämatopoese, was heute ein nicht mehr wegzudenkendes klinisch-therapeutisches Prinzip ist. Knochenmarkzellen können relativ einfach gewonnen werden und migrieren autonom in Organe nach intravenöser Injektion. Dieser Umstand macht Knochenmarkzellen sehr attraktiv für gentherapeutische Ansätze. In Bezug auf maligne Erkrankungen ist es das Ziel, Knochenmarkzellen so zu verändern, daß sie in das Tumorgefäßbett einwandern und eine Vaskularisation des Tumorgewebes verhindern.

Es zeigt sich somit, daß Gefäßwände in murinen JC und WEHI Tumoren zum Teil von zirkulierenden Endothelzellen aus dem Knochenmark geformt werden. Die Arbeit beschreibt ein experimentelles Modell, in dem für in-vitro Kultur und Manipulation geerntete Knochenmarkzellen im Tumorgefäßbett wiedergefunden werden können. Die Experimente zeigen jedoch auch, daß einige der CD31 positiven Endothelzellen kein Y-Chromosom tragen und somit ein Anteil an männlichen und CD31 positiven Zellen in den Tumoren nicht allein aus dem Knochenmark stammt, sondern von weiblichen Endothelzellen aus einer anderen Quelle gebildet wird.

Daraus folgern wir, daß ein Anteil an männlichen und CD31 positiven Zellen in den Tumoren nicht allein aus dem Knochenmark stammt, sondern von männlichen Endothelzellen aus einer anderen Quelle gebildet wird. Es handelt sich hier am ehesten um Endothelzellen, welche durch Aussprossen aus dem Gebiet um den Tumor herum zur Gefäßbildung beitragen. Wir gehen anhand der Ergebnisse davon aus, daß es sich bei der Gefäßbildung im gewählten Versuchsaufbau um eine Mischform aus Angiogenese (Aussprossen von Endothelzellen aus benachbartem, gesunden Gewebe) und Vaskulogenese (Einwandern endothelialer Vorläuferzellen in den Tumor und de-novo-Gefäßsynthese) handelt. Um hier genau unterscheiden zu können, müsste ein ähnlicher Versuchsaufbau erfolgen, in dem die Tumorschnitte von der Peripherie zum Zentrum hin markiert werden, wobei zum Zentrum des Tumors hin die Vaskulogenese die Angiogenese zunehmend

ablösen müsste. Aus den durchgeführten Experimenten schließen wir, daß beide Mechanismen zur Gefäßbildung in Tumoren beitragen. Die Gewichtung von Angio- und Vaskulogenese hängt aber sicherlich im Wesentlichen vom Tumortyp ab.

Aus den vorliegenden Daten folgern wir zusammengefasst, daß Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in dem von uns gewählten Modell an der Angiogenese und Vaskulogenese von WEHI- und JC-Tumoren beteiligt sind. Wir gehen davon aus, daß sich die Tumorangiogenese aus einer Mischung aus Vaskulogenese durch Einwandern von Endothelzellen in den Tumor und aus Angiogenese durch Aussprossen von Endothelzellen aus umliegenden Gefäßen rekrutiert. Das Ausmaß beider beteiligten Mechanismen ist vom Tumorstadium, Lokalisation im Tumor und Tumortyp abhängig.

## 6 Zusammenfassung

In dieser Dissertationsarbeit wurde die Frage erörtert, ob aus dem Knochenmark stammende endotheliale Zellen an der Tumolvaskulogenese beteiligt sind.

Hierzu wurden zunächst männlichen Balb/c-Mäusen weibliche WEHI- und JC-Tumoren subcutan in den Nacken implantiert und weiblichen Balb/c-Mäusen männliche VLM-Tumoren. In diesem ersten Experiment konnten zunächst nach morphologischen Kriterien Zellen des Empfängertieres in Gefäßwänden der Tumoren nachgewiesen werden.

In einem weiteren Experiment wurden weibliche Balb/c-Mäuse subletal bestrahlt und anschließend eine Knochenmarktransplantation von männlichem Knochenmark durchgeführt. Nach drei Wochen wurden den Tieren weibliche WEHI- und JC-Tumoren (als Gruppe A / B bezeichnet) subcutan in den Nacken implantiert. Nach vier Wochen wurden die Tumoren und das Knochenmark (beispielhaft an einigen Tieren) analysiert.

In einem dritten Experiment wurden männliche Balb/c-Mäuse subletal bestrahlt, anschließend erfolgte eine Knochenmarktransplantation mit weiblichem Knochenmark. Nach drei Wochen wurden den Tieren weibliche WEHI- und JC-Tumoren subcutan in den Nacken implantiert (als Gruppe C / D bezeichnet).

Im Knochenmark einiger Tiere der Gruppen A, B, C und D wurde beispielhaft mittels relativ quantitativer PCR das Vorliegen eines kompletten Chimerismus nachgewiesen.

Die Tumoren aus den Experimenten nach Knochenmarktransplantation wurden mittels der im Labor neu etablierten Kombinationsfärbung CD31 und FISH analysiert. Es wurden die CD31 positiven und gleichzeitig männlichen Zellen in Gefäßwänden gezählt.

Wir konnten so die Beteiligung aus dem Knochenmark stammender Endothelzellen an der Tumolvaskulogenese nachweisen. Allerdings handelt es sich nach Interpretation unserer Ergebnisse um eine Mischung aus Vaskulogenese und Angiogenese, da in den Gruppen C und D trotz deutlich weniger nachgewiesenen männlichen Zellen in den Tumoren ein hoher Prozentsatz dieser auch CD31 positiv ist.

## 7 Literaturverzeichnis

- 1 Jacobsen LO, Marks EK, Robson MJ: Effect of spleen protection on mortality following x-irradiation. *J Lab Clin Med* 34, 1538-1543 (1949)
- 2 Lorenz E, Uphoff D, Reid TR, Shelton E: Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst* 12, 197-201 (1951)
- 3a Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L: A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 51, 29-36 (1964)
- 3b Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L: Isolation of variant cell lines during serial transplantation of hematopoietic cells derived from fetal liver. *J Natl Cancer* 33, 707-720 (1964)
- 4 Cogle CR, Wainman DA, Jorgensen ML, Guthrie SM, Mames RN, Scott EW: Adult human hematopoietic cells provide functional hemangioblast activity. *Blood* 103, 133-135 (2004)
- 5 Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breiman ML, Schuh AC: Failure of blood island formation and vasculogenesis in FLK-1-deficient-mice. *Nature* 376, 62-66 (1995)
- 6 Kallianpur AR, Jordan JE, Brandt SJ: The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular Systems during embryogenesis. *Blood* 83,1200-1208 (1994)
- 7 Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J: FLK-1, an flt-related Receptor tyrosine kinase is an early Marker for endothelial cell precursors. *Development* 118, 489-498 (1993)
- 8 Iwama A, Hamaguchi I, Hashiyama M, Murayama Y, Yasunaga K, Suda T: Molecular cloning and characterization of mouse TIE and TEK receptor kinase genes and their expression in hematopoietic stem cell. *Biochem Biophys Res Commun* 195, 301-309 (1993)

- 9** Bernex F, De Sepulveda P, Kress C, Elbaz C, Delouis C, Panthier JJ: Spatial and temporal patterns of c-kit-expressing cells in *WlacZ/+* and *WlacZ/WlacZ* mouse embryos. *Development* 122, 3023-3033 (1996)
- 10** Young PE, Baumhueter S, Lasky LA: The sialomucin CD34 is expressed on hematopoietic cells and blood vessels during murine development. *Blood* 85, 96-105 (1995)
- 11** Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN, Byrne BJ, Vaught T, Spoerri PE, Peck AB, Scott EW: Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 8, 607-612 (2002)
- 12** Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE: Decline in colony-forming ability of marrow cells subjected to serial transplantation into irradiated mice. *J Cell Physiol* 64, 23-31 (1964)
- 13a** Curry JL, Trentin JJ: Hemopoietic spleen colony studies. I. Growth and differentiation. *Dev Biol* 15, 395-413 (1967)
- 13b** Curry JL, Trentin JJ, Wolf N: Hemopoietic spleen colony studies. II. Erythropoiesis. *J Exp Med* 125, 703-720 (1967)
- 14** Metcalf D, Burgess AW: Clonal analysis of progenitor cell commitment of granulocyte or macrophage production. *J Cell Physiol* 111, 275-283 (1982)
- 15** Blackett N, Gordon M: „Stochastic“- 40 years of use and abuse. *Blood* 93, 3148-3149 (1999)
- 16** Blackett NM: Haematopoietic spleen colony growth: a versatile, parsimonious, predictive model. *Cell Tissue Kinet* 20, 393-402 (1987)
- 17** Boucher K, Yakovlev AY, Mayer-Proschel M, Nobel M: A stochastic model of temporally regulated generation of oligodendrocytes in cell culture. *Math Biosci* 159, 47-78 (1999)
- 18** Agur Z, Daniel Y, Ginosar Y: The universal properties of stem cells as pinpointed by a simple discrete model. *J Math Biol* 44, 79-86 (2002)

- 19** Spangrude GJ, Müller-Sieburg CE, Heimfeld S, Weissman IL: Two rare populations of mouse Thy-1 low bone marrow cells repopulate the thymus. *J Exp Med* 167, 1671-1683 (1988)
- 20** Uchida N, Weissman IL: Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1 low Lin-Sca-1-positive cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *J Exp Med* 175, 175-184 (1992)
- 21** Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M: Human bone marrow CD34- cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells. *Exp Hematol* 26, 353-360 (1998)
- 22** Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, Grupp SA, Sieff CA, Mulligan RC, Johnson RP: Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 3, 1337-1345 (1997)
- 23** Kinashi T, Springer TA: : Adhesion molecules in hematopoietic cells. *Blood Cells* 20, 25-44 (1994)
- 24** Craddock CF, Nakamoto B, Andrews RG, Priestley GV, Papayannopoulou T: Antibodies to VLA4 integrin mobilize long-term repopulating cells and augment cytokine-induced mobilization in primates and mice. *Blood* 90, 4779-4788 (1997)
- 25** Möhle R, Murea S, Kirsch M, Haas R: : Differential expression of L-selectin, VLA-4, and LFA-1 on CD34 positive progenitor cells from bone marrow and peripheral blood during G-CSF-enhanced recovery. *Exp Hematol* 23, 1535-1542 (1995)
- 26** Möhle R, Moore MA, Nachman RL, Rafii S: Transendothelial migration of CD34 positive and mature hematopoietic cells: an in vitro study using a human bone marrow-endothelial cell line. *Blood* 89, 72-80 (1997)
- 27** Khaldoyanidi S, Denzel A, Zöller M: Requirement for CD44 in proliferation and homing of hematopoietic precursor cells. *J Leuc Biol* 60, 579-592 (1996)

- 28** Yong KL, Watts M, Shaun TN, Sullivan A, Ings S, Linch DC: Transmigration of CD34 positive cells across specialized and nonspecialized endothelium requires prior activation by growth factors and is mediated by PECAM-1(CD31). *Blood* 91, 1196-1205 (1998)
- 29** Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss MJ, Chen J, Rosenblatt M, Alt FW, Orkin SH: : An early hematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371, 221-226 (1994)
- 30** Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ: Multi-Organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105, 369-377 (2001)
- 31** Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC: Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401, 390-394 (1999)
- 32** Ashara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM: Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85, 221-228 (1999)
- 33** Butcher EC, Picker LJ: : Review: Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272, 60-66 (1996)
- 34** Kumar S, West DC, Ager A: Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels. *Differentiation* 36, 5-70 (1987)
- 35** Ferrara N: Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int* 56, 794-814 (1999)
- 36** Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD: Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87, 1171-1180 (1996)

**37** Sankar S, Mahooti-Brooks N, Bensen L, McCarthy TL, Centrella M, Madri JA: Modulation of transforming growth factor beta receptor levels on microvascular endothelial cells during in vitro angiogenesis. *J Clin Invest* 97, 1436-1446 (1996)

**38** Levin EG, Santell L, Osborn KG: The expression of endothelial tissue plasminogen activator in vivo: a function defined by vessel size and anatomic location. *J Cell Sci* 110, 139-148 (1997)

**39** Pober JS, Cotran RS: Review: The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 50, 537-544 (1990)

**40** Folkman J: Role of Angiogenesis in Tumor Growth and Metastasis. *Semin Oncol* 29, 15-18 (2002)

**41** Folkman J, Shing Y: Minireview: Angiogenesis. *J Biol Chem* 267, 10931-10934 (1992)

**42** Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wjelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP: Evidence for circulating bone-marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92, 362-367 (1998)

**43** Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MAS, Hajar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S: Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 7, 1194-1201 (2001)

**44** Göthert JR, Gustin SE, van Eekelen JAM, Schmidt U, Hall MA, Jane SM, Green AR, Göttgens B, Izon DJ, Begley CG: Genetically tagging endothelial cells in vivo: bone-marrow-derived cells do not contribute to tumor endothelium. *Blood* 104, 1769-1777 (2004)

**45** Christopher R, Coole, Edward W. Scott: The hemangioblast: Cradle to clinic. *Exp Hematol* 32, 885-890 (2004)

**46** Zhang WJ, Park C, Arentson E, Choi K: Modulation of hematopoietic and endothelial cell differentiation from mouse embryonic stem cells by different culture conditions.

Blood 105, 111-114 (2005)

**47** Folkman J: Angiogenesis and c-Jun. J Natl Cancer Inst 96, 644 (2004)

**48** Folkman J: What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?  
J Natl Cancer Inst 83: 4-6 (1990)

**49** Conejo-Garcia JR, Buckanovich RJ, Benencia F, Courreges Maria C, Rubin SC, Carroll RG, Coukos G: Vascular leukocytes contribute to tumor vascularization. Blood 105, 679-681 (2005)

**50** Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welch L, Alitalo K: Review: Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. Cancer Res 60, 203-212 (2000)

**51** Terres K und Peters SO: Regulationsmechanismen hämatopoetischer Stammzellen.  
FOCUS MUL 19, 231-237 (2002)

**52** Glimcher LH, Singh H: : Transcription factors in lymphocyte development- T and B cells get together. Cell 96, 13-23 (1999)

**53** Jackson KA, Mi T, Goodell MA: Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci USA 96, 14482-14486 (1999)

**54** O'Neill A and Schaffer DV: Review: The biology and engineering of stem-cell control.  
Biotechnol Appl Biochem 40, 5-16 (2004)

**55** Quesenberry PJ, Colvin G, Abedi M: Perspective: Fundamental and clinical concepts on stem cell homing and engraftment: A journey to niches and beyond. Exp Hematol 33, 9-19 (2005)

**56** Nilsson SK, Dooner MS, Tiarks CY, Weier HU, Quesenberry PJ: Potential and distribution of transplanted hematopoietic stem cells in a nonablated mouse model. Blood 89, 4013-4020 (1997)

**57** Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA: Spatial localization of transplanted hematopoietic stem cells: interferences for the localization of stem cell niches. Blood 97, 2293-2299 (2001)

- 58** Schonfield R: The relationship between the CFU-s and the hematopoietic stem cell. *Blood Cells* 25, 4-7 (1978)
- 59** Hendriks PJ, Martens ACM, Hagenbeek A, Keij JF, Visser JWM: Homing of fluorescently labeled murine hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 24, 129-140 (1996)
- 60** Micklem HS, Clarke CM, Evans EP, Ford CE: Fate of chromosome-marked mouse bone marrow cells transfused into normal syngeneic recipients. *Transplantation* 6, 299-302 (1968)
- 61** Takada Y, Takada A: Proliferation of donor hematopoietic cells in irradiated and unirradiated host mice. *Transplantation* 12, 334-338 (1971)
- 62** Saxe DF, Boggs SS, Boggs DR: Transplantation of chromosomally marked syngeneic marrow cells into mice not subjected to hematopoietic stem cell depletion. *Exp Hematol* 12, 277-283 (1984)
- 63** Brecher G, Ansell JD, Micklem HS, Tijo JH, Cronkite EP: Special proliferative sites are not needed for seeding and proliferation of transfused bone marrow cells in normal syngeneic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 5085-5087 (1982)
- 64** Stewart FM, Zhong S, Lambert JF, Colvin GA, Abedi M, Dooner MS, McAuliffe CI, Wang H, Hsieh C, Quesenberry PJ: Host marrow stem cell potential and engraftability at varying times after low-dose whole-body irradiation. *Blood* 98, 1246-1251 (2001)
- 65** Park IK, He Y, Lin F, Laerum OD, Tian Q, Bumgarner R, Klug CA, Li K, Kuhr C, Doyle MJ, Xie T, Schummer M, Sun Y, Goldsmith A, Clarke MF, Weissman IL, Hood L, Li L: Differential gene expression profiling of adult murine hematopoietic stem cells. *Blood* 99, 488-498 (2002)
- 66** Rosmarin AG, Yang Z, Resendes KK: Transcriptional regulation in myelopoiesis: Hematopoietic fate choice, myeloid differentiation, and leukemogenesis. *Exp Hematol* 33, 131-143 (2005)
- 67** Roeder I, Kamminga LM, Braesel K, Dontje B, de Haan G, Loeffler M: Competitive clonal hematopoiesis in mouse chimeras explained by a stochastic model of stem cell organization. *Blood* 105, 609-616 (2005)

- 68** Kerbel RS: Abstract: Tumor angiogenesis: Past, present and the near future. *Carcinogenesis* 21, 505-515, (2000)
- 69** Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF: Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 75, 2417-2426 (1990)
- 70** Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM: Mini review: Mesenchymal stem cells: Cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 95, 209-214 (2004)
- 71** Peters SO, Bauermeister K, Simon JP, Branke B, Wagner T: Quantitative polymerase chain reaction-based assay with fluorogenic y-chromosome specific probes to measure bone marrow chimerism in mice. *J Immunol Methods* 260, 109-116 (2002)
- 72** Flore O, Rafii S, Scott E, O`Leary JJ, Hyjek EM, Cesarman E: Transformation of primary human endothelial cells by Kaposi`s sarcoma-associated herpesvirus. *Nature* 394, 588-592 (1998)
- 73** Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA: Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298, 850-854 (2002)
- 74** Horny HP, Horst HA: Reactivity of axillary lymph nodes draining invasive breast carcinomas: Immunohistochemical evidence of tumor-associated reactions of B and T regions. *Oncol Rep* 1, 375-380 (1994)
- 75** Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T: Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 107, 1322-1328 (2003)
- 76** Percec I, Plenge RM, Nadeau JH, Bartolomei MS, Willard HF: Autosomal dominant mutations affecting X inactivation choice in the mouse. *Science* 296, 1136-1139 (2002)

- 77** Tang Q, Hendricks RL: Interferon Y regulates platelet endothelial cell adhesion molecule 1 expression and neutrophil infiltration into herpes simplex virus-infected mouse corneas. *J Exp Med* 184, 1435-1447 (1996)
- 78** Nilsson SK, Hulspas R, Weier HU G, Quesenberry PJ: In situ detection of individual transplanted bone marrow cells using FISH on sections of paraffin-embedded whole murine femurs. *J Histochem Cytochem* 44, 1069-1074 (1996)
- 79** Peters SO, Kittler ELW, Ramshaw HS, Quesenberry PJ: Murine marrow cells expanded in culture with IL-3, IL-6, IL-11, and SCF acquire an engraftment defect in normal hosts. *Exp Hematol* 23, 461-469 (1995)
- 80** Deans RJ, Moseley AB: Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 28, 875-884 (2002)
- 81** Keshet E, Ben-Sasson SA: Anticancer drug targets: Approaching angiogenesis. *J Clin Invest* 104, 1497-1501 (1999)
- 82** Jimenez B, Volpert OV: Mechanistic insights on the inhibition of tumor angiogenesis. *J Mol Med* 78, 663-672 (2001)
- 83** Gaugler MH, Squiban C, Mouthon MA, Gourmelon P, Van der Meeren A: : Irradiation enhances the support of haemopoietic cell transmigration, proliferation and differentiation by endothelial cells. *Br J Haematol* 113, 940-950 (2001)
- 84** Chaudhury A, Elkins M, Koziem D, Nakada MT: Regulation of PECAM-1 in endothelial cells during cell growth and migration. *Exp Biol Med* 226, 686-691 (2001)
- 85** Lagaaij EL, Cramer-Knijnenburg GF, Van Kemenade FJ, Van Es LA, Bruijn JA, Van Krieken JH: Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection. *Lancet* 357, 33-37 (2001)

- 86** Stoll BR, Migliorini C, Kadambi A, Munn LL, Jain RK: A mathematical model of the contribution of endothelial progenitor cells to angiogenesis in tumors: Implications for antiangiogenic therapy. *Blood* 102, 2555-2561 (2003)
- 87** Jiang S, Walker L, Afentoulis M, Anderson DA, Jauron-Mills L, Corless CL, Fleming WH: Transplanted human bone marrow contributes to vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 16891-16896 (2004)
- 88** Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, Heissi B: Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer* 2, 826-835 (2002)
- 89** Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM: Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 109, 337-346 (2002)
- 90** Moore MA: Putting the neo into neoangiogenesis. *J Clin Invest* 109, 313-315 (2002)
- 91** Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schäfer B, Hossfeld DK, Fiedler W: In vitro differentiation of endothelial cells from AC-133-positive progenitor cells. *Blood* 95, 3106-3112 (2002)
- 92** Marchetti S, Gimond C, Iljin K, Bourcier C, Alitalo K, Pouyssegur J, Pages G: Endothelial cells genetically selected from differentiating mouse embryonic stem cells incorporate at sites of neovascularization in vivo. *J Cell Sci* 115, 2075-2085 (2002)
- 93** Davidoff AM: Bone marrow-derived cells contribute to tumor neovasculature and, when modified to express an angiogenesis inhibitor, can restrict tumor growth in mice. *Clin Cancer Res* 7, 2870-2879 (2001)
- 94** Arafat WO, Casado E, Wang M, Alvarez RD, Siegal GP, Glorioso JC, Curiel DT, Gomez-Navarro J: Genetically modified CD34 positive cells exert a cytotoxic bystander effect on human endothelial and cancer cells. *Clin Cancer Res* 6, 4442-4448 (2000)

- 95** Miraglia S, Godfrey W, Buck D: A response to AC 133 hematopoietic stem cell antigen: Human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family? *Blood* 91, 4390-4391 (1998)
- 96** Cameliet P, Moons L, Lutun A, Vincenti V, Compemole V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, Di Palma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, Vandendriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Chamock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG: Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 7, 575-583 (2001)
- 97** Gomez-Navarro J, Contreras JL, Arafat W, Jiang XL, Krisky D, Oligino T, Marconi P, Hubbard B, Glorioso JC, Curiel DT, Thomas JM: Genetically modified CD34 positive cells as cellular vehicles for gene delivery into areas of angiogenesis in a rhesus model. *Gene Ther* 7, 43-52 (2000)
- 98** Levenberg S, Golub JS, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Langer R: Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 4391-4396 (2002)
- 99** Vittet D, Prandini MH, Berthier R, Schweitzer A, Martin-Sisteron H, Uzan G, Dejana E: Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood* 88, 3424-3441 (1996)
- 100** Kabrun N, Buhring HJ, Choi K, Ullrich A, Risau W, Keller G: Flk-1 expression defines a population of early embryonic haematopoietic precursors. *Development* 124, 2039-2048 (1997)
- 101** Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G: A common precursor for haematopoietic and endothelial cells. *Development* 125, 725-732 (1998)
- 102** Jackson KA, Mi T, Goodell MA: Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 14482-14486 (1999)
- 103** Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM:

Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49 (2002)

**104** Terres Bauermeister K, Stölting S, Kaczmarek PM, Nadrowitz R, Wagner T, Peters SO: Hematopoietic progenitor cells residing in muscle engraft into bone marrow following transplantation. *Int J Hematol* 79, 488-494 (2004)

**105** Okamoto R, Ueno M, Yamada Y, Takahashi N, Sano H, Suda T, Takakura N: Hematopoietic cells regulate the angiogenic switch during tumorigenesis. *Blood* 105, 2757-2763 (2005)

**106** Machein MR, Renninger S, de Lima-Hahn E, Plate KH: Minor contribution of bone-marrow derived endothelial progenitors to the vascularization of murine gliomas. *Brain Pathol* 13, 582-597 (2003)

**107** Di Tomaso E, Capen D, Haskell A, Hart J, Logie JJ, Jain RK, McDonald DM, Jones R, Munn LL: Mosaic tumor vessels: cellular basis and ultrastructure of focal regions lacking endothelial cell markers. *Cancer Res* 65, 5740-5749 (2005)

**108** Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Peèr J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ: Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: Vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 155, 739-752 (1999)

**109** Streubel B, Chott A, Huber D, Exner M, Jager U, Wanger O, Schwarzingler I: Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 351, 250-259 (2004)

**110** Gunsilius E, Duba HC, Petzer AL, Kahler CM, Grunewald K, Stockhammer G, Gabl C, Dirnhofer S, Clausen J, Gastl G: Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet* 355, 1688-1691 (2000)

**111** Rigolin GM, Fraulini C, Ciccone M, Mauro E, Bugli AM, De Angeli C, Negrini M, Cuneo A, Castoldi G: Neoplastic circulating endothelial cells in multiple myeloma with 13q14 deletion. *Blood* 107, 2531-2535 (2006)

- 112** Fonsato V, Buttiglieri S, Deregibus MC, Puntorieri V, Bussolati B, Camussi G: Expression of Pax2 in human renal tumor-derived endothelial cells sustains apoptosis resistance and angiogenesis. *Am J Pathol* 168, 706-713 (2006)
- 113** Pezzolo A, Parodi F, Corrias MV, Cinti R, Gambini C, Pistoia V: Tumor origin of endothelial cells in human neuroblastoma. *J Clin Oncol* 25, 376-383 (2007)
- 114** Hahn WC, Weinberg RA: Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 347, 1593-1603 (2002)
- 115** Chao TY, Chu TM: Characterization of a new spontaneously developed murine mammary adenocarcinoma in syngeneic BALB/c hosts. *In Vitro Cell Dev Biol* 25, 621-626 (1989)
- 116** Carbone G, Colombo MP, Sensi ML, Cernuschi A, Parmiani G: In vitro detection of cell-mediated immunity to individual tumor-specific antigens of chemically induced BALB/c fibrosarcomas. *Int J Cancer* 31, 483-489 (1983)
- 117** Gerhards RE, Mehnert FE: A set of stage-dependent embryonic antigens expressed in cell cultures of BALB/c mouse embryos and in transformed cell lines. *J Cell Biochem* 31, 27-39 (1986)
- 118** Folpe AL, Chand EM, Goldblum JR, Weiss SW: Expression of Fli-1, a nuclear transcription factor, distinguishes vascular neoplasms from potential mimics. *Am J Surg Pathol* 25, 1061-1066 (2001)
- 119** Von Tell D, Armulik A, Betsholtz C: Pericytes and vascular stability. *Exp Cell Res* 312, 623-629 (2006)
- 120** Chang YS, di Tomaso E, Mc Donald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL: Mosaic blood vessels in tumors: Frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 14608-14613 (2000)
- 121** Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald DM: Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness.

Am J Pathol 156, 1363-1380, (2000)

**122** Hammersen F, Endrich B, Messmer K: The fine structure of tumor blood vessels. I. Participation of non-endothelial cells in tumor angiogenesis. *Int J Microcirc Clin Exp* 4, 31-43 (1985)

**123** Nemeth MJ, Bodine DM: Review: Regulation of hematopoiesis and the hematopoietic stem cell niche by Wnt signaling pathways. *Cell Res* 17, 746-758 (2007)

**124** Hristov M, Erl W, Weber PC: Brief Review: Endothelial Progenitor Cells: Mobilization, Differentiation, and Homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 1185-1189 (2003)

**125** Birdsey GM, Dryden NH, Amsellem V, Gebhardt F, Sahnan K, Hashard DO, Dejana E, Mason JC, Randi AM: Transcription factor Erg regulates angiogenesis and endothelial apoptosis through VE-cadherin. *Blood* 111, 3498-3506 (2008)

**126** Chen Y, Gorshi DH: Regulation of angiogenesis through a micro RNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood* 111, 1217-1226 (2008)

**127** Oh IY, Yoon CH, Hur J, Kim JH, Kim TY, Lee CS, Park KW, Chae IH, Oh BH, Park YB, Kim HS: Involvement of E-selectin in recruitment of endothelial progenitor cells and angiogenesis in ischemic muscle. *Blood* 110, 3891-3899 (2007)

**128** Setiadi H, McEver RP: Clustering endothelial E-selectin in clathrin-coated pits and lipid rafts enhances leukocyte adhesion under flow. *Blood* 111, 1989-1998 (2008)

**129** Pelus LM: Peripheral blood stem cell mobilization: new regimens, new cells, where do we stand. *Curr Opin Hematol* 15, 285-292 (2008)

**130** Nikolova-Krstevski V, Bhasin M, Otu HH, Libermann T, Oettgen P: Gene expression analysis of embryonic stem cells expressing VE-cadherin (CD144) during endothelial differentiation. *BMC Genomics* 22, 240 (2008)

**131** Jandl JH, Minot GR : *Textbook of Hematology, Second Edition; Kapitel 1, 1-9; Little, Brown and Company, Boston (1996)*

- 132** Brockmann MA, Papadimitriou A, Brandt M, Fillbrandt R, Westphal M, Lamszus K: Inhibition of intracerebral glioblastoma growth by local treatment with the scatter factor/ hepatocyte growth factor-antagonist NK 4. *Clin Cancer Res* 9, 4578-4585 (2003)
- 133** Purhonen S, Palm J, Rossi D, Kaskenpää N, Rajantie I, Ylä-Herttuala S, Alitalo K, Weissman IL, Salven P: Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 6620-6625 (2008)
- 134** Eyles CE, Rich JN: Review: Cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J Clin Oncol* 26, 2839-2845 (2008)
- 135** Hida K, Hida Y, Shindoh M: Review: Understanding tumor endothelial abnormalities to develop ideal anti-angiogenic therapies. *Cancer Sci* 99, 459-466 (2008)
- 136** Richter-Ehrenstein C, Rentzsch J, Runkel S, Schneider A, Schönfelder G: Endothelial progenitor cells in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 106, 343-349 (2007)
- 137** Li H, Raia V, Bertolini F, Price DK, Figg WD: Circulating endothelial cells as a therapeutic marker of thalidomide in combined therapy with chemotherapy drugs in a human prostate cancer model. *BJU Int* 101, 884-888 (2008)

## 8 Anhänge

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

**Abb.** Abbildung

**AK** Antikörper

**AT-III** Antithrombin III

**B6RV2** Bezeichnung für ein Lymphom

**CEPs** Circulating Endothelial Progenitor Cells

**DAB** Di-Amino-Benzidin

**DAPI** 4',6-Diamidino-2'-phenylindole-dihydrochloride

**dH<sub>2</sub>O** destilliertes Wasser

**DMEM** Dulbecco's Modified Eagle's Medium

**DNA** Deoxyribonucleic acid

**EtOH** Äthanol

**EYFP** Enhanced Yellow Fluorescent Protein

**EZ** Endothelzelle

**EZM** Extrazelluläre Matrix

**FACS** Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung

**FISH** Fluoreszenz in Situ Hybridisierung

**FITC** Fluoreszein-Iso-Thio-Cyanit

**FKS** Fötales Kälberserum

**GAPDH** Glyceraldehyd Phosphat Dehydrogenase

**HCl** Hydrochlorid/Salzsäure

**HSZ** Hämatopoietische Stammzelle

**HUVEC** Human Umbilical Vein Endothelial Cell

**IgG** Immunglobulin G

**KM** Knochenmark

**LC** Light Cycler

**LLC** Lewis Lung Carcinoma

**LSAB** Labelled Streptavidin Biotin Methode

**Lsg.** Lösung

**min** Minuten

**s** Sekunden

**ml** Milliliter  
**µl** Mikroliter  
**NaCitrat** Natrium-Citrat  
**NaCl** Natriumchlorid  
**NO** Stickstoffoxid  
**PBS** Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung  
**PCR** Polymerase Kettenreaktion  
**RNAse** Ribonuklease  
**rpm** Umdrehungen pro Minute  
**SCL** Stem Cell Leucemia  
**SF / HGF** Scatter Factor / Hepatocyte Growth Factor  
**SZ** Stammzelle  
**TF** Tissue Factor  
**TGF-β** Transforming Growth Factor β  
**t-PA** Tissue Plasminogen Activator  
**Tris** Tris(hydroxymethyl-)aminoethan  
**VZ** Vorläuferzelle

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des ersten Versuchsaufbaus 24  
 Abbildung 2: Schematische Darstellung des Transplantationsmodells 25  
 Abbildung 3: Schematische Darstellung des Light Cycler PCR-Apparates 28  
 Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ablaufes der PCR 29  
 Abbildung 5: Überprüfung der Zelllinie WEHI auf das vorliegende Geschlechtsmerkmal 36  
 Abbildung 6: Überprüfung der Zelllinie JC auf das vorliegende Geschlechtsmerkmal 37  
 Abbildung 7: Überprüfung der Zelllinie VLM auf das vorliegende Geschlechtsmerkmal 37  
 Abbildung 8: Überprüfung des DNA-Gehaltes der Zelllinie VLM 38  
 Abbildung 9: Tumorschnitt nach Implantation von WEHI-Tumorzellen in eine männliche Maus 42  
 Abbildung 10: Tumorschnitt nach Implantation von JC-Tumorzellen in eine männliche Maus 42  
 Abbildung 11: Balkendiagramm: Darstellung der Gesamtzahl männlicher Zellen in weiblichen Tumoren 43  
 Abbildung 12: Nachweis männlicher Endothelzellen in weiblichen Tumoren nach

## Knochenmarktransplantation 46

Abbildung 13: Balkendiagramm: Vergleich der Gesamtzahl männlicher Zellen in den Tumorschnitten mit der Zahl männlicher, CD31 positiver Zellen 47

### 8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Darstellung des Gesamt-DNA-Gehaltes im Knochenmark exemplarisch ausgewählter Tiere 40

Tabelle 2: Darstellung des männlichen DNA-Gehaltes im Knochenmark exemplarisch ausgewählter Tiere 40

Tabelle 3: Darstellung des Verhältnisses Gesamt-DNA zu männlicher DNA im Knochenmark exemplarisch ausgewählter Tiere 41

## 8.4 Tierantrag

Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten • Postfach 5009 • 24062 Kiel

Ministerium für Umwelt,  
Natur und Forsten  
des Landes Schleswig-Holstein

Herrn  
PD Dr. Stefan Peters  
Medizinische Klinik I  
der Medizinischen Universität  
zu Lübeck  
Ratzeburger Allee 160

23538 Lübeck

Ihr Zeichen / vom

Antrag vom 30.01.2002  
Neuantrag vom 14.08.2002

Mein Zeichen / vom

V 253-72241.122-4 (19-2/02)

Telefon (0431)

988-7224  
Frau Köster

Datum

24 . September 2002

### Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Sehr geehrter Herr Dr. Peters,

gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des Versuchsvorhabens

Differenzierung von Tumorendothel- und Stromazellen aus transplantierten hämatopoetischen Vorläuferzellen

zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 52 Mäuse verwendet werden.

Mercatorstraße 3  
24106 Kiel  
Telefon 0431 988-0  
Telefax 0431 988-7239

Buslinien ab Hauptbahnhof:  
11, 500, 501, 502, 900, 901  
-Haltestelle Elendsredder,  
33, 61, 62  
-Haltestelle Mercatorstraße

2. Die Genehmigung ist bis zum 31. März 2003 befristet.

Sie kann auf formlosen, hinreichend begründeten Antrag um ein Jahr verlängert werden, sofern keine wesentlichen Änderungen der Genehmigungsvoraussetzungen eingetreten sind.

3. Leiter des Versuchsvorhabens:

Herr PD. Dr. Stefan Peters

4. Sein Stellvertreter:

Frau Dr. Kathrin Terres

5. Wechselt der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter, so ist mir diese Änderung unverzüglich anzuzeigen; die Genehmigung gilt weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats widerrufen wird.

6. Verantwortlicher Tierarzt nach § 9 Abs. 2 Nr. 8 Tierschutzgesetz:

Herr Dr. R. Noel

7. Weitere Nebenbestimmungen:

Bei erheblicher Belastung der Tiere ist der Versuch vorzeitig zu einem definierten Zeitpunkt abzubrechen.

Die Bestimmungen der §§ 8, 9 und 9a Tierschutzgesetz sowie der §§ 116 und 117 des Landesverwaltungsgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Juni 1992 (GVOBl. Schl.-H. S. 243) sind zu beachten.

Ich weise insbesondere darauf hin, daß Tierversuche nur durch den in § 9 Abs. 1 Tierschutzgesetz genannten Personenkreis durchgeführt werden dürfen.

**Rechtsbehelfsbelehrung**

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Zustellung schriftlich oder zur Niederschrift des Urkundsbeamten der Geschäftsstelle Klage beim Verwaltungsgericht Schleswig-Holstein in 24837 Schleswig, Brockdorff-Rantzau-Straße 13, erhoben werden.

Mit freundlichen Grüßen

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Dr. Irmer".

Dr. Irmer

## 9 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Stefan O. Peters herzlich für seine Ratschläge und Geduld.

Insbesondere möchte ich mich auch bei Stephanie Stoelting, Katrin Teres, Phillip Simon, Zouhair Aherrahrou, Biggi Branke, Claudia Kauderer, Monika Vollmert und Heike Albrecht bedanken, die mir bei den Experimenten im Labor stets mit konstruktiver Kritik und guten Ratschlägen weiterhalfen.

Auch bei allen anderen Mitarbeitern des hämatologischen Labors möchte ich mich für die stets freundliche Zusammenarbeit bedanken. Des weiteren danke ich Prof. Dr.med Thomas Wagner für die Überlassung des Arbeitsplatzes und Materials, sowie Dr. med Roger Nadrowitz für die Durchführung der Bestrahlung der Versuchstiere.

Dem Institut für Pathologie danke ich für die Nutzung der Räumlichkeiten für die Versuche am Light Cycler.

## 10 Lebenslauf

BIELEFELDERSTRASSE 34 • 32 756 DETMOLD  
TELEFON 05231-3640919 • E-MAIL HEINZEG@GMX.DE

# GABRIELE SUSANNE HEINZE

### PERSÖNLICHE INFORMATION

---

- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Geburtsdatum: 31.08.1978
- Geburtsort: Lübeck

### BERUFSERFAHRUNG

---

2005-2008 Tätigkeit als Assistenzärztin im Klinikum Lippe Detmold (Kardiologie),  
Nordrhein-Westfalen

### AUSBILDUNG

---

1985-1989 Besuch der Grundschule Tanneck in Mölln, Schleswig-Holstein

1989-1998 Besuch der Lauenburgischen Gelehrtenschule in Ratzeburg,  
Schleswig-Holstein

Oktober 1998- Juni 2005 Studium der Humanmedizin an der Universität zu  
Lübeck

August 2004-November 2004 Auslandstertial in Stoke on Trent, Groß-Britannien  
und Valetta, Malta.

- März 2002 Beginn mit der Dissertationsarbeit
- März-Juni 2002 Abschluss der Tierexperimente
- Oktober 2002 Poster-Präsentation von ersten Ergebnissen, American Society  
of Hematology, Philadelphia
- Oktober 2002- Juni 2005 Anfertigung von Cryoschnitten, Testung der  
Färbemethoden, Entwicklung der Kombinationsfärbung CD31/FISH, DNA-  
Gewinnung und Testung im Light cycler, Auswertung der Tumorschnitte

#### VERÖFFENTLICHUNGEN/ORIGINALARTIKEL

---

Stephanie Stoelting<sup>1</sup>, Gabriele Heinze<sup>1</sup>, Roger Nadrowitz, Thomas Wagner und  
Stefan O.Peters: Bone Marrow-derived Endothelial Cells Contribute to  
Angiogenesis in Murine WEHI and JC Tumors, Anticancer Research 28: 771-778  
(2008). Originalartikel. <sup>1</sup>Erst- und Zweitautor gelten als gleichwertig.

G. Heinze, K. Terres Bauermeister, PM Kaczmarek, S. Stölting, R. Nadrowitz, Z.  
Aherrahrou, T. Wagner, S.O. Peters: Endothelial Cells in Solid Growing Wehi 164  
and JC Tumors Derive from Bone Marrow Progenitor Cells. Blood 100, 2002.  
Abstract und Poster American Society of Hematology.